

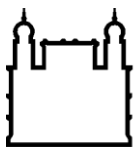
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)
em monócitos CD14+CD16+/- após infecção pelo vírus Dengue**

LUCIANA GOMES FIALHO

Rio de Janeiro
Dezembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUCIANA GOMES FIALHO

**Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)
em monócitos CD14+CD16+/- após infecção pelo vírus Dengue**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção
do título de doutor em ciências

Orientadora: Dr^a: Claire Fernandes Kubelka

Rio de Janeiro
Dezembro de 2016

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

F438 Fialho, Luciana Gomes

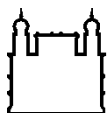
Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em monócitos CD14+CD16+/- após infecção pelo vírus Dengue / Luciana Gomes Fialho. – Rio de Janeiro, 2016.
xxiii, 138 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 92-116

1. Subpopulações de monócitos. 2. Dengue. 3. iNOS. 4. IDO. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUCIANA GOMES FIALHO

Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em monócitos CD14+CD16+/- após infecção pelo vírus Dengue

Orientadora: Dr^a: Claire Fernandes Kubelka

Aprovada em: 20/12/2016

EXAMINADORES:

Presidente: Prof^a. Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro (Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ)

Prof. Dr. Marcelo Bozza (Instituto de Microbiologia Paulo Góes – UFRJ)

Prof^a. Dr^a. Andréa Alice da Silva (Faculdade de Medicina-UFF)

SUPLENTES:

Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco (UNIRIO)

Prof^a. Dr^a. Myrna Bonaldo (Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2016

Dedico esta tese, principalmente à minha família
e àqueles que sempre acreditaram
no meu potencial de chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me amparado nos momentos de fraqueza e por ter me ajudado a seguir em frente sempre que pensei em desistir; pela vida, por tudo;

À minha família, meus pais Sandra e Valter, e minha irmã Andréa, por estarem sempre ao meu lado, por me apoiarem e acreditarem em mim, me dando forças para seguir caminhando;

Ao grande homem que está há 10 anos ao meu lado, meu marido Rafael Carvalho Torres, por me fazer acreditar na capacidade de conquistar meus sonhos e por me fazer acreditar no amor incondicional;

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia viral, da FIOCRUZ: Márcio, Iury, Jéssica, Cíntia Marinho, Nieli, Cintia Mello, Luciana Santos, e também às amigas de outros laboratórios, Caroline Xavier e Mariana Gandini, pela convivência, tornando meus dias mais alegres, pelo companheirismo e apoio de sempre e por se tornarem uma grande família para mim;

À minha amiga Amanda Torrentes, pela enorme amizade além do ambiente de trabalho, pelas risadas e conselhos, pelos experimentos realizados juntas, pela companhia e por todos os momentos alegres que me proporciona quando estamos juntas;

Às pesquisadoras do Laboratório de Imunologia viral, Dr^a. Naide e Dr^a. Luzia, por fazerem o ambiente de trabalho ser tão agradável e pelos infinitos ensinamentos;

À minha orientadora, Dr^a. Claire Kubelka, que se tornou uma amiga e conselheira pessoal, por acreditar no meu potencial, me valorizar como cientista, me escutar, me apoiar nos momentos de fraqueza e por me fazer não desistir e chegar até aqui;

À minha eterna orientadora e amiga, Dr^a. Sônia Reis, pelos primeiros ensinamentos, pela dedicação e companheirismo e por fazer da ciência a minha paixão;

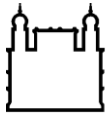
Ao nosso colaborador há muitos anos e médico Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, pela atenção e dedicação aos nossos estudos, pela simpatia e pelos aprendizados;

À pós-graduação em Biologia Parasitária e às instituições financeiras, CAPES, FAPERJ, CNPq, IOC/FIOCRUZ pelo apoio financeiro e todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste projeto;

Aos integrantes da banca examinadora, por aceitarem o convite e contribuírem para aprimorar meus conhecimentos;

À todos os voluntários do estudo, demais médicos e membros do laboratório de Flavivírus, sem os quais este trabalho não seria possível.

“Enquanto houver forças, eu lutarei,
pois a fé é o que me move.”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

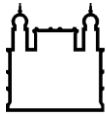
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em monócitos CD14+CD16+/- após infecção pelo vírus Dengue

RESUMO

Os monócitos humanos em condições fisiopatológicas podem ser ativados, passando a produzir diversos mediadores inflamatórios, além de induzir enzimas como iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e IDO (Indoleamina 2,3 dioxigenase). Sabe-se que monócitos não clássicos, CD14+CD16+ estão mais associados à produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que os monócitos clássicos, CD14+CD16-, tendem a possuir um papel mais protetor na dengue. Considerando-se que as enzimas iNOS e IDO podem estar envolvidas na infecção pelo DENV e que o vírus é capaz de ativar os monócitos, buscamos determinar as diferentes subpopulações de monócitos expressando iNOS e IDO e sua associação com algumas citocinas/quimiocinas produzidas durante a infecção pelo DENV-4 e DENV-2. Foram utilizadas amostras de pacientes da epidemia de DENV-4 ocorrida em 2013, MS, além de células de doadores saudáveis, infectadas *in vitro* pelo DENV-2. Observamos que pacientes com DENV-4 apresentam aumento na detecção de iNOS e IDO em ambas subpopulações de monócitos, além de uma leve expansão de células CD14+CD16+ e redução de CD14+CD16-. Estes pacientes também mostraram aumento nos níveis de NO, IL-10, IP-10, MCP-1, IFN- γ e TNF- α no plasma durante a fase aguda da infecção. Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, a associação da enzima IDO com a subpopulação de monócitos CD14+CD16+ e de iNOS com a subpopulação CD14+CD16-. A subpopulação de monócitos clássicos, CD14+CD16- mostrou estar inversamente correlacionado com os níveis de IL-10 e IP-10/CXCL10, enquanto que monócitos não-clássicos, CD14+CD16+ estão positivamente correlacionados com a citocina IL-10. TNF- α , IL-10 e a quimiocina IP-10/CXCL10 estão positivamente correlacionadas com a população de monócitos CD14+iNOS+. Ambas as células CD14+ - CD16-iNOS+ e CD16+iNOS+ apresentaram correlação positiva com IL-10, IP-10/CXCL10 e MCP-1/CCL2, além do TNF- α estar associado às células CD16-iNOS+. As populações CD14+CD16-IDO+ e CD16-IDO+ correlacionaram-se positivamente com IL-10. Além disso, a subpopulação de monócitos CD16-IDO+ também apresentou uma correlação positiva com TNF- α e IP-10/CXCL10. Avaliamos também a infecção *in vitro* de monócitos humanos pelo DENV-2 e, novamente observamos uma associação da iNOS com a subpopulação CD14+CD16-. Não foram observadas alterações na frequência das subpopulações de monócitos, bem como nenhum aumento detectável destas enzimas nem produção de citocinas/quimiocinas na análise realizada 24h após a infecção. Entretanto, o estímulo das culturas com LPS+IFN- γ foi associado à presença de IDO e reduziu a replicação viral e a taxa de infecção em ambas subpopulações estudadas, além de aumentar a produção das citocinas/quimiocinas IL-10, MCP-1 e TNF- α . O uso de um inibidor de NO (L-NMMA), aumentou a detecção de IDO e a produção destes mediadores inflamatórios, além dos níveis de produção de NS1. Já o uso de um doador de NO (SNAP), foi capaz de reduzir a infecção nas subpopulações celulares avaliadas. Confirmamos, assim, a ação antiviral da molécula NO na dengue e sua possível ação sobre a enzima IDO, na doença. Ainda, nossos dados sugerem um papel regulador e antiviral da enzima IDO durante a infecção pelo DENV, que merece ser melhor investigado.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Induced nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) in CD14⁺CD16⁺/⁻ monocytes after Dengue virus infection

ABSTRACT

Under physiopathological conditions, the human monocytes can be activated, producing several inflammatory and inducing enzymes such as iNOS (induced nitric oxide synthase) and IDO (Indoleamine 2,3 dioxygenase). It is known that non-classical monocytes, CD14⁺CD16⁺ are more associated with the production of pro-inflammatory cytokines, whereas the classical monocytes, CD14⁺CD16⁻, tend to have a more protective role in dengue. Considering that iNOS and IDO enzymes may be involved in DENV infection and that the virus is capable of activating monocytes, we determined monocyte subsets that express iNOS and IDO and identified their association with some cytokines/chemokines produced during DENV-4 infection and DENV-2. Patient samples from a DENV-4 epidemic occurred in 2013, MS, were analyzed, as well as cells from healthy donors, infected *in vitro* by DENV-2. We observed that patients with DENV-4 had increased iNOS and IDO detection in both monocyte subsets, in addition to a mild expansion of CD14⁺CD16⁺ cells and a reduction in CD14⁺CD16⁻. These patients also showed increased NO, IL-10, IP-10, MCP-1, IFN- γ and TNF- α levels in plasma during the acute phase of infection. Our results showed, for the first time, the association of the IDO enzyme with the CD14⁺CD16⁺ subpopulation and iNOS with the CD14⁺CD16⁻ subpopulation. The classical monocyte subset, CD14⁺CD16⁻ was shown to be inversely correlated with IL-10 and IP-10/CXCL10 levels, while the non-classical CD14⁺CD16⁺ is positively correlated with the IL-10 cytokine. TNF- α , IL-10 cytokines and IP-10/CXCL10 chemokine are positively correlated with the CD14⁺iNOS⁺ monocyte population. Both CD14⁺ cells -CD16⁻iNOS⁺ and CD16⁺iNOS⁺ subsets - presented positive correlation with IL-10, IP-10/CXCL10 and MCP-1/CCL2, besides TNF- α associated with CD16⁻iNOS⁺ cells. The CD14⁺CD16⁻IDO⁺ and CD16⁺IDO⁺ populations correlated positively with IL-10. Furthermore, the CD16⁻IDO⁺ monocyte subset also presented a positive correlation with TNF- α and IP-10/CXCL10. We also evaluated the *in vitro* infection of human monocytes by DENV-2 and, once again, it was observed an association of iNOS with the CD14⁺CD16⁻ subset. No changes in frequencies of the monocyte subsets were observed, no detectable increase in these enzymes nor the production of cytokines/chemokines, in analyses performed at 24 hours after infection. However, the cultures stimulation with LPS+IFN- γ was associated with IDO presence and reduced viral replication and infection rate in both monocyte subsets studied; in addition, it increased the production of IL-10, MCP-1 and TNF- α cytokines/chemokines. The use of an NO inhibitor (L-NMMA) increased IDO detection and the production of these inflammatory mediators, besides elevating NS1. On the other hand, the use of an NO donor (SNAP) could reduce infection in the cell subsets evaluated. We thus confirmed the antiviral action of the NO molecule on dengue and its possible action on the IDO enzyme in the disease. Furthermore, our data suggest a regulatory and antiviral role of the IDO enzyme during DENV infection that deserves to be better investigated.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | xi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1- Histórico e epidemiologia da dengue..... | 1 |
| 1.2- O vírus Dengue (DENV)..... | 4 |
| 1.2.1- Estrutura viral..... | 4 |
| 1.2.2- Replicação viral e células-alvo..... | 9 |
| 1.3- Manifestações clínicas..... | 12 |
| 1.3.1- Dengue com e sem sinais de alerta..... | 13 |
| 1.3.2- Dengue grave..... | 14 |
| 1.4- Imunopatogenia da dengue..... | 15 |
| 1.4.1- Papel das citocinas e mediadores inflamatórios na dengue..... | 20 |
| 1.5-Óxido nítrico sintase induzida (iNOS)..... | 27 |
| 1.5.1- O papel da iNOS na dengue | 29 |
| 1.6- Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)..... | 30 |
| 1.6.1- O papel da IDO na dengue..... | 34 |
| 1.7- Monócitos..... | 34 |
| 1.7.1- Subpopulações de monócitos..... | 35 |
| 1.8- Justificativa..... | 38 |
| 2- Objetivos..... | 39 |
| 2.1- Objetivo Geral..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2- Objetivos específicos..... | 39 |
| 3- Metodologia..... | 40 |
| 3.1- Coleta das amostras e diagnóstico laboratorial dos pacientes..... | 40 |
| 3.2- Cultura de células C6/36..... | 41 |
| 3.3- Produção do estoque viral..... | 41 |
| 3.4- Titulação viral por imunofluorescência indireta..... | 41 |
| 3.5- Obtenção de células mononucleares do sangue periférico e criopreservação..... | 42 |
| 3.6- Isolamento e infecção de monócitos humanos primários obtidos de doadores saudáveis..... | 43 |
| 3.7- Marcação extra e intracelular para a análise de PBMCs por citometria de fluxo..... | 44 |
| 3.8- Quantificação de fatores solúveis por imunoenaios..... | 46 |
| 3.9- Detecção de NO₂ pela Reação de Griess..... | 47 |
| 3.10- Análise estatística..... | 48 |
| 3.11- Comitê de Ética..... | 48 |
| 4- Resultados..... | 48 |
| 4.1- Características clínicas, laboratoriais e demográficas..... | 48 |
| 4.2- Produção de citocinas/quimiocinas no plasma/soro de pacientes com DENV-4 | 52 |
| 4.3- A subpopulação de monócitos CD14+CD16+ está fracamente ativada durante infecção pelo DENV-4..... | 53 |
| 4.4 - A detecção das enzimas iNOS eIDO está elevada na infecção pelo DENV-4 e associada a subpopulações de monócitos específicas..... | 56 |

| | |
|---|----|
| 4.5 - Os pacientes infectados com DENV-4 apresentam um aumento dos níveis plasmáticos de NO | 58 |
| 4.6- As subpopulações de monócitos estão correlacionadas com os níveis de citocinas/quimiocinas produzidas em pacientes com DENV-4..... | 59 |
| 4.7- O pico de replicação do DENV-2 ultracentrifugado, em monócitos humanos infectados <i>in vitro</i> , ocorre 24 horas após a infecção..... | 60 |
| 4.8- A inibição da molécula NO aumenta a frequência de células CD16- e reduz a população CD16+ durante a infecção de monócitos humanos, <i>in vitro</i> , pelo DENV-2 | 62 |
| 4.9- A detecção de iNOS está associada à subpopulação de monócitos CD14+CD16-, independente da condição de infecção..... | 65 |
| 4.10- A detecção de iNOS não sofre alteração 24 horas após a infecção <i>in vitro</i> pelo DENV-2, mediante os diversos tipos de tratamentos, independente das subpopulações de monócitos..... | 67 |
| 4.11- A detecção de IDO não sofre alteração 24 horas após a infecção <i>in vitro</i> pelo DENV-2, mas é elevada pelo estímulo com LPS+IFN- γ em células CD14+ totais e CD16-, além de ser elevada também pela inibição de NO, em células CD16+ | 69 |
| 4.12- A frequência de células positivas para o Ag viral está elevada 24h após a infecção <i>in vitro</i> pelo DENV-2, e o doador de NO, bem como o estímulo com LPS+IFN- γ são capazes de reduzir a infecção em ambas subpopulações de monócitos estudadas | 71 |
| 4.13- O estímulo com LPS+IFN- γ , assim como a inibição da molécula de NO, aumentam a produção de IL-10, MCP-1 e TNF- α | 73 |
| 4.14- A infecção pelo DENV-2, assim como a inibição da molécula NO aumenta a taxa de NS1, enquanto o estímulo com LPS+IFN- γ reduz a taxa dessa proteína viral..... | 75 |
| 5- Discussão..... | 77 |

| | |
|---|------------|
| 6- Conclusões..... | 90 |
| 7- Referências bibliográficas..... | 92 |
| 8- Anexos..... | 117 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1- Casos prováveis de dengue..... | 3 |
| Figura 1.2- Estrutura e genoma do DENV..... | 5 |
| Figura 1.3- Ciclo de replicação do DENV..... | 10 |
| Figura 1.4- Classificação da dengue..... | 15 |
| Figura 1.5- Imunopatologia da dengue..... | 26 |
| Figura 1.6- Isoformas da NO sintase..... | 28 |
| Figura 1.7- Via da quinurenina no metabolismo do triptofano..... | 31 |
| Figura 1.8- Subpopulações de monócitos humanos..... | 37 |
| Figura 4.1- Parâmetros clínicos, demográficos e laboratoriais de pacientes infectados com DENV-4, de acordo com a classificação clínica..... | 51 |
| Figura 4.2- <i>Dot plots</i> e gráficos de contorno das análises de citometria de fluxo, representando a população de monócitos e histogramas iNOS/IDO dentro das subpopulações CD14+CD16- ou CD16+..... | 54 |
| Figura 4.3- Frequências das células CD14+CD16-/CD16+ circulantes em pacientes com dengue..... | 55 |
| Figura 4.4- Intensidade média de fluorescência (MFI) de iNOS e IDO em células CD14+ em pacientes com dengue, de acordo com as subpopulações de monócitos..... | 57 |
| Figura 4.5- Dosagem de nitrito (NO ₂ ⁻) no plasma de pacientes com DENV..... | 58 |
| Figura 4.6- Cinética da infecção do DENV-2 ultracentrifugado em monócitos humanos, realizada por citometria de fluxo..... | 61 |
| Figura 4.7- <i>Dot plots</i> e gráficos de contorno, representando a população de monócitos, a partir de análise de citometria de fluxo e suas subpopulações CD14+CD16- ou CD16+, em células controle, ou infectadas com DENV-2...63 | 63 |
| Figura 4.8- Frequências de células CD14+CD16+/CD16+, em cultura de monócitos infectadas <i>in vitro</i> pelo DENV-2 e submetidas à diferentes tratamentos..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.9- Médias das intensidades de fluorescências (MFI) de iNOS e IDO e a frequência de células positivas para o Ag viral nas diferentes subpopulações de monócitos CD14 ⁺ | 66 |
| Figura 4.10- Média da intensidade de fluorescência (MFI) de iNOS nas células CD14 ⁺ , de acordo com as subpopulações de monócitos e os diferentes tratamentos..... | 68 |
| Figura 4.11- Média da intensidade de fluorescência (MFI) de IDO em células CD14 ⁺ , de acordo com as subpopulações de monócitos e os diferentes tratamentos..... | 70 |
| Figura 4.12- Percentual de células positivas para o Ag viral, em células CD14 ⁺ , de acordo com as subpopulações de monócitos e os diferentes tratamentos..... | 72 |
| Figura 4.13- Produção de citocinas/quimiocinas no sobrenadante de culturas de monócitos infectadas e submetidas a diferentes tipos de tratamentos..... | 74 |
| Figura 4.14- Detecção de NS1 no sobrenadante de monócitos humanos infectados <i>in vitro</i> pelo DENV-2 e submetidos a diferentes tratamentos..... | 76 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1- Parâmetros clínicos, laboratoriais e demográficos de pacientes com dengue..... | 50 |
| Tabela 4.2- Determinação de citocinas/quimiocinas circulantes em pacientes com dengue..... | 53 |
| Tabela 4.3- Correlação entre as subpopulações de monócitos circulantes e citocinas/quimiocinas em pacientes com dengue..... | 60 |
| Tabela 4.4- Efeito dos tratamentos sobre a produção de citocinas/quimiocinas..... | 75 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1-MT - 1 metil-triptofano

ACD - Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose

ADE - Facilitação dependente de anticorpos (do inglês *antibody-dependent enhancement*)

Ag - Antígeno

ALT/TGP - Alanina Aminotransferase/ Transaminase glutâmico-pirúvica

AST/TGO - Aspartato Aminotransferase/Transaminase Glutâmico-Oxalacética

ATP - Trifosfato de adenosina

BSA - Albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

CCL - Ligante de quimiocina (do inglês *C-C Motif Chemokine Ligand 2*)

CCR2 - Receptor de quimiocina (do inglês *C-C Motif Chemokine Receptor 2*)

CD - Grupamento de diferenciação (do inglês *cluster differentiation*)

CLEC5 - Domínio de lectina tipo-C da família 5 (do inglês *C-Type Lectin Domain Family 5*)

CLR - Receptores de lectina tipo-C

c-NOS - Óxido nítrico sintase constitutiva

CTLA - Proteína associada ao linfócito T citotóxico (do inglês *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen*)

CXCL- Ligante de quimiocina de motivo

DAPI- 4',6-diamidino-2-fenildol

DCs- Células dendríticas

DC-SIGN- Ligante de Molécula de Adesão Intercelular Não Integrina Específica de célula dendrítica (do inglês *DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin*)

DENV- Vírus Dengue

DMEM - Meio de cultura modificado por Dulbecco (do inglês *dulbecco's Modified Eagle's médium*)

DMSO - Dimetil Sulfóxido (do ingles *Dimethyl sulfoxide*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

EBV- Vírus Epstein-Barr (do inglês *Epstein Barr vírus*)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Ensaio imuno-enzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

e-NOS - Óxido nítrico sintase endotelial

FACS - Separação celular ativada por fluorescência (do inglês *fluorescence-activated cell sorting*)

Fc- Fragmento cristalizado

FcgRIII - Receptor de baixa afinidade para a imunoglobulina G

FCR - Receptor para porção Fc de anticorpos

FD - Febre da dengue

FDCA - Febre da dengue com sinais de alerta

FDSA - Febre da dengue sem sinais de alerta

FHD - Febre hemorrágica da dengue

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FSC - Dispersão frontal (do inglês *Forward Scatter*)

GITR - Receptor de glicocorticóide induzido por TNF (do inglês *glucocorticoid-induced TNFR family related gene*)

GM-CSF - Fator estimulador da colônia de macrófagos e granulócitos (do inglês *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

GRP78/BiP - Proteína reguladora de glicose 78 (do inglês *glucose-regulated protein*)

HIV-1 - Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*).

HLA - Antígeno Leucocitário Humano (do inglês *Human leukocyte antigen*)

HMGB - Proteína de grupo de alta mobilidade (do inglês *high-mobility group protein*)

Hsp - Proteína de choque térmico (do inglês *Heat shock protein*)

HTLV - Vírus T-linfotrópico humano (do inglês *Human T lymphotropic virus*)

IDO - Indoleamina 2,3 dioxigenase

IFN- Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL- Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

IP - Proteína induzida por Interferon gamma

IRF-1 - Fator regulador de Interferon 1 (do inglês *interferon regulator factor 1*)

JAK - Janus kinase

L-NA - NG-nitro-L-arginina

L-NAA - NG-amino-L-arginina

L-Name-NG-nitro - L-arginina-metil-éster

L-NIO - N-imino-etil-Lornitina

L-NMMA - NG-monometil-L-arginina

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP - Proteína quimioatrativa de monócitos (do inglês *monocyte chemoattractant protein*)

MDMs - Macrófagos derivados de monócitos humanos

MFI - Média da intensidade de fluorescência (do inglês *mean fluorescent intensity*)

MHC - Complexo de Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *major Histocompatibility Complex*)

MIF - Fator de inibição de migração de macrófagos (do inglês *macrophage Migration Inhibitory Factor*)

MIP - Proteína Inflamatória de Macrófago (do inglês *macrophage Inflammatory Protein*)

MoDC - células dendríticas derivadas de monócitos humanos

MR - Receptor de manose

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NaN₃ - Azida de sódio

NAP - N-acetil-DL-penicilamina

NC - Nucleocapsídeo

NF- κ B - Fator nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor kappa B*)

n-NOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NOX2- NADPH oxidase

NRF2- Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

NS - Proteína não-estrutural (do inglês *non-structural*)

NTPase - Nucleosídeo 5' trifosfatase

O₂ . Molécula de oxigênio

(O₂⁻) - Ânion superóxido

OMS - Organização Mundial da Saúde

(ONOO⁻) - Peroxinitrito

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

ORF- Fase aberta de leitura (do inglês *Open Reading Frame*)

PBMCs - Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS - Tampão salina fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)

prM - Precursor da proteína M

Proteína C - Proteína do Capsídeo

Proteína E - Proteína do Envelope

Proteína M - Proteína de Membrana

PGE₂ – Prostaglandina E2

RdRp - RNA polimerase - dependente de RNA

RE- Retículo endoplasmático

RNA- Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*).

ROS - Espécies reativas do Oxigênio

RPMI - Meio de cultura produzido no Instituto Memorial Parque Roswell (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*)

RTPase - RNA trifosfatase 5' terminal

SCD - Síndrome do choque do dengue

SE- Semana epidemiológica

SFB - Soro fetal bovino

SNAP- S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SSC - Dispersão lateral (do inglês *Side Scatter*)

STAT-1- Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (do inglês *signal transducer and activator - sinal of transcription 1*)

TCID₅₀ - Dose infectante de 50% da cultura de tecidos (do inglês *tissue culture infective dose*)

TGF - Fator de transformação do crescimento (do inglês *transforming growth factor*)

TLR4 - Receptor do tipo *Toll* (do inglês *Toll like receptor-4*)

TNF - Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)

TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

Tregs - Células T reguladoras

UFRJ - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

VDRL - Laboratório de pesquisa em doenças venéreas (do inglês *Venereal Disease Research Laboratory*)

1- Introdução

1.1- Histórico e epidemiologia da dengue

Na última década, houve a emergência de novas arboviroses reconhecidas e a reemergência de outras. Entre as arboviroses transmitidas por mosquitos, a dengue é a que se espalha mais rapidamente no mundo. Nos últimos 50 anos, houve um aumento de 30% em sua incidência, com expansão geográfica para novos países. Anualmente, ocorrem cerca de 50 a 100 milhões de infecções no mundo, e 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão (1, 2).

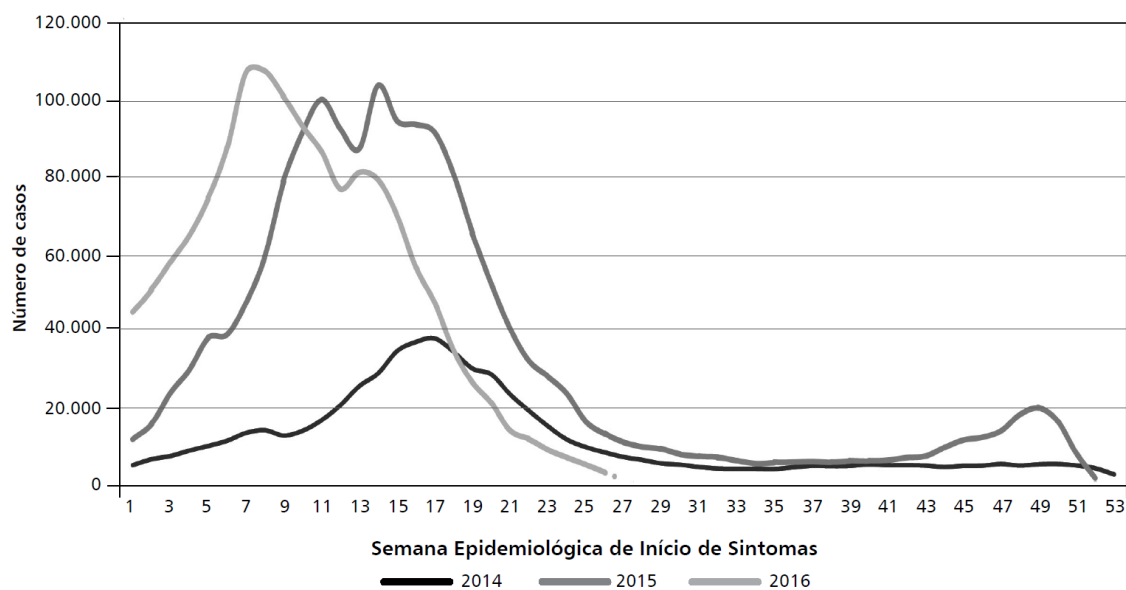
O vírus Dengue foi isolado pela primeira vez no Japão, de soldados japoneses acometidos de uma doença febril (3). Na mesma época, pesquisadores isolaram o mesmo vírus de soldados americanos provenientes do Havaí. Posteriormente, foi isolado outro sorotipo proveniente de Nova Guiné (4). Os isolamentos foram realizados através da inoculação de amostras de sangue, em camundongos. Os primeiros isolados foram denominados DENV-1 e o isolado de Nova Guiné foi denominado DENV-2. O DENV-3 e o DENV-4 foram isolados em 1956, nas Filipinas (5).

Há relatos documentados na enciclopédia chinesa, publicada durante a dinastia Chin (265 a 420 d.C), de uma doença semelhante à dengue, referida como "veneno da água". Além disso, uma epidemia semelhante à dengue foi relatada por volta dos anos 1789 – 1790, ocorrida em Batavia (Jakarta), Cairo e Filadélfia, indicando que a distribuição global da dengue tem existido por mais de 200 anos (6). A primeira epidemia bem documentada, que se tornou conhecida como febre hemorrágica, aconteceu em Manila nos anos 1953/1954, seguida por outra ainda maior em Bangkok, em 1958 (7, 8). A origem das infecções humanas pelo vírus Dengue (DENV) não é bem definida. Possivelmente, a mudança do vetor, do ambiente florestal para o rural, devido às derrubadas das florestas e desenvolvimento dos povoados, seja a principal causa. Adaptado ao ambiente peridoméstico, o mosquito encontrou condições que favoreceram seu desenvolvimento e, assim, conseguiu disseminar o vírus. Outra hipótese é que o vírus tenha surgido na África e espalhou-se pelo mundo através do tráfico de escravos (9).

A maioria das epidemias de dengue ocorreu nas Américas, sul da Europa, norte da África, Mediterrâneo, Ásia, Austrália, Índia, Oceania, regiões sul e central do Pacífico e no Caribe, no final do século XVIII, durante o século XIX e início do XX. O mosquito adaptou-se muito bem ao ambiente urbano, vivendo próximo à população e se reproduzindo de forma eficiente. Nas Américas, a Febre da dengue (FD) surgiu durante a Segunda Guerra Mundial, havendo evidências de uma endemia pelo DENV-2 na região do Caribe. Nas décadas de 40, 50 do século passado, foi realizada uma intensa campanha de combate ao vetor *Aedes aegypti*, pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), com a finalidade de se diminuir a transmissão urbana do vírus da febre amarela (9). Porém, com a descontinuidade do combate ao mosquito, o vetor *A. aegypti* foi reintroduzido na América, levando ao ressurgimento das epidemias de FD. A primeira principal epidemia de dengue americana ocorreu em Cuba, em 1977/1978 e foi causada pelo DENV-1. O DENV-1 e DENV-4 foram introduzidos, assim como um novo subtipo do DENV-2, neste continente (10). Durante o período de 1981 a 1997 foram confirmados casos de FHD (Febre hemorrágica da dengue) em 24 países (11). No ano de 1989, ocorreu uma epidemia de FHD na Venezuela e uma nova epidemia em Cuba, no ano de 1997. Ambas foram causadas pelo DENV-2, não havendo casos graves, na epidemia de 1997, entre crianças (12). Na região das Américas tem ocorrido um crescimento progressivo de casos de dengue durante as três últimas décadas levando à extensão da doença por quase a totalidade dos países (13).

No Brasil, a primeira evidência de circulação do DENV ocorreu no estado de São Paulo (SP), em 1916, e Rio de Janeiro (RJ), em 1923 (14, 15). A primeira epidemia de dengue documentada no país ocorreu em 1981, em Boa Vista, Estado de Roraima, onde foram identificados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (16). O DENV-2 foi detectado no Rio de Janeiro, em 1990, e foi responsável por um extenso surto e surgimento de casos graves (17, 18). No entanto, a primeira grande epidemia de dengue ocorrida no Brasil se deu no ano de 2002, quando foram registrados quase 800.000 casos da doença, ocasionando mais de 30 mortes por FHD, sendo a maioria deles identificado como DENV-3 (19). O DENV-2 foi reintroduzido no ano de 2008, quando outra grande epidemia foi instalada no estado, encontrando uma parte significativa de indivíduos não imunes e outra parte provavelmente já infectada por outro sorotipo (DENV-1 ou

DENV-3) (20, 21). Na ocasião, a introdução de uma nova linhagem desse sorotipo foi associada aos casos graves de dengue ocorridos neste período (22). Neste mesmo ano, foram registrados os primeiros óbitos de indivíduos na faixa etária entre 0 e 13 anos, constituindo cerca de 50% das mortes ocasionadas (1). O DENV-4 foi detectado pela primeira vez no Brasil durante um surto de dengue, em 1982, no norte do país, e, desde então, nenhum caso novo de DENV-4 havia sido detectado até o ano de 2010 (23), quando o DENV-4 (genótipo II) foi introduzido em Boa Vista, RR, se disseminando para vários estados nos anos seguintes, originando epidemias (24). No Brasil, foram reportados cerca de 1 milhão e 600 mil casos durante o ano de 2015 e mais de 1 milhão e 300 mil casos até a 27^a semana epidemiológica de 2016, com 639 casos de dengue grave e 6.254 casos de dengue com sinais de alerta (**Figura 1.1**). O monitoramento dos sorotipos circulantes este ano, demonstra que 89,7% das amostras processadas foram positivas para o sorotipo viral DENV-1, mantendo-se o predomínio do ano anterior (25).



Fonte: Sinan Online (atualizado em *13/07/2015; *04/01/2016; *12/07/2016).
Dados sujeitos a alteração.

Figura 1.1: Casos prováveis de dengue. Número de casos, por semana epidemiológica de início dos sintomas, até a Semana Epidemiológica 27, Brasil, 2014^a, 2015^b, 2016^c. (Fonte: SVS-MS, 2016).

No presente estudo foram utilizadas amostras de pacientes de uma epidemia de DENV-4 ocorrida em Mato Grosso do Sul, em 2013. Mato Grosso do Sul (MS) é uma área endêmica do vírus da dengue. A introdução de um novo sorotipo (DENV-4) neste estado foi observada com bastante preocupação, pelo potencial deste sorotipo originar epidemias na região, devido à densidade vetorial elevada e a susceptibilidade da população ao presente sorotipo. Os primeiros casos de DENV-4 detectados em Mato Grosso do Sul foram em Campo Grande, capital do estado e a cidade mais populosa de MS. Após a introdução do DENV-4, uma grande epidemia de dengue ocorreu no verão de 2012/2013, com 43.464 notificações relatadas nas primeiras sete semanas. Durante este período, 15 desses casos resultaram em mortalidades (26).

1.2- O vírus Dengue (DENV)

A dengue é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente, o *Aedes aegypti*, o qual inocula o vírus enquanto se alimenta (27). O vírus Dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* e possui 4 sorotipos específicos (DENV-1 ao -4) (28), sendo o arbovírus humano de maior importância médica no mundo, causando uma doença febril aguda, de amplo espectro clínico, que varia desde uma infecção inaparente até formas mais graves e fatais (29). O DENV tem quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, -2, -3 e -4), os quais compartilham 65%-75% de homologia em suas sequências de RNA. A infecção por um dos quatro sorotipos confere imunidade duradoura para o sorotipo homólogo. Ainda, sabe-se que há uma imunidade cruzada entre os diferentes sorotipos, após uma infecção primária, porém, esta imunidade dura cerca de 6 meses, quando o indivíduo torna-se, então, suscetível aos demais sorotipos do DENV (30).

1.2.1- Estrutura viral

A partícula viral do DENV, assim como de todos os flavivírus, possui um formato esférico e diâmetro de aproximadamente 50 nm. Múltiplas cópias da proteína C (11kDa) encapsulam o RNA genômico, composto por uma fita simples com senso positivo, para formar o nucleocapsídeo viral icosaédrico (NC), com diâmetro de aproximadamente 30 nm. O NC, por sua vez, é

circundado por um envelope, formado por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, onde 180 cópias da proteína M e E estão ancoradas (31-33). O genoma de aproximadamente 11 Kb possui uma fase aberta de leitura (ORF- *Open Reading Frame*) que começa no resíduo metionina e codifica uma poliproteína, precursora das proteínas virais. Sua ordem de codificação é: 5`-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B- NS3- NS4A-NS4B-NS5-3` (34). Tanto proteases celulares do hospedeiro quanto proteases do próprio vírus são capazes de clivar a proteína precursora, gerando três proteínas estruturais, do capsídeo (C), pré-Membrana (prM)/M, e a proteína do envelope (E), e sete proteínas não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (35) (**Figura 1.2**).

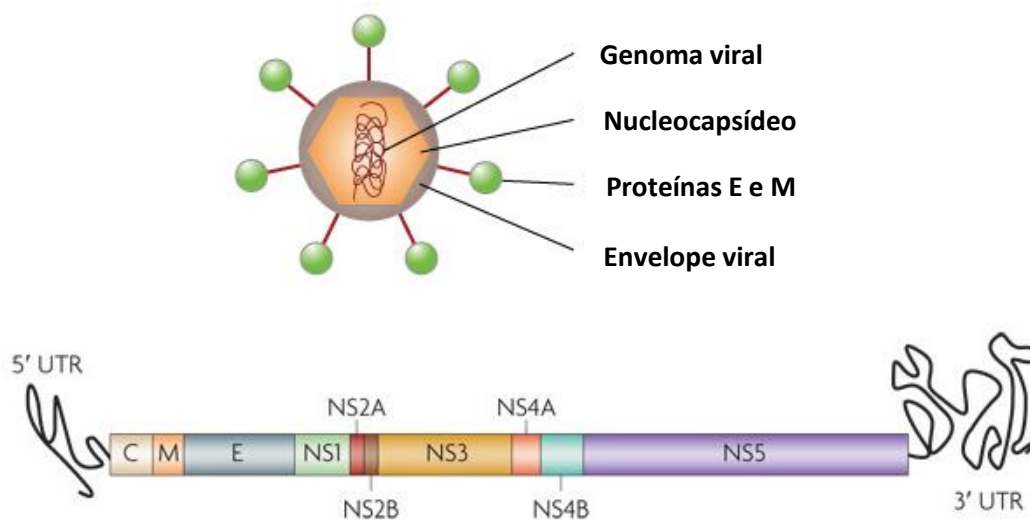


Figura 1.2: Estrutura e Genoma do DENV. O vírus da dengue possui uma forma aproximadamente esférica. Na parte interior do vírus está o nucleocapsídeo, que é feito do genoma viral e proteínas C. O nucleocapsídeo está rodeado por uma membrana chamada de envelope viral, uma bicamada lipídica que é feita a partir do hospedeiro. Inserido no envelope viral estão as proteínas E e M, que se estendem através da bicamada lipídica. Estas proteínas formam uma camada exterior protetora que controla a entrada do vírus nas células humanas. A fase aberta de leitura de seu genoma codifica três proteínas estruturais (as glicoproteínas do Capsídeo (C), de Membrana (M), e do Envelope (E)) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Adaptado de Guzman *et al.*, 2010 e Nature education, 2011. Link: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>, acessado em 05/11/2016).

A proteína C, como foi dito anteriormente, é importante para a formação do nucleocapsídeo viral e contém 112 a 127 aminoácidos, possuindo peso molecular de aproximadamente 13,5 kDa, sendo o primeiro polipeptídeo sintetizado durante a tradução. Possui uma alta proporção de aminoácidos

básicos que parecem neutralizar a carga negativa da molécula de RNA viral com a qual está associada. A região central da proteína contém domínios hidrofóbicos que interagem com a membrana celular, permitindo a montagem da partícula viral (28). Após montada, a proteína C possui um domínio hidrofóbico C-terminal que age atuando como uma sequência sinal transmembrana para que ocorra a translocação da prM para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (36).

A proteína M, presente na partícula madura, é um pequeno fragmento proteolítico (8 kDa) de sua forma precursora prM e é gerada através da clivagem de prM na porção N-terminal, durante o transporte pelo Complexo de Golgi (37). Estudos indicam que, antes de ser clivada na maturação viral, esta proteína funciona impedindo que a proteína E sofra mudanças conformacionais durante o seu trânsito em compartimentos ácidos, na fase de maturação do vírus, protegendo-a da reorganização induzida por pH e fusão prematura durante a secreção. Além disso, ela parece auxiliar na montagem da proteína E, funcionando como uma *chaperona*, permitindo seu empacotamento e montagem apropriada na superfície do vírus (33, 38-40). A glicoproteína prM, de aproximadamente 26 kDa, é gerada durante o processamento da poliproteína viral, pela clivagem da sua região N-terminal no retículo endoplasmático. Sua clivagem resulta no rearranjo de estruturas oligoméricas na superfície do vírion, promovendo a infectividade do vírion maduro.

A proteína E, a maior proteína viral com 495 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 53 kDa, apresenta-se como o principal constituinte da superfície dos vírions e está envolvida em diversas funções biológicas do vírus como: ligação aos receptores das células-alvo e endocitose, indução de anticorpos neutralizantes, hemaglutinação de eritrócitos e montagem da partícula viral (32, 41). Encontra-se na membrana externa do envelope viral e é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Esta proteína possui 3 domínios estruturais distintos (DI, DII e DIII) separados por uma região com dois domínios transmembranares (42). O domínio I está estruturalmente posicionado entre o II, o domínio de homodimerização, e o domínio III, imunoglobulina-like. Análises estruturais dos vírions maduros revelaram que o vírus possui um envelope icosaédrico e um nucleocapsídeo do core, esférico

(43). Uma vez que a superfície viral é composta principalmente pelas proteínas M e E entrelaçadas, os antígenos M também são capazes de induzir resposta por anticorpos neutralizantes. A interação entre estas três proteínas estruturais do DENV, resulta em sua própria conformação estrutural (44).

Dentre as proteínas não-estruturais, a NS1, expressa tanto na forma residente no retículo endoplasmático (RE), associada à membrana de células infectadas ou na forma solúvel no plasma de pacientes infectados, parece estar envolvida na replicação viral (41, 45) e, além disso, foi recentemente descrita como envolvida no aumento da permeabilidade endotelial, resultando no extravasamento vascular (46). Sua forma secretada, assim como a proteína E, é um importante alvo da resposta de anticorpos e parece ter um papel significativo na patogênese da doença (39). Esta proteína possui 45-48 kDa, contendo 353 a 354 aminoácidos, é altamente conservada e atua na fase precoce da infecção viral, sendo ainda essencial para a viabilidade do DENV. Durante a infecção viral, a NS1 utiliza a sequência sinal localizada na região C-terminal da proteína E para ser translocada, pela via do retículo endoplasmático. Uma peptidase sinal da célula hospedeira cliva, então, este peptídeo sinal e gera a porção N-terminal da proteína NS1 (47). Através da via secretora, a proteína NS1 é translocada e permanece ancorada à membrana plasmática da célula infectada ou, então, é secretada para o meio extracelular na forma de hexâmeros (45).

A NS1 circulante (sNS1) já foi detectada em amostras de soro de pacientes, na fase aguda, e em sobrenadante de culturas de células infectadas seus níveis foram correlacionados com o título de vírus infeccioso. Níveis plasmáticos de NS1 foram mais associados com casos de FHD, do que com casos de FD, sugerindo que seus níveis estariam relacionados à gravidade da doença (48). Alguns estudos sugerem que os níveis de NS1 secretadas estariam associados com os níveis de viremia em infecções secundárias pelo DENV-2, sendo usado como diagnóstico (49). Portanto, níveis de NS1 estariam relacionados à carga viral. Além disso, a NS1 foi descrita como sendo capaz de ativar, *in vitro*, proteínas do sistema complemento e esta atividade é aumentada pela presença do anticorpo DENV-específico (50). O mecanismo molecular desta atividade da NS1 ainda é desconhecido. O papel da atividade fixadora do complemento desta proteína no extravasamento plasmático tem

sido questionado devido às discordâncias entre o pico dos níveis de NS1, que ocorrem durante a fase febril e o período do extravasamento plasmático, que ocorre mais tardiamente. Por outro lado, os níveis do antígeno NS1 em amostras biológicas poderiam ser usados como um indicador precoce de uma forma grave da doença (51). Também foi demonstrado que a NS1 é capaz de se ligar à protrombina, formando complexos NS1/protrombina em soro de pacientes com dengue. Ainda, NS1 recombinante foi capaz de inibir a ativação da protrombina e prolongar o tempo de tromboplastina parcial ativada, contribuindo para a hemorragia, em pacientes com FHD (52).

A NS3 é uma proteína com 618 a 623 aminoácidos, de aproximadamente 70 kDa, altamente conservada entre os flavivírus. Como as demais proteínas não-estruturais, ela é importante para a replicação viral, além de interagir com proteínas que se ligam à receptores nucleares, modulando o tráfego intracelular RE/Golgi, tendo um importante papel na distribuição celular e indução de algumas estruturas membranares, observadas durante a infecção pelos flavivírus (39). A NS3 encontra-se no citoplasma e é a principal indutora de respostas específicas de células T (53). Seus epítomos são comumente encontrados no repertório de linfócitos T citotóxicos específicos contra o DENV (39, 44). Esta proteína apresenta diversas atividades enzimáticas, como helicase e protease. Possui um domínio serino-protease localizado na região N-terminal, enquanto sua porção C-terminal apresenta atividades de helicase, nucleosídeo 5' trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase 5' terminal (RTPase) (54). A função helicase é dependente de energia, fornecida pela atividade NTPase que hidrolisa ATP (Adenosina trifosfato) (55). Porém essa função ainda não está completamente esclarecida, possivelmente atua dissociando a estrutura dupla-fita durante a replicação do RNA viral ou no início da síntese de RNA, desdobrando estruturas secundárias. Já sua função RTPase é provavelmente necessária para a remoção do grupo fosfato 5'-terminal e formação da estrutura de *cap* do RNA viral (54).

A proteína NS5 (105 kDa) é a maior entre as proteínas dos *Flavivirus*, contendo de 900 a 905 aminoácidos. Ela age como uma polimerase dependente de RNA viral, atuando na síntese do RNA intermediário que serve de molde para transcrição da fita positiva de RNA (54), bem como uma metiltransferase, além de estar envolvida na replicação viral. Ela também

parece induzir a transcrição e tradução da IL-8, citocina com um importante papel na imunopatogenia da dengue, como descrito adiante (32, 39, 44).

As demais proteínas não-estruturais ainda não estão muito bem caracterizadas. Pouco é descrito sobre a atividade das proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A e NS4B. A proteína NS4A (cerca de 16 kDa; 149 a 150 aminoácidos) parece atuar como âncora da replicase viral à membrana celular, enquanto a proteína NS4B (27 kDa; 248 a 256 aminoácidos) parece auxiliar na modulação da replicação viral em associação à NS3 (56). Ou seja, ambas estão envolvidas na localização apropriada de proteínas virais e montagem do vírion (32). Além disso, é possível que a NS4B, e em uma menor extensão, a NS2A e NS4A, sejam capazes de bloquear a transdução de sinal mediada pelo Interferon (IFN) (57). A NS4A é um potente inibidor de IFN- β e - γ , importantes mediadores da resposta antiviral (39). Nos flavivírus, esta proteína também foi descrita como capaz de induzir autofagia em células epiteliais, protegendo o vírus durante a infecção, uma vez que a autofagia é vital para a replicação dos flavivírus nestas células (58). Por outro lado, foi descrito que a NS4B e NS5 são as responsáveis pela indução de mediadores imunológicos, tais como IL-6 (Interleucina 6), IL-8 (Interleucina 8), IP-10 (Proteína induzida por Interferon gamma 10), TNF- α (Fator de necrose tumoral α) ou IFN- γ (Interferon γ). Além disso, a maturação da NS4B parece ser importante durante a sinalização imune inata, em monócitos infectados com DENV (59).

Por sua vez, a região codificadora NS2 consiste de duas proteínas, a NS2A (22 kDa, com 218 a 231 aminoácidos) e a NS2B (14,5 kDa; 130 a 132 aminoácidos). A NS2A também é necessária para o processamento proteolítico de NS1. Já a proteína NS2B possui função protease do complexo NS2B-NS3 (44).

1.2.2- Replicação viral e células-alvo

Nas infecções naturais pelo DENV, o vírus é inoculado pelo vetor, um mosquito do gênero *Aedes*, juntamente com a sua secreção salivar, através da picada, provavelmente no espaço subcutâneo ou intradérmico. A partícula viral, então, interage com a membrana plasmática da célula alvo e é internalizada (28). A replicação ocorre no próprio local da inoculação, em células retículo-

endoteliais, células de Langerhans, ou fibroblastos (60). Foi demonstrado que células dendríticas intersticiais da derme, localizadas no epitélio, seriam os primeiros alvos potenciais *in vivo* da infecção, uma vez que células dendríticas imaturas obtidas a partir de explantes da pele de cadáveres, com 12 h de falecimento, infectadas com DENV-2 cepa Nova Guiné, apresentavam taxas de infecção entre 60- 80%. (61). Após sua replicação nestas células, os vírus provavelmente atingem os linfonodos através das células dendríticas e se difundem pelo sangue, podendo ser detectados juntamente com o início dos sintomas (**Figura 1.3**).

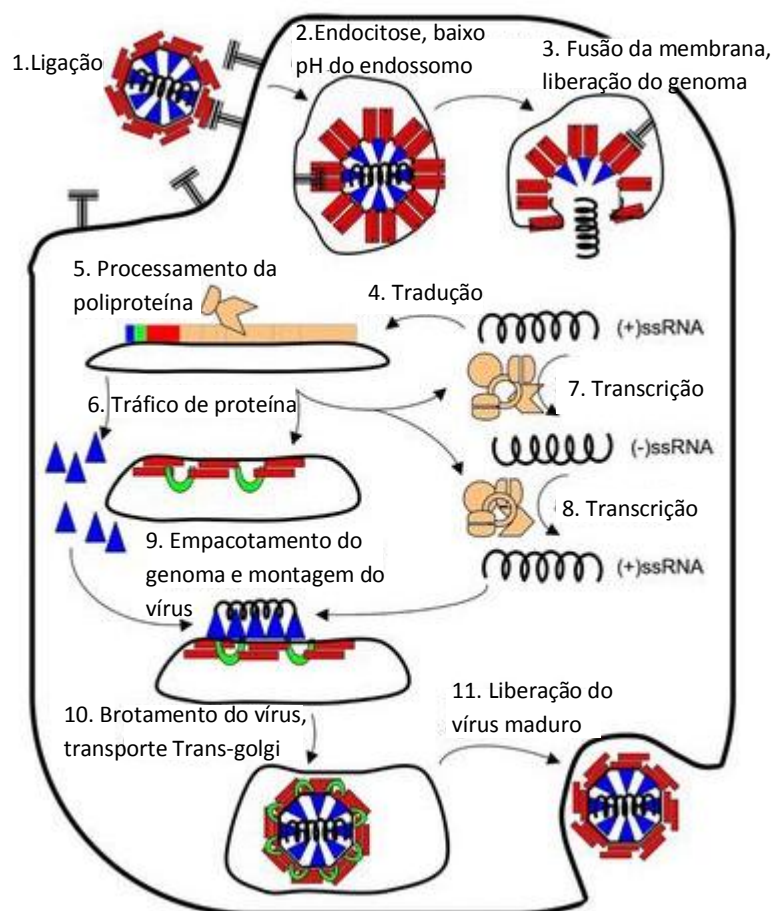


Figura 1.3: Ciclo de replicação do DENV. Resumo do ciclo de replicação do vírus Dengue, destacando cada estágio da replicação. A composição detalhada do complexo de replicação viral é em grande parte desconhecida, mas acredita-se que envolvem muitas (se não todas) as proteínas não-estruturais (Adaptado de Tomlinson, 2009).

Antígenos e RNA virais foram identificados também em células mononucleares do sangue periférico de pacientes, demonstrando que o DENV é capaz de infectar igualmente estas células. Estudos *in vitro* demonstraram que células da linhagem monocítica, como monócitos humanos e células dendríticas imaturas, são as principais células capazes de desenvolver a replicação viral (61, 62). De fato, foi demonstrada por nossa equipe a marcação do antígeno da proteína E do DENV, por citometria de fluxo, em monócitos de pacientes (63). Porém, antígenos virais podem, ainda, ser encontrados em células hepáticas, células de Kupffer, macrófagos alveolares e linfócitos B (64-69). Ainda em humanos, foi demonstrada a presença de antígenos virais em órgãos como fígado, cérebro, baço e pulmão de casos fatais (69, 70). Em modelo de infecção de camundongos, também já foi comprovado que macrófagos e células dendríticas são permissíveis à infecção pelo vírus (71). Estudos propõem ainda um papel para outras células do sistema imunológico, como basófilos e mastócitos. King e colaboradores demonstraram que células da linhagem de mastócitos humanos KU812 são permissivas à infecção pelo DENV, levando à produção de partículas virais e citocinas, tais como IL-1 β e IL-6, mas não de GM-CSF (fator estimulador da colônia de macrófagos e granulócitos), em um modelo dependente de ADE (facilitação da infecção dependente de anticorpos) (72).

A entrada do DENV em sua célula-alvo se dá através da endocitose mediada por clatrina, onde a proteína E ou glicoproteínas virais atuam como ligantes para diversos receptores celulares (73, 74). Esta proteína também é responsável pelo processo de fusão com a membrana celular do endossomo e a liberação dos componentes virais no citoplasma da célula hospedeira. Sendo assim, é essencial que ocorra a correta organização da proteína E durante as fases iniciais, de adsorção e penetração (36). Provavelmente, o vírus se liga a uma molécula de superfície celular comum ou é capaz de explorar diversos receptores para mediar sua infecção, dada a vasta gama de células permissíveis à infecção pelo DENV. Durante a última década, diversos candidatos a receptores e/ou fatores de ataque tem sido identificados, o que sugere que o DENV é capaz de utilizar diversas moléculas para entrar na célula (31). Em células de mosquito, o DENV demonstrou interagir com a proteína de choque térmico 70 (Hsp70) (75), proteínas de 80 e 67 kDa, R80 e

R67, respectivamente (76) e a proteína de 45-kDa (77). O sulfato de heparan (78-80), a proteína de choque térmico 90 (Hsp90) (75), CD14 (81), GRP78/BiP (proteína reguladora de glicose 78) (82) e o receptor de laminina de alta afinidade 37/67 kDa (83) foram identificados como receptores do DENV, em células de mamíferos. Receptores de lectina tipo-C (CLR) estão envolvidos na interação das partículas de DENV com células mieloides humanas (84). Eles incluem o DC-SIGN ou CD209 (ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de célula dendrítica) (85-87), receptor de manose (MR) (88) e o domínio de lectina tipo-C da família 5, membro A (CLEC5A, MDL-1) (89). Um dos principais receptores que medeiam a entrada do vírus em suas células-alvo e com a interação mais bem caracterizada é o DC-SIGN, presente em células dendríticas (DCs), pois é capaz de mediar a infecção dos 4 sorotipos. Sua expressão ectópica confere permissividade à infecção sobre células, geralmente não permissivas (39).

Vários estudos moleculares, realizados com flavivírus, sugeriram um modelo de ciclo viral (28). Uma mudança conformacional irreversível nas glicoproteínas de fusão seria iniciada pelo ambiente ácido do endossoma, resultando em uma fusão das membranas viral e celular (28). Um outro trabalho indica também que, lipídios aniônicos podem ter um papel crucial no processo de fusão do vírus da dengue (74). Posteriormente a esta fusão, ocorre a replicação do genoma, a partir da liberação do NC no citoplasma e a dissociação da proteína do capsídeo e do RNA. Partículas virais ainda imaturas, não infectantes, incluindo aquelas formadas pelas proteínas E e prM, pelo NC e recobertas pela membrana bilipídica, são formadas no lúmen do retículo endoplasmático. No complexo de Golgi são criadas as partículas maduras, a partir da quebra da prM em sua forma madura, a proteína M, por uma furino-protease. Essa clivagem expõe partes da proteína E, facilitando a saída das partículas virais maduras, por exocitose (28, 43).

1.3- Manifestações clínicas

O quadro clínico de infecção da dengue é bastante variado. A doença pode se manifestar como uma febre indiferenciada ou com sintomas brandos, onde a maioria dos pacientes se recupera. Por outro lado, uma pequena parcela progride para a forma grave da doença, caracterizada por

extravasamento de plasma, podendo levar ao choque hipovolêmico, e ao aparecimento de hemorragias graves (90-93). É uma doença, usualmente, não fatal que pode ocorrer tanto em infecções primárias quanto secundárias e afetar crianças e adultos (10, 94). As características clínicas, frequentemente, dependem da idade do paciente. Caracterizam a doença, principalmente em crianças mais velhas (acima de 10 anos) e adultos, o aparecimento súbito de febre (duração de 2 a 7 dias), dores no corpo (cabeça, retroorbital, artralgia, mialgia), anorexia, náuseas, exantema, prova do laço positiva (petéquias) e leucopenia (95).

O amplo espectro de quadro clínico levou à Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1997, a classificar a doença em febre do dengue (FD), febre hemorrágica do dengue (FDH) com ou sem síndrome do choque do dengue (SCD) (96). A FHD é classificada em quatro graus de gravidade, sendo os maiores graus III e IV definidos como SCD (96). Porém, dificuldades na aplicação dos critérios para FHD na situação clínica, principalmente na América Latina, junto com o aumento dos casos clínicos de dengue grave que não se encaixavam nos critérios de FHD estabelecidos até então, motivaram a busca por uma reclassificação mais adequada (97). Sendo assim, a OMS conduziu um estudo multicêntrico entre regiões endêmicas, a fim de coletar evidências sobre os critérios para a classificação da dengue em níveis de gravidade. Através de um conjunto de parâmetros clínicos e/ou laboratoriais, os estudos confirmaram que havia uma clara diferença entre pacientes com dengue grave e aqueles com dengue não-grave. Porém, por razões práticas, era desejável dividir o grupo de pacientes com dengue não-grave em dois subgrupos: aqueles pacientes com sinais de alerta e sem eles (**Figura 1.4**) (1, 95, 98).

1.3.1- Dengue com e sem sinais de alerta

De acordo com a nova classificação adotada pela OMS, em 2009, as manifestações brandas da doença podem ocorrer com ou sem alguns sinais de alerta, os quais são úteis para identificar o indivíduo que pode vir a evoluir para a forma grave da dengue. Alguns critérios foram estabelecidos por esta nova classificação, para os casos mais brandos:

(1) Dengue sem Sinais de alerta (FD): caracterizado por náusea, vômitos, erupções cutâneas, mialgia, artralgia, cefaléia, leucopenia com confirmação laboratorial e prova do laço positivo, sem sinais de hemorragia;

(2) Dengue com Sinais de alerta (FDSA): incluindo: dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido, letargia, agitação, hepatomegalia (aumento > 2cm), elevação das transaminases hepáticas e diminuição na contagem de plaquetas;

Dentre estes sinais de alerta, a dor abdominal é um fator de risco significativo para adultos e crianças, bem como o sangramento de mucosas e a trombocitopenia menor que 10.000/mm³. Outros sinais de alerta, em adultos, são a sonolência, podendo alternar com irritabilidade, a hipoalbuminemia e hematócrito elevado. Neste grupo também é bastante observada a comorbidade. Outros sinais de alerta que podem ser observados são vômitos persistentes e acúmulo clínico de líquidos (1).

1.3.2- Dengue grave

Após a doença, a evolução para a cura ocorre com a redução da febre, representada por sudorese e fraqueza transitórias, evoluindo, então, para a melhora. Entretanto, algumas vezes, a diminuição da febre está associada ao momento em que o paciente agrava, e a defervescência anuncia, portanto, o início de uma etapa crítica, correspondente à forma grave da doença.

Os critérios atuais (2009) estabelecidos pela OMS para esta classificação é:

Dengue Grave: caracterizado por extravasamento plasmático grave, podendo levar ao choque e acúmulo de fluidos acompanhado de desconforto respiratório, hemorragias graves e comprometimento de órgãos como fígado (níveis de AST ou ALT > 1000), coração, sistema nervoso central (com perda de consciência) e/ou outros órgãos (1, 97, 99).

A redução da febre diminui entre o 3º e 6º dia, para as crianças, e entre o 4º e 6º dia para os adultos (período mais frequente, porém, não exclusivo dos indivíduos que evoluem para a dengue grave). A dor abdominal se mantém e apresenta-se intensa, observa-se derrame pleural ou ascite, os vômitos se

tornam mais frequentes e se instala a etapa crítica da doença, o momento de maior frequência de instalação do choque. Nesta etapa também torna-se evidente a hepatomegalia (95).

Durante a etapa de recuperação, o paciente elimina fisiologicamente o excesso de líquido que havia extravasado até normalizar todas as suas funções vitais, sendo necessária atenção médica. Também é importante observar o surgimento do chamado exantema tardio (10 dias após) (95).

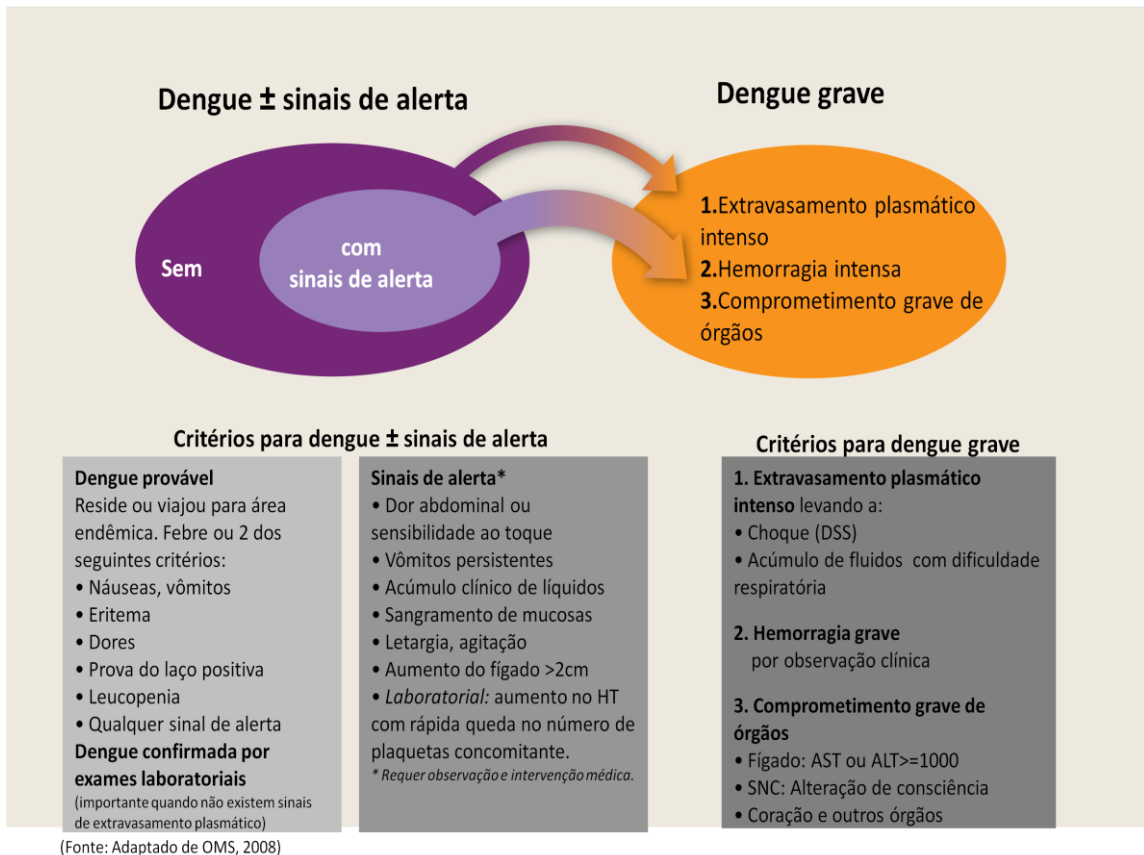


Figura 1.4: Classificação da dengue. Classificação clínica da doença e as manifestações clínicas observadas em cada grupo. Critérios estabelecidos para casos de dengue, com ou sem sinais de alerta, e dengue grave (OMS, 2009).

1.4- Imunopatogenia da dengue

Diversas características como fatores do hospedeiro, virais e epidemiológicos têm sido associados à patogênese da doença, no entanto os mecanismos envolvidos ainda não são completamente esclarecidos. Não se conhece, ao certo, os fatores determinantes para a ocorrência da forma grave da dengue.

As manifestações clínicas das infecções pelo DENV envolvem uma interação complexa entre o vírus e o hospedeiro. Muitos estudos, com relação à estrutura e biologia do DENV, têm sido feitos, incluindo os receptores virais e suas interações com as células do hospedeiro, a virulência intrínseca de determinadas cepas virais, o efeito da infecção na imunidade inata e o papel de outros fatores virais e do hospedeiro (31). Porém, a inexistência de um modelo animal que reproduza as características fisio e imunopatológicas da doença, associada ao alto grau de variação das manifestações clínicas causadas pelo vírus, dificultam a compreensão da patogenia e da gravidade da dengue. Assim, os mecanismos patogênicos causadores da forma grave da doença ainda são muito discutidos na literatura, levando à formulação de diversas hipóteses (34, 100, 101).

Existem fortes evidências, baseadas nos estudos epidemiológicos, de que uma infecção sequencial por um sorotipo diferente da infecção anterior esteja correlacionada ao risco para a forma grave da doença (102, 103). Estas evidências sugerem o envolvimento do sistema imune na gravidade e patogenia da dengue (104). Algumas teorias têm surgido, então, para explicar esse fenômeno, tais como a teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE) e a teoria do pecado antigênico original de células T (105).

Ainda segundo Halstead (1997), a aquisição passiva de anticorpos maternos, anti-dengue IgG heterotípicos, em crianças menores de um ano com infecção primária podem predispor-las ao processo de imuno-amplificação, aumentando o risco de desenvolvimento da forma mais grave da doença. Essas observações levaram à hipótese da facilitação dependente de anticorpos (ADE) (101, 106). Esta teoria procura explicar porque, em uma segunda infecção, alguns indivíduos têm maior chance de desenvolver as formas graves da dengue. Anticorpos pré-existentes reagindo cruzadamente não neutralizariam a infecção, mas facilitariam a entrada do vírus em células que possuem receptores para a porção Fc da molécula de imunoglobulina. Isso pode resultar em um aumento mais rápido na carga viral e uma maior propensão ao agravamento da doença (34, 107, 108).

Ou seja, anticorpos heterólogos desenvolvidos na infecção pelo primeiro sorotipo estariam em níveis subneutralizantes durante uma segunda infecção por outro sorotipo e se ligariam ao vírus. Esse complexo, então formado,

antígeno-anticorpo seria atraído através da ligação da porção Fc da imunoglobulina com o FcRγ de células-alvo, tais como monócitos, macrófagos e DCs, e aproximaria o vírus de seu receptor, resultando no aumento da infecção dessas células (109). Em um estudo, realizado pela Dr^a Anuja Mathew e sua equipe, envolvendo a resposta de células B durante infecções primárias e secundárias por diversos sorotipos do DENV, foi demonstrado que esse tipo de resposta celular é sorotipo-específica nas infecções primárias, e prevalentemente de reação cruzada em infecções secundárias. Além disso, tais anticorpos presentes nas infecções secundárias reconhecem a proteína E de múltiplos sorotipos de DENV e possuem maior avidéz aos epítomos heterólogos (110), gerando assim uma resposta predominantemente cruzada.

Outra hipótese de mecanismo imunopatogênico da dengue está relacionada ao fenômeno imunológico conhecido como “pecado antigênico original”. Foi proposto que linfócitos T de reatividade cruzada específicas para o sorotipo da infecção primária dominam a resposta durante uma infecção secundária heteróloga (105). Isto se deveria à presença de vários epitomos não protetores, reconhecidos pelos linfócitos B e T, que reagiriam de forma cruzada entre os diferentes sorotipos do DENV (104).

Tanto células T quanto células B de memória, quando induzidas pela exposição prévia à um sorotipo heterólogo são capazes de responder de forma mais rápida do que células “naïve” (105). Ou seja, em uma infecção primária, ocorre a ativação e expansão de células T, com alta afinidade para o sorotipo infectante, levando à formação de células T de memória para este sorotipo. No caso da segunda infecção, por outro sorotipo, estas células de memória sensibilizadas durante a infecção prévia, seriam ativadas e se expandiriam mais rapidamente do que as células virgens específicas para o novo sorotipo infectante. Porém, esses clones de células de memória teriam menor afinidade pelo sorotipo presente e, conseqüentemente, não exerceriam suas funções efetoras para eliminar o vírus. Por outro lado, teriam alta capacidade em produzir mediadores inflamatórios e poderiam, de fato, promover a imunopatologia do dengue (105).

A associação das infecções secundárias com a gravidade da dengue foi observada em muitos estudos, mas por outro lado, indivíduos que apresentam uma infecção primária também são capazes de desenvolver a

forma grave da doença. Sendo assim, apenas estas duas teorias apresentadas, não explicariam totalmente a patogenia da dengue e sugerem que outros mecanismos estejam envolvidos (111). Além da infecção secundária por um sorotipo heterólogo, explicada por estas duas teorias, outros fatores influenciam na gravidade da doença, tais como a cepa viral, idade, gênero, *status* nutricional e as características genéticas do indivíduo (53, 89, 112).

Diferenças nos sorotipos e genótipos do DENV também podem estar associados à imunopatogenia da doença (Wan, 2013). Segundo Rosen (1977), os fatores de risco para a gravidade estão relacionados com a cepa e o sorotipo do vírus envolvido (100, 113). Mas, além desses, outros fatores poderiam estar envolvidos, como a idade e a predisposição genética do indivíduo (91, 114), doenças crônicas pré-existentes, como asma brônquica, diabetes mellitus, anemia falciforme (115). Muito provavelmente, a combinação de vários desses fatores deva estar envolvida, requerendo que todos os aspectos sejam investigados exaustivamente, até que sejam totalmente elucidados. Sabe-se que os quatro sorotipos do vírus apresentam diferenças, ainda não muito bem compreendidas em sua patogenicidade e virulência, como é o caso dos sorotipos 2 e 3, que contribuem para a maior parte dos casos graves e mortalidade da dengue (35). Alguns estudos demonstram, também, que a genética do vírus infectante estaria relacionada à gravidade da infecção (116). Por possuírem muitas variações genéticas, os DENV foram classificados em grupos denominados genótipos (117). Neste sentido, existem evidências sobre diferenças no genótipo em um mesmo sorotipo viral em diferentes áreas geográficas (118). Os casos de FHD da primeira epidemia ocorrida nas Américas, em 1981, coincidiram com a entrada de um genótipo do sudeste asiático do DENV-2, possivelmente mais virulenta (119). Além disso, a introdução de uma nova linhagem do DENV-2 no Brasil, em 2008, foi associada a uma maior gravidade (22). Para tentar explicar tais diferenças nos genótipos dos sorotipos, Gubler sugere a hipótese de que os vírus DENV possam sofrer variações genômicas quando submetidos à seleção durante a replicação nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, o que poderia conferir aumento na virulência e no potencial epidêmico (10).

Uma outra teoria, conhecida como mimetismo molecular, sugere que os anticorpos de reatividade cruzada possam ser os responsáveis pela alteração

da cascata de coagulação e, conseqüentemente, pelas manifestações hemorrágicas da doença. Estudos demonstraram que a infecção pelo DENV induz a produção de auto-anticorpos contra plaquetas (120), células endoteliais (121) e moléculas envolvidas na coagulação (122), e que parecem apresentar mimetismo molecular com as proteínas virais NS1, prM e E, respectivamente. Níveis séricos de auto-anticorpos anti-plaquetários e anti-células endoteliais estão mais elevados em pacientes FHD/SCD comparados aos pacientes FD. Além disso, a imunoglobulina M (IgM), presente no soro de pacientes com FHD, parece possuir uma maior reação cruzada com plaquetas e células endoteliais comparada à imunoglobulina G (IgG). Ainda, anticorpos anti-NS1 foram considerados os principais responsáveis pela reatividade cruzada (123), sugerindo sua associação com a trombocitopenia e o extravasamento plasmático (124). Anticorpos de reatividade cruzada ao plasminogênio também poderiam ter uma relação com a hemorragia, devido a homologia entre alguns trechos do gene da proteína do envelope viral e de proteínas da coagulação humana. Com isso, o aumento da destruição de plaquetas ou a diminuição em sua produção poderia resultar na trombocitopenia (34, 125, 126).

Alguns fatores genéticos do hospedeiro também parecem estar associados aos casos graves de dengue. Certas populações humanas, assim como, certos indivíduos apresentam diferenças nos sintomas da dengue. Nos anos de 1997 e 2001, durante as epidemias que ocorreram em Cuba, foram observadas diferenças na morbidade e sintomas da doença em indivíduos de diferentes etnias (127). Foi demonstrado que pessoas da raça negra apresentam uma menor frequência em desenvolver as formas graves da doença, comparadas às pessoas da raça branca (127-129). Assim, tem sido proposto que características genéticas dos pacientes tenham importância no curso clínico da doença, contribuindo para a variação na susceptibilidade entre os indivíduos, como a presença de poliformismos genéticos (130). De fato, muitos estudos de associação têm identificado diversos genes relacionados com a infecção, como os *locus* de HLA classe I e II (131). Dentre os alelos polimórficos não-HLA, foram associados com a dengue mais grave, o receptor da vitamina D, FcRII (132), receptor celular para IgG, lectina de ligação à manose, grupo sanguíneo ABO (133), o TNF- α (fator de necrose tumoral α) (134, 135) CTLA-4 (proteína associada ao linfócito T citotóxico 4), TGF- β (fator

de transformação do crescimento β) (136), antígenos plaquetários humanos e o DC-SIGN (137). Foi observado em três coortes independentes, de hospitais da Tailândia, que uma variante do promotor do gene *DC-SIGN1-336* está envolvida na progressão da doença para a FHD (138). Ainda, foi identificado que um polimorfismo de base única do gene *CLEC5A* está relacionado com a gravidade da dengue, muito provavelmente pela sua indução de TNF (112).

Por fim, apesar de todas estas teorias buscarem explicar a gravidade da dengue, nenhuma delas sozinha parece ser a responsável pelas formas mais graves observadas nos pacientes, e dados da literatura mostram que, na realidade, a gravidade da doença deve estar associada à um conjunto de fatores, ou seja, uma causa multifatorial. Diversos fatores (sorotipo, virulência viral, idade, sexo, perfil do sistema imunológico, fatores nutricionais e genéticos do hospedeiro) poderiam interagir, definindo o curso da infecção (94, 139). Outros fatores, bem como a intensidade de transmissão viral e a circulação simultânea dos sorotipos, vêm sendo considerados como fatores de risco. Sendo assim, seria uma associação de teorias que estariam envolvidas na suscetibilidade à gravidade da doença (94).

1.4.1- Papel das citocinas e mediadores inflamatórios na dengue

O aumento significativo de vários mediadores inflamatórios solúveis, evento conhecido como “tempestade de citocinas” está presente nas formas mais graves da doença (51). Estes mediadores solúveis têm sido associados com desfechos graves da dengue, como o choque e hemorragias (51, 140). Entre eles, estão algumas citocinas inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ (Interferon γ), mas também alguns fatores anti-inflamatórios como IL-10 (Interleucina 10) e IL-13 (Interleucina 13). Citocinas pro-inflamatórias que atuam na integridade do endotélio, como TNF, IL-6 (Interleucina 6) e IFN- γ , e quimiocinas como MIF (fator inibidor da migração de macrófagos), CCL2/MCP-1 (Ligante de quimiocina 2/proteína quimioatrativa de monócitos 1) e CXCL10/IP10 (quimiocina de motivo 2/proteína induzida por Interferon gamma 10) tem sido observadas em pacientes com dengue por diversos autores (141-145) (**Figura 1.5**). Durante os últimos anos, a equipe do Laboratório de Imunologia viral e seus colaboradores tem monitorado alguns destes fatores

em pacientes adultos brasileiros, associados à gravidade (146, 147). CCL4/MIP1- β (ligante de quimiocina 4/proteína Inflamatória de macrófago β) e CXCL10/IP-10 (ligante de quimiocina de motivo 10/proteína induzida por Interferon gamma 10) foram associados com a infecção pelo DENV, em crianças (148). Citocinas como IL-1 β (Interleucina 1 β), IFN- γ , IL-4 (Interleucina 4), IL-6, IL-13, IL-7 (Interleucina 7), GM-CSF, MIF, IL-10, têm sido observadas em níveis elevados em pacientes FHD quando comparados aos pacientes FD (141, 146, 148-150). Além disso, alguns estudos demonstraram que o MIF, IL-10, IL-6, MIP-1 β e IFN- γ possuem valor no prognóstico da dengue grave (141, 146, 151).

Altos níveis circulantes de TNF- α têm sido associados com casos mais graves da doença (152) e parecem exercer um papel patológico durante a infecção (153, 154). Esta citocina foi uma das primeiras a ser descrita estar relacionada à gravidade na dengue (143, 145, 155, 156). Alguns estudos demonstraram que sua associação com a gravidade pode estar relacionada ao sorotipo infectante (146, 147) e à presença de polimorfismos no gene *CLEC5A* (112). Interleucinas (IL) IL-1 β , -4, -6, -10, -18, TGF- β (fator de transformação do crescimento β), também encontram-se elevadas em pacientes infectados com diferentes sorotipos e que apresentam manifestações clínicas graves (51). As quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3 (proteína Inflamatória de macrófago 1 α /ligante de quimiocina 3), IL-8/CXCL-8 (Interleucina 8/ligante de quimiocina de motivo 8) e IP-10/CXCL10 são mediadores inflamatórios importantes e também parecem estar associadas com a gravidade (144, 146).

Níveis plasmáticos da quimiocina MCP-1 foram associados com um importante estado clínico da dengue, a trombocitopenia. Mais ainda, níveis aumentados de MCP-1 também foram correlacionados com hipotensão (146). Tem sido demonstrado que monócitos humanos, infectados *in vitro* pelo DENV, são capazes de produzir MCP-1, bem como sua atribuição ao aumento da permeabilidade vascular, em células endoteliais (144). Recentemente, foi demonstrado, também, pela nossa equipe, que pacientes com dengue, durante infecção aguda, apresentam níveis elevados de MCP-1 (148).

IL-10 e CXCL10/IP-10 foram recentemente atribuídas à indução de extravasamento vascular e alterações na disfunção hepática, em crianças com dengue (157). Na Malásia, ambas IL-10 e IP-10 foram relatadas estarem

elevadas em pacientes adultos (158). Pacientes FHD apresentaram altos níveis de IL-10 comparados aos pacientes FD e correlacionaram com o índice de derrame pleural (149). Outros estudos, entretanto, não encontraram diferenças entre pacientes brandos e graves nas infecções pelo DENV (159). Em crianças que progrediram para a SCD, foi demonstrado que níveis séricos de IL-10 estavam mais elevados, na fase de defervescência (140). Sendo assim, além de citocinas pró-inflamatórias, algumas citocinas imunorreguladoras também parecem ter um papel importante na gravidade da dengue.

A presença de citocinas inflamatórias na circulação sanguínea tem sido correlacionada com a permeabilidade vascular, apesar de ainda não estar esclarecido como o extravasamento plasmático ocorre. Citocinas pró-inflamatórias como MIF, MCP-1, IL-8 e HMGB-1 (proteína de grupo de alta mobilidade 1) são capazes de romper as junções oclusivas e causar a degradação do glicocálix, participando da hiperpermeabilidade vascular (160). A presença de altos níveis de TNF- α em amostras de soro de pacientes na fase aguda também parece estar relacionada com a ativação de células da microvasculatura, causando sua apoptose (161). Dentre os mediadores solúveis envolvidos no aumento da permeabilidade associados ao DENV, em células endoteliais primárias, podemos mencionar: TNF- α , IL-6, CXCL8/IL-8, IL-10, IL-12 (Interleucina 12), MIF, HMGB1, CCL2/MCP-1 e metaloproteinases de matriz (162). A proteína não-estrutural do DENV, a NS1 secretada, em conjunto com anticorpos anti-NS1 e ativação do Sistema Complemento também parecem estar envolvidos na alteração da permeabilidade vascular induzida pelo DENV (50).

Por outro lado, alguns estudos apresentam divergências em seus resultados relacionados ao papel destes mediadores na dengue, como o caso da associação do IFN- γ com casos graves de dengue (146, 163). Esta citocina parece também exercer um papel protetor, sendo essencial para o controle da replicação do vírus e resistência à infecção (164, 165). A produção de IFN- γ é essencial na resposta antiviral de camundongos infectados pelo DENV-2, através de um mecanismo relacionado ao controle da óxido nítrico sintetase 2 (nitric oxide sintase-NOS), a qual medeia a produção do óxido nítrico, importante inibidor da replicação viral (164, 165). Além disso, o aumento da produção de IFN- γ foi correlacionado à altas taxas de sobrevivência em

pacientes FHD (141), corroborando a idéia de que esta citocina seria essencial para o controle da replicação e resistência à infecção pelo DENV (152).

Além do IFN- γ , outra citocina da família dos Interferons parece possuir um importante papel protetor na dengue, o IFN- α (Interferon α). Interferons do tipo 1 (IFN- α/β) tem um papel significativo no estabelecimento da proteção contra infecções virais (166). A infecção pelo DENV, *in vitro*, ativa uma robusta resposta de IFN- α/β . Entretanto, proteínas virais, tal como a proteína não-estrutural NS4B, pode inibir a sinalização do IFN, regulando negativamente a via do JAK/STAT (Janus kinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição), prejudicando a regulação da expressão gênica deste Interferon antiviral (57, 167, 168). Porém, o papel desempenhado pela resposta do IFN tipo 1 em pacientes com dengue não é totalmente compreendido. IFN- α em excesso pode induzir doenças autoimunes, por exemplo, no tratamento da hepatite (169). Os níveis de IFN- α estão significativamente mais elevados em pacientes FD comparados aos pacientes FHD, independente do sorotipo infectante ser o DENV-1 ou -2. Nas infecções pelo DENV-2, altos níveis desta citocina foram encontrados durante infecções primárias. Esses dados sugerem que uma forte resposta de Interferon está correlacionada com uma melhor condição clínica (170).

Outro mediador inflamatório de grande importância na dengue é o óxido nítrico (NO), um importante mediador parácrino e autócrino usado por diferentes tipos celulares e produzido por uma variedade de células no corpo, por exemplo, macrófagos, células endoteliais vasculares, células de Kupffer (171). O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor, possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio e um elétron desemparelhado (172). Ele apresenta uma variedade de funções desde dilatação de vasos sanguíneos, agregação de plaquetas, combate à infecções e tumores, mediador de inflamação, entre outras (173-175).

Em níveis ótimos, o NO possui ação protetora e reguladora nas células, porém, em altos níveis, possui efeitos tóxicos. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) e deficiência do sistema antioxidante (172). As espécies reativas do oxigênio são moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. São geradas

em grande quantidade durante o estresse oxidativo (176). Por outro lado, os antioxidantes são moléculas que agem para depletar ROS, inibindo suas vias geradoras ou eliminando diretamente ROS, e interferindo nas suas vias de degradação. Antioxidantes comuns são os eliminadores de ROS, inibidores da enzima NADPH-oxidase (NOX2), inibidores de diversas vias geradoras de ROS, e ativadores do fator nuclear eritróide 2- relacionado ao fator 2 (NRF2), uma classe de compostos que induzem a expressão de enzimas antioxidantes, classificados como antioxidantes indiretos. A produção de ROS é geralmente neutralizada pelas defesas antioxidantes constitutivas. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ROS ultrapassa a defesa antioxidante. Quando um microorganismo é reconhecido e fagocitado por um fagócito, desencadeia um processo, chamado “explosão respiratória”, onde fagócitos aumentam seu consumo de oxigênio. A enzima NOX2 é essencial para a “explosão respiratória” e liga-se à membrana fagosomal durante a fagocitose (177). ROS derivadas de NOX2 são capazes de promover mecanismos oxidativos e não oxidativos de eliminação de microorganismos (178).

A síntese da molécula de NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (173, 179). O NO, produzido em resposta à ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, causando a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. Sua citotoxicidade é decorrente de sua ação direta ou reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório (173, 180). Durante os processos infecciosos, NO e ROS são secretados por células ativadas, como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. A formação de peroxinitrito (ONOO⁻), um poderoso oxidante de proteínas, resulta da ação tóxica cooperativa de NO com o ânion superóxido (O₂⁻). Tanto a célula produtora de NO quanto sua vizinhança podem ser destruídas pela toxicidade dessa molécula (172).

A determinação laboratorial do NO é complexa, devido à ínfima concentração e sua meia vida extremamente curta, de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos (2, 29). Por este motivo, é comum a

avaliação indireta deste composto, através da dosagem plasmática, por exemplo, de nitrato e nitrito (produtos da reação do NO com o oxigênio) (172).

Como foi dito anteriormente, o NO, produzido por fagócitos mononucleares auxilia na defesa anti-microbiana. Ele demonstra atividade antiviral contra vírus tanto de DNA como de RNA por mecanismos como inibição da síntese do genoma viral, nitrosilação de proteínas virais e promoção de eliminação viral por células do hospedeiro (181). Na dengue, diversos trabalhos têm demonstrado um importante papel antiviral desta molécula frente à infecção por diferentes sorotipos do DENV, relacionando sua produção à diminuição do RNA viral em diferentes modelos de infecção (182, 183). Diversos estudos avaliam a produção de NO em pacientes com dengue. Levy e colaboradores (2010) demonstraram que tanto pacientes com FD quanto pacientes com FHD apresentaram níveis elevados de NO, detectado pela dosagem de nitritos, estando o teor de nitrito aumentado em pacientes com FD.

A associação do aumento dos níveis de NO com manifestações brandas da doença, em infecções *in vivo*, sugerem um papel protetor do NO (184). O aumento nos níveis de NO também foi observado em sobrenadante de cultura de monócitos infectados, demonstrando que NO está envolvido na infecção pelo DENV e que os monócitos podem ser uma importante fonte de sua produção (184). A infecção de células THP-1 (linhagem monocítica) com isolados clínicos de baixa passagem também estimula a produção de NO, que está relacionada à diminuição do número de cópias do RNA viral detectado (182). O doador de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), demonstrou um efeito inibidor no acúmulo do RNA viral após a infecção. Além disso, a atividade da replicase viral isolada de células LLCMK-2 infectadas e tratadas com SNAP foi suprimida quando comparada ao controle negativo de células tratadas com N-acetil-DL-penicilamina (NAP). Ainda nesse mesmo estudo, a investigação do alvo molecular da ação do NO revelou que a atividade da NS5 recombinante do DENV-2 na síntese da fita negativa do RNA foi afetada na presença do SNAP, em ensaios *in vitro* envolvendo RNA polimerase - dependente de RNA (RdRp) (183). De acordo com estes estudos, o papel do NO na infecção pelo DENV parece estar relacionado à proteção do hospedeiro, estimulando uma resposta antiviral e colaborando para o controle da infecção.

1.5- Óxido nítrico sintase induzida (iNOS)

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) contribui para a transmissão do sinal em diferentes sistemas celulares do corpo, via síntese de NO a partir da L-arginina, na presença de NADPH e dióxigênio (O₂) (185). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos. Estas isoformas são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca⁺⁺) e de calmodulina, envolvida na sinalização celular, e a NOS induzida (iNOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (173, 186) (**Figura 1.6**). A isoforma constitutiva compreende ainda a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios (187, 188), e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente normalmente em células endoteliais vasculares (173) e plaquetas (189).

A iNOS não é expressa sob condições normais, sendo induzida por citocinas e/ou endotoxinas em diversos tipos celulares, como os macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (173). Esta isoforma necessita de algumas horas para ser expressa, porém, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO em comparação à c-NOS (190). Embora IFN- γ e LPS sejam os exemplos protótipos, novos reguladores continuam a ser descobertos. Macrófagos e células dendríticas estimuladas com IL-12 levam à produção de altos níveis e expressão intracelular de IFN- γ , o qual, por sua vez, induz iNOS. A produção de IFN- γ induzida por IL-12 é dependente de STAT-4, embora os mecanismos moleculares que regulam a transcrição do gene codificante de IFN- γ ainda é desconhecido (191). Outras citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α tem sua produção aumentada pela presença de IFN- γ , agindo como um sinal autócrino para aumentar a produção de NO mediada por IFN- γ (192). O fator nuclear- κ B (NF- κ B), um fator de transcrição bem conhecido, participa na regulação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo iNOS. NF- κ B pode ser ativado por diversas vias de sinalização diferentes, incluindo sinalização mediada por receptor, dos receptores de reconhecimento padrão, como os TLRs (193), e vias indutoras de ROS (194). Vias que resultam na indução da expressão de iNOS podem variar em diferentes células ou espécies diferentes.

A ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e STAT-1 α , e, desse modo, a ativação do promotor iNOS, parece ser um passo essencial para a indução de iNOS na maior parte das células (195).

A indução de iNOS geralmente ocorre em um ambiente oxidativo, e com isso, altos níveis de NO tem a oportunidade de reagir com o superóxido, levando à formação de peroxinitrito e toxicidade celular. Tais propriedades podem definir o papel da iNOS na imunidade do hospedeiro, permitindo sua participação nas atividades anti-microbianas e anti-tumorais como parte da “explosão” oxidativa dos macrófagos (196).

Análogos da arginina N-substituídos, como a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitro- L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-Name) são capazes de inibir todas as isoformas de NOS. Eles competem com a L-arginina e atuam como inibidores estereoespecíficos da NOS (173, 197). Além destes inibidores, a aminoguanidina também é capaz de inibir a NOS, demonstrando uma relativa seletividade para a iNOS (198). Vários destes inibidores têm sido utilizados, tanto em células isoladas como *in vivo*, em estudos sobre a função do NO.

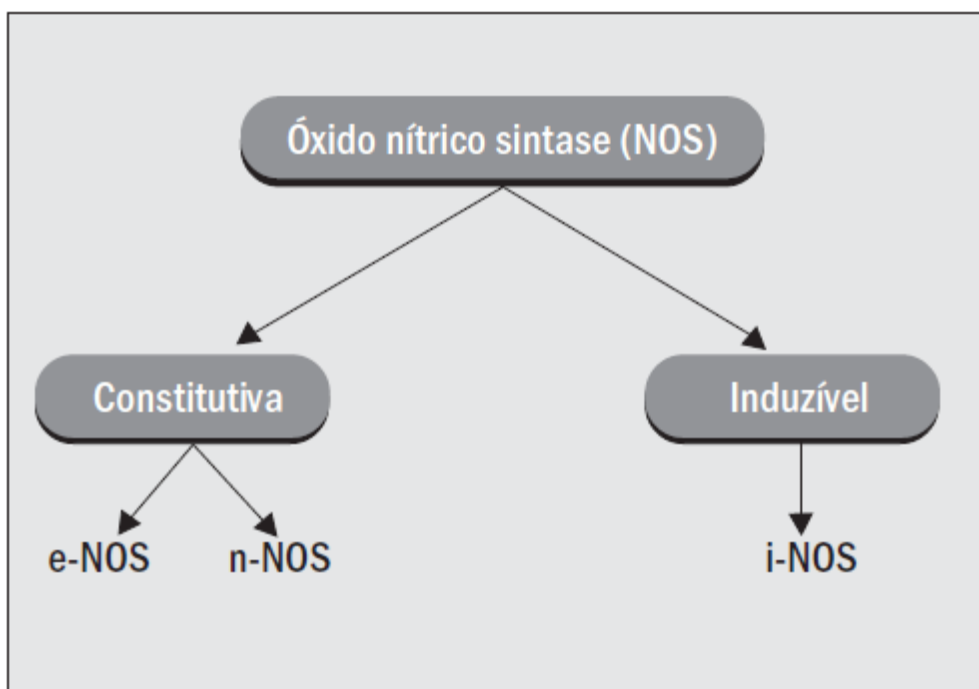


Figura 1.6: Isoformas da NO Sintase. A óxido nítrico sintase pode ser dividida em duas categorias, a constitutiva ou a Induzível. Dentre a NOS constitutiva estão a óxido nítrico sintase endotelial, presente em células endoteliais vasculares e plaquetas (e-NOS) e a óxido nítrico sintase neuronal (n-NOS), presente nos neurônios. A categoria Induzível compreende apenas a óxido nítrico sintase induzida (i-NOS), ativada por citocinas e produzida por diversos tipos celulares (Dusse, 2003).

Também já foi observada a presença de iNOS em subpopulações de monócitos, em diferentes tipos de infecções e tratamentos. Subpopulações de monócitos humanos, isolados de culturas de células mononucleares ou obtidos recentemente de pacientes com esclerose múltipla, doença de Graves ou pênfigo vulgar foram estudados quanto à expressão de iNOS. Monócitos CD14(+ / ++)CD16(+) expressaram altos níveis de RNAm de iNOS (199). Ainda, monócitos CD14+ / CD16+, estimulados com células tumorais demonstraram um aumento na expressão de iNOS e produção de NO (200).

1.5.1- O papel da iNOS na dengue

A óxido nítrico sintase 2 (NOS2) revelou estar envolvida na produção de IFN- γ , colaborando na resposta antiviral do hospedeiro contra o DENV-2, em camundongos. Esta citocina é fundamental no controle da enzima NOS, a qual, por sua vez, medeia a produção de óxido nítrico, molécula inibidora da replicação viral (164, 165). Na dengue, foi também observado que monócitos infectados *in vitro* pelo DENV-1, apresentaram expressão da enzima iNOS, em uma relação inversa à expressão do antígeno viral. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que monócitos de pacientes com dengue apresentavam expressão de iNOS, comparados à doadores saudáveis (63). Estudos demonstraram também que a infecção de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (Mo-DC) pelo DENV-2 medeia a sinalização de iNOS e a produção das vias de NOS e ROS (201). Mais recentemente, foi demonstrado que as células da linhagem murina, RAW264.7, infectadas pelo DENV, tiveram um aumento transcricional e pós-translação na iNOS, acompanhado pela produção de NO. O estudo observou que a inibição farmacológica de NF- κ B e também a inibição de TLR3 aboliram efetivamente a biosíntese de iNOS/NO (202).

1.6- Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)

A Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima amplamente distribuída nos tecidos e células de mamíferos. É uma oxigenase, ou seja, cataliza a incorporação de uma molécula de oxigênio (O_2) ao substrato, sendo cruciais para o metabolismo e síntese de diversas substâncias biológicas (203). A IDO é uma proteína monomérica e citoplasmática, contém um grupamento heme, sendo codificada pelo gene *INDO* (204). Possui um papel importante no catabolismo do aminoácido essencial, triptofano, gerando metabólitos chamados, em conjunto de quinureninas. Esta enzima é o fator limitante da reação, uma vez que participa da primeira etapa da degradação do triptofano (205). O triptofano é importante para a biossíntese de proteínas, serotonina, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e o ácido nicotínico (vitamina PP). Em sua ausência, há uma interrupção do ciclo celular na fase G1, sendo a via das quinureninas a principal rota de sua degradação (206). As reações enzimáticas se desencadeiam a partir de triptofano por meio de uma série de etapas, sendo que alguns dos intermediários chaves do metabolismo são: quinurenina, 3-hidroxi-antranilato indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e quinolinato, sendo o produto final da reação, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (207-209) **(Figura 1.7)**. A IDO encontra-se cataliticamente não ativa e sob a forma férrica (Fe^{+3}), sendo, portanto, necessário um agente redutor para sua forma ferrosa (Fe^{+2}), cataliticamente ativa (210).

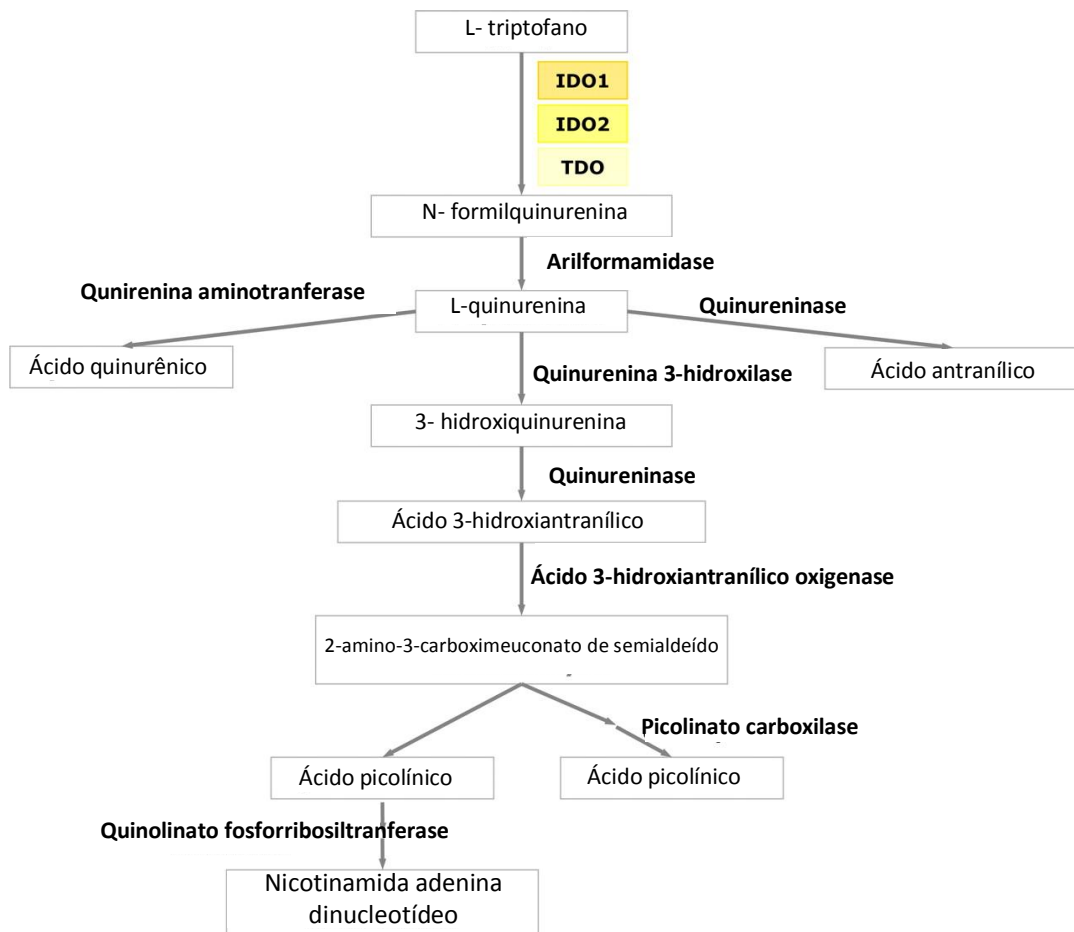


Figura 1.7: Via da quinurenina no metabolismo do triptofano. O início da via se dá pela TDO, no fígado, ou pela IDO, nos tecidos extra hepáticos. O triptofano é degradado pela IDO em N-formil-quinurenina, a qual é convertida em quinurenina. Esta, por sua vez, pode ser metabolizada e gerar diversos metabólitos com diferentes funções. O produto final da via é a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (Adaptado de Curti, 2008).

Foi descrito recentemente, uma proteína homóloga à IDO, conhecida como IDO2, também importante para a primeira etapa do catabolismo do triptofano (211-213). Ainda não se sabe muito bem a respeito de suas atividades biológicas, porém, devido à sua expressão no rim, aparelho reprodutor e células dendríticas, sugere-se que tenha um papel na função renal, fertilidade e imunomodulação (214).

A IDO é expressa em diversos tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, astrócitos, fibroblastos e células endoteliais, além de órgãos como intestino, pulmão, cérebro, baço e pâncreas (215). Porém, as células apresentadoras de antígenos são as que apresentam uma maior expressão desta enzima, o que a coloca na vanguarda da resposta imune (216). A IDO pode ser induzida pelo IFN- γ em células como os monócitos (217, 218), sendo

esta a principal citocina responsável por essa indução. Porém, outras citocinas como IFN- α e β também são capazes de induzir a expressão de IDO, com menos eficácia (219). O IFN- γ , em combinação com outros fatores, como TNF- α , IL-1 e LPS também são indutores da expressão de IDO, *in vitro* (220, 221). Por outro lado, estudos *in vivo*, demonstram que a resposta do LPS não depende do IFN- γ , e sim, essencialmente, do TNF, sugerindo a existência de uma via independente do IFN- γ , para indução desta enzima (216). Em células dendríticas, foi observado que a molécula CTLA-4 é capaz de induzir IDO, dependente ou independentemente de NF- κ B (216). Demais moléculas, como IL-4, IL-10, IL-6, TGF- β , PGE₂ (prostaglandina E2), CD40, entre outros, modulam a expressão de IDO de acordo com o tipo celular e citocinas presentes no meio (222). Vírus e patógenos intracelulares também possuem a capacidade de induzir IDO, através da sinalização via TLRs pela interação com CTLA4-B7 (223). Os fatores de transcrição que medeiam sua expressão são o STAT-1 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 1) e IRF-1 (fator regulador de Interferon 1) (216). Estudos com camundongos knockout para IRF1 (IRF-1^{-/-}) e IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}) demonstraram que estes foram altamente susceptíveis a infecção aguda por *T. gondii* e houve a completa abolição da degradação do triptofano nestes animais (224). É ainda bastante conhecida a sua atividade imunossupressora, principalmente, no que se refere às funções dos linfócitos T (225). Em outras doenças, como na hanseníase, já foi descrito o papel imunossupressor da IDO em linfócitos pela inibição de proliferação linfocitária e expressão de receptores do tipo CTLA-4 (226-228). Além disso, a ativação da IDO em resposta a uma outra infecção, pelo vírus Epstein-Barr (EBV), em macrófagos derivados de monócitos humanos (MDMs) suprimiu a proliferação de células T e comprometeu a atividade citotóxica de células T CD8 (229). Recentemente, foi observado que pacientes com a síndrome primária de Sjögren, positivos para IFN tipo I, apresentam níveis elevados da atividade de IDO, bem como percentuais de células T reguladoras (Treg) com uma correlação positiva entre eles (230).

A depleção de triptofano por IDO impede a proliferação de células T, o que, em conjunto com a atividade pró-apoptótica de quinurenina, diminui as respostas imunes mediadas por células T e o subsequente desenvolvimento de tolerância (231-233). Além disso, DCregs expressando IDO foram capazes de

induzir células Treg *in vivo* e células Treg expressando o receptor de glicocorticóide induzido por TNF (GITR- receptor de glicocorticóide induzido por TNF), que por sua vez utiliza as DCs IDO+ para expandir sua própria população em um *loop* de *feedback* positivo (234, 235).

A ação da IDO pode ser inibida por diversas moléculas naturais ou sintéticas. Tais inibidores podem bloquear o sítio de ligação do triptofano na enzima, chamados de inibidores competitivos, ou inibirem a interação do oxigênio e bloqueio do ciclo catalítico da IDO, chamados de inibidores não competitivos (204). O 1 metil-triptofano (1-MT) e a β -carbolina são os principais inibidores desta enzima. Ainda, foi demonstrado que um extrato de invertebrados marinhos pode ser um forte inibidor de IDO, quando em concentrações sub-micromolares (236, 237). A molécula de NO, por sua vez, também vem sendo descrita como um inibidor em potencial, dependendo de sua concentração (238). Estudos demonstraram que o NO causa um efeito bimodal na função de IDO, em células estimuladas por IFN- γ , onde altas concentrações de doadores de NO são capazes de reduzir a atividade de IDO, enquanto baixas concentrações destes doadores aumentaram a atividade desta enzima. Ainda, os inibidores de NOS, L-NMMA, aminoguanidina, e o antagonista de calmodulina W7, também são capazes de reduzir a atividade de IDO (239). Dessa forma, nota-se uma regulação de IDO pela produção da molécula de NO.

A presença de IDO em monócitos do sangue periférico e sua relação com as diferentes subpopulações de monócitos já foram previamente descritas em alguns trabalhos envolvendo outras doenças. Em um estudo com pacientes que realizaram transplante de rins e receberam tratamento com belatacept, foi observado um aumento considerável no percentual de IDO, em monócitos CD16+ (240). Além disso, a infecção pelo EBV foi capaz de induzir o RNAm, a proteína e a ação enzimática de IDO, em macrófagos derivados de monócitos humanos (MDMs) (229). Em monócitos circulantes de pacientes IFN tipo I-positivos com a síndrome primária de Sjögren, a expressão do RNAm de IDO1, em monócitos CD14+, foi regulada positivamente e correlacionada com a expressão gênica de IFN tipo 1 (230).

1.6.1- O papel da IDO na dengue

Na dengue, estudos investigaram a presença de IDO em soro de pacientes e foi observada a diminuição da taxa triptofano/quinurenina, indicando o catabolismo do triptofano pela atividade de IDO, quando comparados com outras doenças febris agudas. Também foi detectado mRNA da IDO em células dendríticas infectadas *in vitro*. Ainda nesse estudo, foi observada uma possível ação antiviral da IDO, dependente da ação do IFN- γ . Todavia, os experimentos de determinação de carga viral são muito preliminares, sem estatística e reprodução (241). Outro estudo demonstrando possíveis biomarcadores para o prognóstico de dengue grave não encontraram diferenças estatisticamente significantes nos níveis de IDO entre pacientes com dengue grave e casos não complicados (242).

Como citado anteriormente, a IDO é uma enzima presente em diversos tipos celulares, tendo sido detectada, em diferentes modelos, na população de monócitos. Porém, esta é a primeira vez que a indução de IDO é observada em monócitos humanos infectados pelo vírus da Dengue.

1.7- Monócitos

Os monócitos fazem parte do sistema fagocítico mononuclear e possuem origem mieloide. Apresentam-se, no sangue, como uma população heterogênea, variando em sua granulosidade, morfologia nuclear e tamanho celular. Os monócitos originam células especializadas, como as células dendríticas, osteoclastos e a maior parte dos macrófagos tissulares. A heterogeneidade das populações de macrófagos originadas reflete as diversas especializações adotadas por essas células nos tecidos, onde o microambiente tissular influencia o fenótipo dos macrófagos residentes (243). O monócito formado permanece na medula, por pouco tempo, menos que 24h. Ao ingressar na circulação, expressa na superfície celular proteínas heterodímeras das subclasses B1 e B2 da superfamília das integrinas das moléculas de adesão, incluindo antígeno associado à função linfocitária, C3 e antígeno de ativação tardia, que medeiam a ligação com os respectivos ligantes expressos nas células endoteliais, promovendo a adesão dos monócitos à superfície do endotélio. Ocorre então, o espalhamento dos monócitos na superfície das

células endoteliais, migração transendotelial entre duas células endoteliais adjacentes e passagem dos monócitos para o tecido e cavidades do corpo, onde passam a se chamar macrófagos do exsudato (243).

Na dengue, os monócitos são importantes células-alvo do vírus e, durante a infecção, são ativados e capazes de produzir uma série de citocinas e mediadores inflamatórios, responsáveis pela gravidade/proteção da doença. (62, 244, 245). Porém, a função de subpopulações específicas de monócitos permanecem indefinidas.

1.7.1- Subpopulações de monócitos

No sangue periférico, a população de monócitos humanos pode ser dividida em dois subtipos, de acordo com a expressão de CD14 e CD16 (246, 247). O CD14 é um co-receptor do TLR4 (receptor tipo *Toll* 4) um receptor de lipopolissacarídeo (LPS) de algumas bactérias Gram negativas, enquanto o CD16 é um receptor de baixa afinidade para a imunoglobulina G (FcγRIII) (246, 248). Os chamados monócitos clássicos são populações de células CD14+ CD16-, os quais expressam receptor de quimiocina CCR2. Já as populações CD14+ CD16+, se assemelham a macrófagos tissulares maduros (**Figura 1.8**). Também foi descrita uma população CD14+ CD16+ CD64+, em que as células apresentam características típicas de monócitos e células dendríticas, com alta expressão de CD86 e moléculas MHC (complexo de Histocompatibilidade Principal) classe II (243).

Em condições fisiológicas saudáveis, a maior parte da população de monócitos total é composta pelos chamados monócitos clássicos, CD16-, que correspondem a 90%, enquanto os 10% restantes correspondem à população conhecida como monócitos não-clássicos, CD16+. Durante diversas condições inflamatórias e infecciosas, monócitos CD16+ encontram-se elevados e têm sido propostos por desempenhar papéis pró-inflamatórios (249). Além disso, monócitos/macrófagos podem produzir diversas citocinas e quimiocinas que comprometem a integridade da camada de células endoteliais, possivelmente levando ao extravasamento vascular (89, 250-253), principal característica da gravidade da doença. Esta última população produz mais citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , enquanto a população CD16- está predisposta a produzir IL-10 (254, 255). Em condições de doença, estes dois subtipos de

monócitos são conhecidos por exercerem diferentes papéis. As subpopulações de monócitos podem produzir diferentes citocinas, mostrando um perfil mais ou menos inflamatório. Estas células têm demonstrado exibir fenótipos e funções distintas (246, 248). Sendo assim, em condições fisiológicas podem ser detectadas três subpopulações de monócitos no sangue periférico humano: os clássicos (CD14^{hi}CD16⁻), os intermediários (CD14^{high}CD16⁺) e os não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) (256).

Monócitos clássicos são fortemente positivos para a molécula de superfície celular, CD14 (CD14⁺CD16⁻), enquanto a subpopulação CD14⁺CD16⁺ co-expressa CD16 e baixos níveis de CD14. Células CD14⁺CD16⁺ são um tipo único de monócito, porém, alguns possuem uma baixa ou alta intensidade de expressão de CD14 e são frequentemente chamadas de CD14^{low}CD16⁺ e CD14^{high}CD16⁺, respectivamente, sendo bem caracterizadas no sangue periférico. As células CD14^{low}CD16⁺ têm sido descritas como pró-inflamatórias, produzindo níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, aumento da expressão do antígeno leucocitário humano (HLA) - DR e poucas citocinas anti-inflamatórias (257). A população de células CD14^{high}CD16⁺ parece aumentar em paralelo com a CD14^{low}CD16⁺, durante o curso da sepse e foram as principais produtoras de IL-10, demonstrando um padrão anti-inflamatório (248). Foi proposto que a nomeação destas subpopulações de monócitos seja feita apenas de acordo com os marcadores de membrana e não por suas atividades pró ou anti-inflamatórias, devido à possíveis alterações nestas subpopulações, durante os processos inflamatórios (256).

Na dengue, em pacientes infectados, foi observado um aumento no número de monócitos CD14⁽⁺⁾CD16⁽⁺⁾ ativados. Uma outra população, descrita como CD14^(high)CD16⁽⁺⁾ encontra-se aumentada em pacientes brandos, fato não observado em pacientes graves. Além disso, níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ e IL-18 foram inversamente associados com esta subpopulação monocítica (258). Um outro estudo revelou que ambos os subtipos de monócitos, CD16⁻ e CD16⁺, são igualmente suscetíveis ao DENV-2 e capazes de suportar a produção inicial de novas partículas infecciosas. Fatores antivirais, tais como IFN- α , TRAIL e CXCL-10 também foram produzidos por ambas subpopulações. Entretanto, monócitos CD16⁺ foram os

principais produtores de citocinas e quimiocinas inflamatórias em resposta ao vírus dengue, incluindo IL- 1 β , TNF- α , IL-6, CCL-2, 3 e 4 (259). A população monocítica, em geral, está envolvida na produção de diversos fatores durante a infecção pelo vírus dengue, participando, portanto, em diferentes mecanismos imunes no decorrer da infecção. Dentre eles, a apoptose aumentada destas células também já foi observada em cultura de monócitos humanos infectados pelo DENV-2 (244).

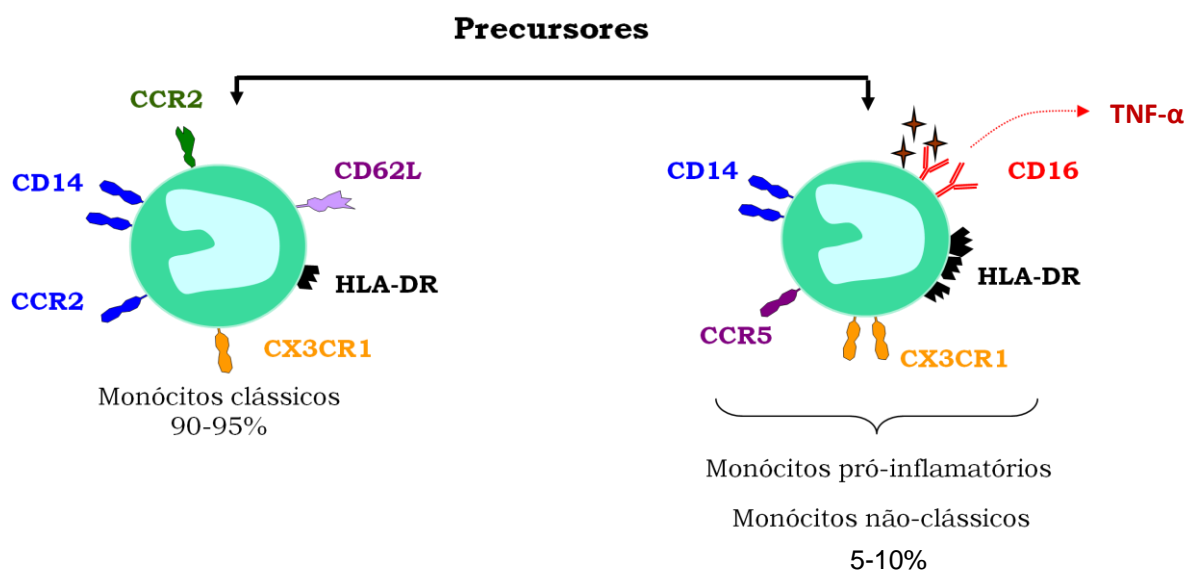


Figura 1.8: Subpopulações de monócitos humanos. A maior parte da população total de monócitos (90-95%) é conhecida como monócitos clássicos, e apresentam alguns marcadores de superfície como CCR2 e CD62L. Já a outra parcela da população (5-10%) compreende os chamados monócitos não-clássicos. Além de possuírem receptores de superfície como CCR5 e o CD16, estes também são conhecidos como pró-inflamatórios, por serem os principais produtores de TNF- α (Adaptado de Torrentes-Carvalho, 2009).

1.8- Justificativa

O presente trabalho justifica-se pela necessidade de se estudar as subpopulações de monócitos durante a infecção pelo DENV e sua associação com as enzimas iNOS e IDO. Consideramos que uma avaliação da frequência de células positivas para estas enzimas, além de uma possível correlação com citocinas e mediadores inflamatórios produzidos durante a infecção, além da carga viral, nos forneça informações importantes e ajude a compreender o papel destas subpopulações na dengue, bem como a função de iNOS e IDO. Esperamos, com isso, contribuir para o entendimento da resposta imunológica frente ao DENV e conseqüentemente, auxiliar nas futuras estratégias de controle da gravidade da doença.

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral:

Caracterizar subpopulações de monócitos durante a infecção pelo DENV com ênfase na expressão deIDO e iNOS, correlacionando com a carga viral e produção de mediadores inflamatórios.

2.2- Objetivos específicos:

1- Caracterizar os parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes infectados com DENV-4, além da produção de mediadores inflamatórios;

2- Caracterizar em PBMCs de pacientes na fase aguda e doadores saudáveis infectados com DENV-2, subpopulações de monócitos CD14+CD16+/- e positivas para IDO, iNOS e o antígeno (Ag) viral;

3- Associar a detecção de IDO, iNOS e do Ag DENV, em monócitos de pacientes e doadores saudáveis infectados, com a expressão de outros marcadores já conhecidos (CD14 e CD16) e com a detecção de fatores circulantes, tais como citocinas/quimiocinas e outros mediadores inflamatórios;

4- Associar as diferentes subpopulações de monócitos com a carga viral;

5- Caracterizar a infecção pelo DENV-2 concentrado, em monócitos de doadores saudáveis infectados *in vitro*;

6- Avaliar o efeito do tratamento com um indutor de IDO (LPS+IFN- γ) e um inibidor (L-NMMA) e doador de NO (SNAP) em subpopulações de monócitos CD14+CD16+/- e positivas para IDO, iNOS e o Ag viral, de doadores saudáveis infectadas *in vitro* pelo DENV-2, e na produção de mediadores inflamatórios;

3- Metodologia

3.1- Coleta das amostras e diagnóstico laboratorial dos pacientes

O estudo foi realizado em Campo Grande, MS, Brasil, durante uma epidemia de DENV-4, ocorrida em 2013. Os pacientes foram atendidos no Hospital Professora Hesterina Corsini Dia, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, durante os meses de fevereiro a abril, em colaboração com o Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha. As amostras foram coletadas durante a fase aguda da doença e dados do histórico e exames clínicos detalhados dos pacientes foram registrados imediatamente após a admissão. Casos incluídos durante o estudo foram submetidos à investigação. O sangue dos pacientes foram coletados para a contagem de plaquetas, percentual de hematócrito, contagem de células (leucócitos, linfócitos, monócitos), bem como dosagem das enzimas hepáticas AST/TGO e ALT/TGP. Para os pacientes internados ou que retornaram posteriormente ao hospital, foram utilizados nas análises, os valores máximos de detecção das enzimas AST e ALT e os valores mínimos das contagens de plaquetas, avaliados em diferentes dias de coleta. Todos estes exames foram realizados nas instalações do hospital onde os pacientes foram atendidos. As amostras de plasma e de soro foram separadas em alíquotas e armazenadas a -70 ° C, para a quantificação de mediadores solúveis. Os dados dos exames laboratoriais de todos os pacientes foram obtidos nos hospitais em que os mesmos foram tratados. Não foram utilizados critérios de exclusão para pacientes que apresentavam comorbidades, tais como obesidade, depressão, diarreia crônica, entre outras. Todos os pacientes incluídos no estudo apresentaram diagnóstico de dengue confirmado por um dos testes citados a seguir.

Para o diagnóstico dos casos suspeitos de dengue foi realizado o teste de captura de IgM (Panbio vírus da dengue IgM ELISA de captura, Alere, Austrália); detecção do antígeno NS1, pelo kit Platelia™ Dengue NS1 Ag (Biorad Laboratories), e o diagnóstico molecular, por RT-PCR. Após a confirmação do diagnóstico, os pacientes foram classificados de acordo com os sintomas clínicos e agrupados conforme a nova classificação clínica definida pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009) em: dengue sem sinais de alerta (FD sem SA), dengue com sinais de alerta (FD com SA) ou dengue

grave (Grave). Para este estudo, foram utilizados 25 pacientes que apresentaram sintomas relacionados à dengue sem sinais de alerta, 10 pacientes classificados como FD com sinais de alerta e nenhum paciente grave incluído. Cerca de dez indivíduos foram incluídos no estudo como doadores saudáveis, considerando que eles não tinham apresentado episódios de febre por mais de 3 meses ou histórico de outras doenças.

3.2- Cultura de células C6/36

A linhagem celular C6/36, da glândula salivar do mosquito *Aedes albopictus* foi utilizada para a produção da massa viral. As células foram cultivadas à 28°C em garrafas de cultura de 75cm², em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 2mM de L-glutamina, 0,5% de aminoácidos não essenciais e 10% de triptose fosfato.

3.3- Produção do estoque viral

Para obtenção da massa viral as células C6/36 foram infectadas com um inóculo de 1,5mL do DENV-2 cepa 16681(1,37x10⁸ TCID₅₀/mL) por 90min para a adsorção viral. Após esse período, o inóculo viral foi removido e as células mantidas a 28°C em 30mL de DMEM contendo 2% de SFB. No 7º dia, os sobrenadantes das culturas foram clarificados por centrifugação a 1000g/5 min, seguido de ultracentrifugação a 100000g por 1h. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” contendo as partículas virais foi ressuspenso em 1,5mL de meio RPMI, contendo 10% de SFB, e filtrados em membrana de 0,22µm (260). As alíquotas dos vírus foram, então, estocadas a -70°C para conservação do título viral.

3.4- Titulação viral por imunofluorescência indireta

As células da linhagem C6/36 (cerca de 5x10⁵/poço em placa de 96 poços) foram infectadas com 100 µL/poço do estoque viral produzido, em diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻¹¹. Após incubação a 28°C por 90 min, o inóculo viral foi retirado e foram adicionados 200µL de DMEM contendo 5% de SFB, seguido de incubação por sete dias a 28°C. Após este período, as células infectadas foram transferidas para lâminas de vidro, fixadas com acetona P.A. por 20 min a 4°C para realização da marcação do DENV por

imunofluorescência indireta. As células foram, inicialmente, incubadas com o anticorpo primário IgG de camundongo anti-DENV complex (Millipore) diluído na concentração final de 1:10 em PBS contendo 1% BSA (albumina bovina sérica) por 60min a 37°C, em câmara úmida. Após duas lavagens de 10 min, com PBS, à TA, foi adicionado o anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) diluído na concentração final de 1:100 em PBS contendo 1% BSA, seguido de incubação por 30min a 37°C, em câmara úmida. Após nova sequência de duas lavagens com PBS por 10min à TA, as lâminas foram marcadas com DAPI por 5min e lavadas 2 vezes com PBS por 10min. Finalmente, as lâminas foram montadas em glicerol e observadas no microscópio de fluorescência Evos®. O cálculo do título viral foi feito com base na fórmula de Reed & Muench. Para o estoque viral produzido e utilizado neste estudo, o título viral obtido foi de 3×10^{10} TCID₅₀/mL (do inglês: *50% tissue culture infective dose*) (244).

3.5- Obtenção de células mononucleares do sangue periférico e criopreservação

Cerca de 20 ml de sangue periférico de cada paciente, na fase aguda da dengue, foi recolhido em tubos contendo ACD (citrato de sódio 22 g/L, ácido cítrico 8 g/L e dextrose 24,5 g/L) como anticoagulante. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram purificadas por centrifugação em gradiente de densidade (Ficoll, Sigma), o qual separa as células basicamente por densidade, sendo as hemácias e células polimorfonucleares mais pesadas que o ficoll e as células mononucleares mais leves. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção das PBMCs de doadores saudáveis. Neste caso, as células mononucleares foram obtidas a partir de bolsas de fase leucocitária – “*buffy coat*” - de doadores saudáveis, através da colaboração com o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ. Foram realizados testes sorológicos para VDRL, Chagas, Hepatites virais, anti-HIV-1 e 2 e anti-HTLV-1 e 2, no hospital da coleta. O mesmo procedimento para obtenção das PBMCs foi válido tanto para as amostras de pacientes quanto de doadores, havendo alteração apenas em alguns detalhes e volumes especificados abaixo.

O conteúdo da *buffy coat* foi diluído 1:2 em meio RPMI suplementado com L-glutamina, antibiótico e HEPES. O volume de sangue diluído foi distribuído igualmente em 4 tubos falcon de 50 mL contendo 15 mL de Ficoll-Hypaque. No caso das amostras de pacientes, não houve diluição do sangue e o mesmo foi distribuído em aproximadamente 4 tubos de 15 mL, contendo 5 mL de Ficoll-Hypaque. Após a centrifugação à 400g/30 min., o plasma das amostras de pacientes foi aliquoteado e armazenado à - 80°C para posterior utilização nos imunoenaios. Foi recolhido o anel de células mononucleares presentes na interface entre a solução de Ficoll e o plasma, e depositado em tubos de 50mL/15mL. Foram, então, adicionados 20 mL/7mL de meio RPMI, e os tubos centrifugados a 400g/10 min. Esse procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes; o sobrenadante foi descartado e as células homogeneizadas com 2 mL de RPMI/tubo.

Para a preservação das PBMCs dos pacientes, as células foram contadas em um contador automático (BioRad) e sua viabilidade avaliada utilizando o corante Azul de Trypan. Após o ajuste das mesmas para uma concentração de 10^6 a 10^7 células/mL, as PBMCs foram ressuspensas em solução de congelamento (SFB contendo 10% de dimetilsulfóxido-DMSO) e criopreservadas em nitrogênio líquido para posterior estudo. Para a obtenção das amostras de soro, foram coletados cerca de 5mL de sangue, em tubo seco. Após a retração do coágulo, foi realizada a centrifugação à 1000g por 10min, temperatura ambiente (TA). Posteriormente, assim como as amostras de plasma, as alíquotas de soro foram armazenadas à - 80°C para a subsequente dosagem dos mediadores solúveis.

3.6- Isolamento e infecção de monócitos humanos primários obtidos de doadores saudáveis

Após obtenção das PBMCs a partir de *buffy coat* de doadores saudáveis, foram realizadas duas lavagens com o tampão de isolamento de monócitos (PBS 1x contendo 2% SFB e 1mM EDTA, livre de Ca^{++} e Mg^{++}) e a concentração ajustada para 5×10^7 células/mL. Foi realizada seleção negativa de monócitos utilizando o kit EasySep Negative Selection (StemCell Technologies). A suspensão foi transferida para tubos de 15mL, onde as

células foram incubadas por 10min à 4°C com 50µL/mL do cocktail de enriquecimento de monócitos sem depleção de CD16. Posteriormente, as células foram incubadas com 50µL/mL das partículas magnéticas, à 4°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado tampão de isolamento até o volume de 5 mL de suspensão celular e o tubo colocado no magneto por 2.5 min à TA. O tubo foi, então, invertido para obtenção dos monócitos humanos isolados.

Foi realizada a contagem dos monócitos em um contador automático (BioRad), com exclusão das células mortas por Azul de Trypan. A concentração foi ajustada para 3×10^5 células/mL em meio RPMI suplementado, contendo 10% de SFB, distribuídos 1mL por poço, em placas de 48 poços e incubação em estufa 37°C/5%CO₂.

Após incubação por 24 horas, o sobrenadante das culturas de monócitos foi descartado e adicionado 300µl do inóculo viral ultracentrifugado, diluído 1/50 (MOI 60) em meio RPMI sem SFB. Após o período de incubação de 2 horas, à 37°C/5% CO₂, o inóculo foi descartado e adicionado 1,0 mL de meio RPMI suplementado, com 2% de SFB. Nas culturas também foram utilizados controles positivos para a enzima IDO (LPS (0,01ug/mL + IFN-γ 1ug/mL- Sigma) e a molécula NO (SNAP 10ug/mL- Sigma), bem como controles negativos de IDO (1-MT 10ug/mL- Santa Cruz Biotechnology) e do NO (L-NMMA 10ug/mL- Sigma). A placa foi incubada por 24h em estufa 37°C/5% CO₂.

3.7- Marcação extra e intracelular para a análise de PBMCs por citometria de fluxo

Os sobrenadantes das culturas de monócitos de doadores saudáveis, previamente infectadas pelo DENV-2, foram recolhidos (3 alíquotas de 200 µL) e armazenados a - 20°C para posterior dosagem dos mediadores inflamatórios, por ELISA. As células foram submetidas à uma raspagem suave, em gelo, com ponteira de plástico, para sua remoção mecânica e transferidas para placa de 96 poços. Após a centrifugação a 400g/7 min., o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 µL de solução de lavagem (PBS+1% BSA+ 0,1% azida). Por sua vez, as alíquotas de PBMCs, previamente criopreservadas, contendo cerca de 10^6 - 10^7 células de pacientes e controles saudáveis, foram descongeladas em banho-maria à 37°C, centrifugadas

(350g/5 min) e lavadas uma vez com 10 mL de PBS pH 7,4 contendo 2% de FBS e 0,01% de NaN₃ e, então, transferidas para placa de 96 poços. Em seguida, tanto as células de pacientes quanto de doadores foram centrifugadas a 400g por 5min/4°C. As células foram, primeiro, bloqueadas para seus receptores Fc, através da incubação com solução de bloqueio (1% BSA, 0,1% NaN₃ e 5% plasma humano inativado em PBS pH 7,4) por 30 minutos à 4°C. Após incubação, as células foram centrifugadas a 400g por 2min e, então, foi realizada a marcação extracelular com 20µL da combinação dos anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos anti-CD14 (PercP) e anti-CD16 (APCeFluor780) diluídos em solução de lavagem (BSA 1%, NaN₃ 0,1%, PBS pH 7,4) e seguido de incubação por 30min à 4°C. Ao final deste período foram realizadas duas lavagens com solução de lavagem, seguida de centrifugação à 400g por 2min. As células foram fixadas com 100µL de solução de fixação a 4% (Cytfixperm solution-BD), por 20min à 4°C. Após centrifugação, as células foram permeabilizadas com solução de permeabilização (Cytfixperm solution-BD) por 10min a 4°C, seguida de centrifugação. As células foram, então, incubadas com 20µL da combinação dos anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos anti-NOS 2 (AF488) (Santa Cruz Technology), anti-IDO (PE) (R&D Systems) e anti-DENV (AF647) (Millipore) por 45min a 4°C.

A conjugação do anticorpo anti-DENV foi realizada utilizando kits comerciais da Molecular Probes (Life Technologies, catálogo A20186) por conjugação direta com o Alexa-Fluor 647 e purificação em coluna de resina. Após incubação, foi adicionado solução de permeabilização (Cytfixperm solution-BD), seguido de centrifugação. Por fim, as células foram novamente fixadas em solução de fixação 4% (Cytfixperm solution-BD), por 20 min à 4°C. O fixador foi removido por centrifugação e as células ressuspensas em 200µL de PBS e armazenadas à 4°C até a aquisição.

A aquisição foi realizada no FACsAria (BD), da Plataforma de Citometria de Fluxo-FIOCRUZ. As análises foram feitas utilizando o programa FlowJo versão 7.6.1 (Tree Star Inc., San Diego, CA).

O anticorpo isotipo para o marcador CD16 foi realizado em células marcadas com CD14 com isotipos para os anticorpos INOS e IDO. Para a determinação não específica dos MFIs de INOS e IDO, foram utilizados anticorpos isotipos em células marcadas com CD14 e CD16 e os valores de

MFI destes isotipos foram subtraídos de amostras marcadas com anticorpos anti-INOS e anti-IDO.

3.8- Quantificação de fatores solúveis por imunoenaios

As amostras de soro obtidas a partir de pacientes infectados com DENV e indivíduos controles, previamente armazenados a -80°C foram utilizados para dosagem dos mediadores inflamatórios. Os plasmas armazenados foram descongelados e as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-8, IL-10 e IL-1 β foram quantificadas através do imunoensaio, usando a tecnologia de LUMINEX™ seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (R&D Systems). De forma resumida, foi preparada uma solução contendo uma mistura das micropartículas de diferentes tamanhos, cada uma recoberta com o anticorpo específico para a citocina de interesse. Cerca de 25 μ L dessa solução foi incubada com 100 μ L de soro (diluído 1:2) ou da curva padrão por 3 horas à TA (0.13-2000 pg/mL). Após lavagens, foi adicionado 50 μ L/poço da solução contendo a mistura de anticorpos específicos para cada citocina, conjugados a biotina, seguido de incubação por 1 hora à TA. Após novas lavagens, foi adicionado 50 μ L/poço da estreptavidina conjugada com PE e incubados por 30min à TA. Após incubação, foram realizadas novas lavagens, as micropartículas foram suspensas em tampão fornecido pelo fabricante e a aquisição das amostras foi realizada imediatamente no aparelho Luminex Instrumentation System (Luminex™,TX,USA) da plataforma de Nanotecnologia e Microarranjos, Luminex – RJ [RPT03C] da Rede de Plataformas Tecnológicas/FIOCRUZ.

Os níveis das quimiocinas MCP-1 e IP-10 foram detectados pela técnica de ELISA (Peprotech 900-M31), em amostras de soro de pacientes e controles, diluídas 1:10. As curvas-padrão foram preparadas por diluições seriadas da alíquota correspondente à quimiocina padrão, fornecido pelo fabricante (15-1000 pg/mL). Para os sobrenadantes das culturas de monócitos infectadas *in vitro*, foi feita a dosagem das citocinas IFN- α (12-1000 pg/mL) (PBL assay Science Cat#41110), IFN- γ (23-1500 pg/mL) (Peprotech Cat#900-K27), TNF- α (31-2000 pg/mL) (Peprotech Cat#900-K25), IL-10 (62-4000 pg/mL) (Peprotech Cat#900-K21) e da quimiocina MCP-1(4-250 pg/mL) (Peprotech Cat#900-T31).

Além disso, a produção da proteína viral NS1 (Platelia™ Dengue NS1 Ag 72830), também foi avaliada, pela técnica de ELISA, sem diluição das amostras e de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a placa é recoberta com anticorpo de captura diluído em PBS, adicionado 100 µL/poço e incubada *overnight* à TA. Após uma sessão de quatro lavagens, a placa foi bloqueada e incubada 1 hora à TA, seguida de nova lavagem, quatro vezes. Foi preparada a curva padrão para cada citocina/quimiocina avaliada e imediatamente adicionados 100 µL/poço da curva ou das amostras, em triplicata, seguido de incubação por 2hs à TA. Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes e, então, adicionado o anticorpo de detecção (100 µL/poço) e nova incubação de 2hs à TA. Finalmente, a placa foi lavada novamente e adicionados 100 µL/poço da Streptavidina-HRP e incubação por 30 min. Ao final de quatro lavagens, foi adicionado 100 µL/poço do substrato TMB. A determinação da densidade óptica das amostras e os padrões foi realizada utilizando o espectrofotômetro (SpectraMax) em um comprimento de onda de 620 nm. Para estimar as concentrações dos diferentes fatores foi realizada uma curva de 4 parâmetros no GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3.9- Detecção de NO₂ pela Reação de Griess

Para a quantificação de NO, tanto no plasma de pacientes infectados, quanto no sobrenadante das culturas de monócitos infectadas, foi realizado o ensaio da Reação de Griess, o qual quantifica um dos produtos de sua reação com o oxigênio, o Nitrito (NO₂). O reagente de Griess (Sigma #G4410) foi misturado com igual volume das amostras de plasmas ou sobrenantes das culturas de células (100µL/poço) em uma placa de 96 poços. Após 15 minutos de incubação, a determinação da concentração de nitrito foi realizada em um leitor de placas (540 nm) a partir de uma curva padrão com valores entre 0 e 40 uM. Como controle positivo foi utilizado o doador de NO (SNAP- 10µg/mL), e um inibidor de NO (L-NMMA-10µg/mL) foi usado como controle negativo. Os resultados da leitura foram analisados no GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA), utilizando uma curva de regressão linear.

3.10- Análise estatística

Para avaliar se os dados das amostras de pacientes e dos doadores infectados *in vitro* obedeciam uma distribuição normal, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Sendo assim, para avaliar diferenças entre os grupos testados de controles e DENV foi utilizado o teste de Mann-Whitney, não paramétrico, para as amostras que não obedeciam uma distribuição normal. Para as análises com distribuição normal, foi utilizado o teste t, paramétrico e não-pareado. As correlações entre a produção de citocinas/quimiocinas com os parâmetros clínicos/laboratoriais ou com as subpopulações de monócitos foram estimadas pela correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Essas análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3.11- Comitê de Ética

Os procedimentos realizados neste estudo são parte de projetos aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Fiocruz, Ministério da Saúde (CAAE:13318113.7.0000.5248). Todos os pacientes participantes concordaram com o projeto através da assinatura de um termo de consentimento, livre e esclarecido.

4- Resultados

Parte I: Avaliação da resposta imune de pacientes infectados predominantemente com DENV-4, da epidemia de 2013, no MS.

4.1- Características clínicas, laboratoriais e demográficas

Neste estudo, foram incluídos 35 pacientes com diagnóstico positivo de infecção de dengue, na fase aguda (2-9 dias após o início da doença) durante um surto de DENV-4 em Mato Grosso do Sul, Brasil, em 2013. Entre eles, 25 (71%) foram classificados como dengue (FD) sem sinais de alerta (SA) e 10 (29%) como dengue com sinais de alerta (FD com SA), de acordo com classificação adotada pela OMS, em 2009. As características demográficas, clínicas e os dados laboratoriais da população de estudo são mostrados na

Tabela 4.1. A maioria dos indivíduos deste estudo era do sexo masculino, embora não houvesse diferença entre os grupos em relação a este parâmetro e nem a idade do grupo de estudo, que variou entre 14 e 96 anos, com idade média de 36 anos. Apenas 5 (14%) pacientes, todos do grupo de indivíduos com sinais de alerta, apresentaram sintomas clínicos de gravidade, como sangramento e extravasamento plasmático. Estes dados refletem a característica mais leve da infecção pelo DENV sorotipo 4.

A trombocitopenia é uma das manifestações hematológicas mais comuns observadas durante a fase aguda da infecção por dengue. Parâmetros laboratoriais como leucopenia, ou aumento do hematócrito e da dosagem de NS1, além de níveis elevados de AST e ALT são comumente observados em pacientes com dengue apresentando sintomas de gravidade em comparação com aqueles sem gravidade. Apesar destas características terem sido observadas dentro do nosso grupo de estudo, não houve diferença estatística entre estes parâmetros no grupo FD sem SA vs FD com SA. Com relação aos parâmetros bioquímicos, os níveis de AST e ALT circulantes não foram significativamente diferentes entre os grupos (**Tabela 4.1 e Figura 4.1**), embora os pacientes do grupo FD com SA tenham apresentado um aumento considerável nos níveis destas enzimas, em comparação com os pacientes sem SA. Como esperado, foram encontradas contagens significativamente mais baixas de plaquetas no grupo de pacientes com SA (**Tabela 4.1 e Figura 4.1**).

Mais da metade dos pacientes foram confirmados para a infecção pelo DENV através de um ensaio de IgM positivo, por ELISA. Os demais pacientes foram confirmados pela técnica de PCR ou ELISA da NS1 viral. Alguns pacientes não foram testado para o ensaio de PCR ou apresentaram resultado negativo devido ao dia avançado da doença. Um paciente do grupo FD sem SA apresentou PCR positiva para DENV-1, um paciente do grupo FD com SA apresentou PCR positiva para DENV-2 e os outros pacientes (9) foram positivos para DENV-4 (**Tabela 4.1**). A epidemia de origem desses pacientes foi predominantemente marcada pelo vírus da dengue sorotipo 4, com base no diagnóstico laboratorial de todos os pacientes analisados durante o período de coleta (dados não mostrados).

Tabela 4.1. Parâmetros clínicos, laboratoriais e demográficos de pacientes com dengue

| | Classificação (OMS, 2009) | |
|--|----------------------------------|---------------------------------|
| Características^a | FD sem SAⁿ⁼²⁵ | FD com SAⁿ⁼¹⁰ |
| Dados demográficos | | |
| Idade em anos | 35 (25-60) | 41 (23-55) |
| Sexo (M:F) | 14:11 | 05:05 |
| Dias de doença ^b | 4.0 (4.0-6.0) | 6.5 (3.0-8.0) |
| Manifestações hemorrágicas | | |
| Sangramento ^c | 0/25 | 04/10 |
| Extravasamento plasmático ^d | 0/25 | 01/10 |
| Parâmetros laboratoriais | | |
| Plaquetas mínimas (counts x 10 ³ /mm ³) | 137 (103-182) | 60 (17-221)* |
| Hematócrito (%) | 44 (41-46) | 44 (38-50) |
| Pico de AST/TGO (U/L) | 55 (36-149) | 128 (53-149) |
| Pico de ALT/TGP (U/L) | 66 (48-110) | 103 (53-171) |
| Leucócitos totais (counts x 10 ³ /mm ³) | 4100 (2900-5200) | 3800 (2400-5000) |
| Monócitos (%) | 4.8 (3.3-6.4) | 3.0 (1.3-7.0) |
| anti-Dengue IgM (%) | 52% | 60% |
| Dosagem de NSI (ng/mL) | 3,4 ± 1,9 | 2,2 ± 1,3 |
| DENV-1:DENV-2:DENV-4:Negative PCR | 1:0:7:13 | 0:1:2:6 |

^a FD, Febre do Dengue. SA, Sinais de Alerta. Mediana (IC 95%, intervalo de confiança);

^b Dias de doença, dia de início dos sintomas até a entrevista do paciente;

^c Sangramento, inclui erupção cutânea, epistaxe, sangramento gengival, melena, hematúria e/ou metrorragia.

^d Extravasamento plasmático inclui sinais como ascite, derrame pleural e/ou de pericárdio. Diferenças estatísticas entre os grupos FD sem SA e FD com SA foram analisadas pelo teste U de Mann Whitney. Diferenças estatísticas foram observadas apenas na contagem de plaquetas * $p < 0.05$.

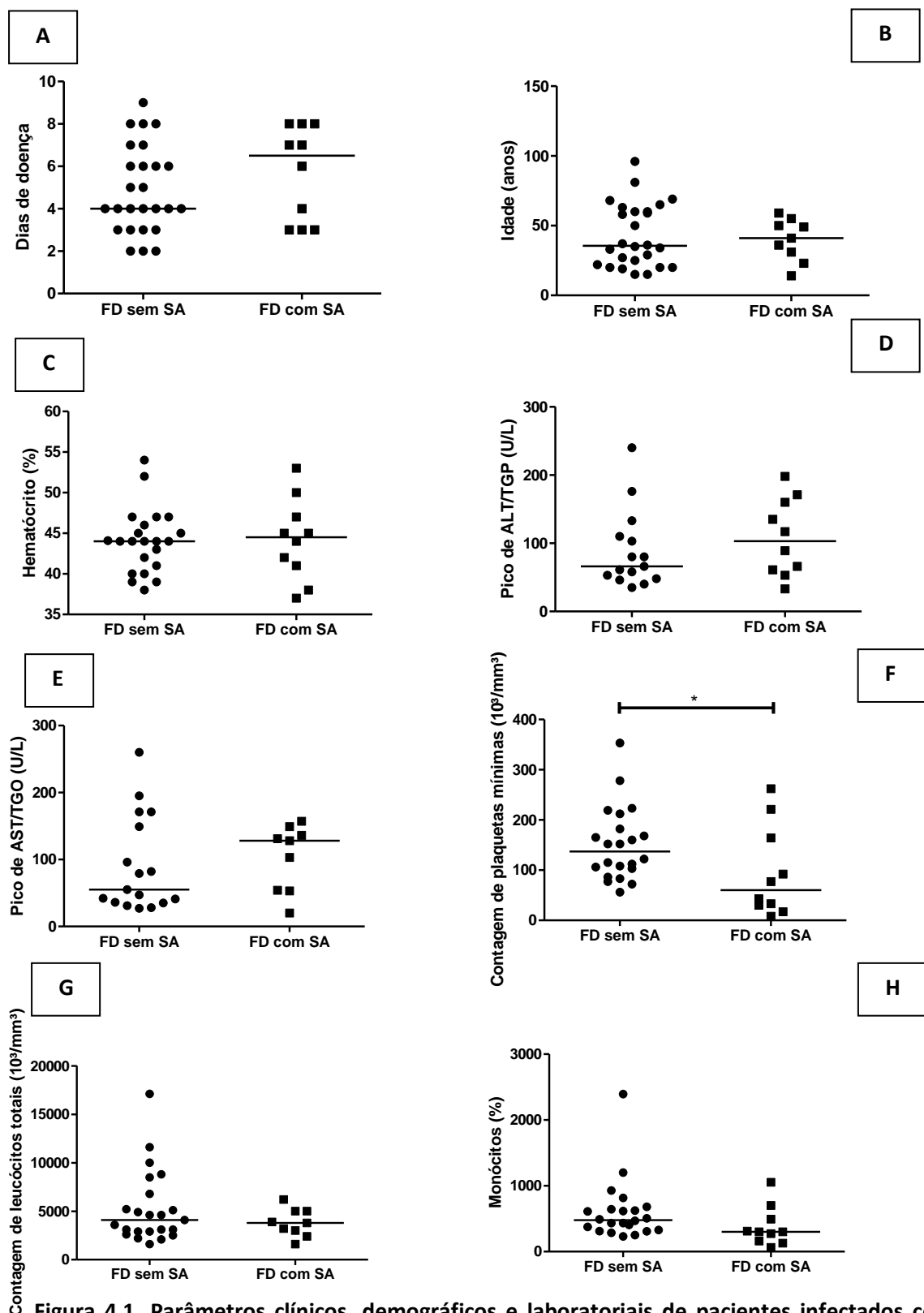


Figura 4.1. Parâmetros clínicos, demográficos e laboratoriais de pacientes infectados com DENV-4, de acordo com a classificação clínica. Os pacientes com diagnóstico positivo para dengue, incluídos neste estudo, foram classificados de acordo com a OMS, 2009 em Febre do dengue (DF) sem sinais de alerta (SA) ou febre do dengue com SA. Após a classificação, os pacientes foram avaliados quanto aos parâmetros demográficos, como dias de doença (A) e idade (B), além de parâmetros clínicos e laboratoriais, a partir de exames específicos. (C) Hematócrito (%); (D) Pico de ALT; (E) Pico de AST; (F) Contagem de plaquetas mínimas; (G) Contagem de leucócitos totais e (H) Monócitos (%). As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste U de Mann Whitney e o valor de $*p < 0.05$ foi considerado significativo.

4.2- Produção de citocinas/quimiocinas no plasma/soro de pacientes com DENV-4

É bem conhecido que muitas citocinas e mediadores inflamatórios estão envolvidos na resposta do sistema imune à infecção pelo DENV. Muitas delas foram detectadas em pacientes com dengue e associadas à manifestações clínicas mais graves. Por outro lado, outros parecem exercer um papel protetor durante a infecção e estão envolvidos no *clearance* viral. Citocinas e mediadores inflamatórios também podem estar envolvidos na indução de enzimas, como iNOS eIDO, e ativação de células relacionadas à regulação do sistema imune, como a população de monócitos.

Inicialmente, fomos avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas em amostras de plasma/soro dos pacientes infectados pelo DENV-4. As amostras foram coletadas de pacientes com dengue e comparadas com plasma/soro de indivíduos saudáveis, usados como controles. Os níveis circulantes de citocinas IFN- γ e TNF- α aumentaram significativamente nos doentes com DENV-4 quando comparados com os controles (**Tabela 4.2**). A citocina anti-inflamatória IL-10 também foi detectada como significativamente aumentada nos pacientes estudados. Ambas as quimiocinas MCP-1 (CCL2) e IP-10 (CXCL10) também apresentaram níveis circulantes mais elevados em pacientes com DENV-4 quando comparados com indivíduos saudáveis (**Tabela 4.2**). Para avaliar se as citocinas e quimiocinas produzidas durante uma infecção com DENV-4, desempenhavam um papel no desenvolvimento das manifestações clínicas graves, comparamos os níveis destes fatores circulantes em pacientes que não apresentavam sinais de alerta com aqueles que apresentavam sinais de alerta. Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas em nenhuma das citocinas/quimiocinas avaliadas na população de estudo entre os grupos avaliados, não havendo diferenças na dosagem desses fatores de acordo com as manifestações clínicas (dados não apresentados).

Tabela 4.2. Determinação de citocinas/quimiocinas circulantes em pacientes com dengue

| Citocinas/Quimiocinas (pg/mL) | Controle | FD |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| IFN- γ | 0.73 (0.17- 0.73) ^a | 313 (135-411)*** |
| TNF- α | 3.39 (2.63-6.20) | 9.00 (7.19- 11.75)*** |
| MCP-1/CCL-2 | 137 (26-340) | 659 (320-800)*** |
| IL-10 | 0.46 (0.34-0.81) | 2.38 (0.97-3.45)*** |
| IP-10/CXCL10 | 64 (24-166) | 770 (414-811)** |

^a Mediana (IC 95%, intervalo de confiança); Citocinas/quimiocinas foram dosados em pacientes brasileiros com dengue e comparados com indivíduos saudáveis. Diferenças estatísticas entre grupos controles x DENV foram analisadas pelo teste U de Mann Whitney ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.3- A subpopulação de monócitos CD14+CD16+ está levemente expandida durante infecção pelo DENV-4

As amostras de PBMCs obtidas de pacientes com dengue, bem como de doadores saudáveis, sem infecção, foram utilizadas para o estudo de subpopulações de monócitos, por citometria de fluxo. A região característica da população de monócitos foi delimitada pelos parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), com exclusão prévia de *doublets*, para tornar a análise mais limpa e confiável (**Figura 4.2A e 4.2B**). As duas subpopulações de monócitos melhor definidas, conhecidas como monócitos clássicos (CD14+CD16-) e monócitos não clássicos (CD14+CD16+) foram avaliadas quanto às suas frequências em indivíduos controles e infectados, de acordo com a classificação clínica (com ou sem sinais de alerta) (**Figura 4.3**). O perfil de ativação dessas populações e sua frequência, representativo de um indivíduo controle e um paciente com infecção por DENV-4, pode ser observado através do gráfico de *dot plot*, obtido por análise de citometria de fluxo e demonstrado nas figuras 4.2A e 4.2B.

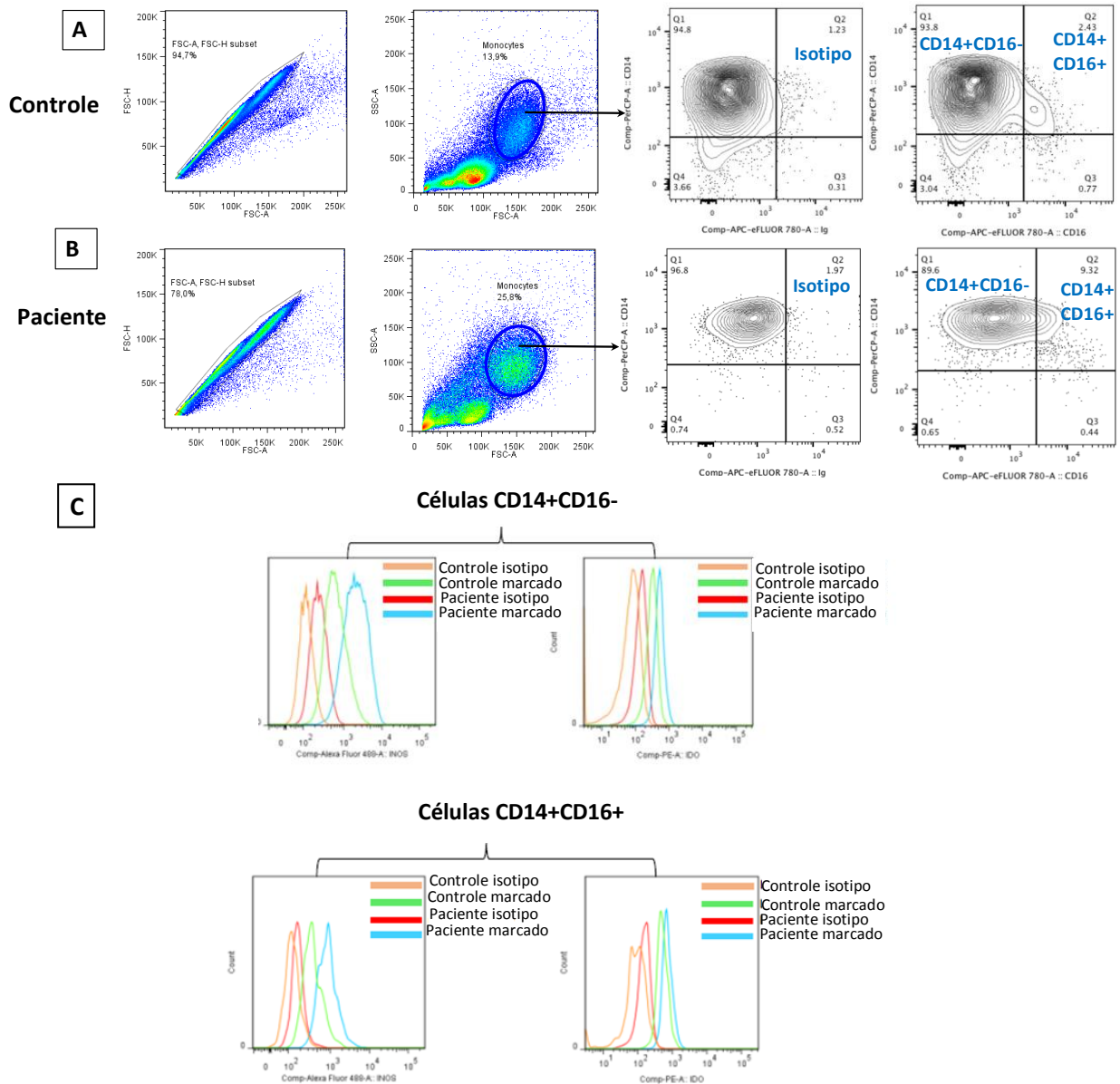


Figura 4.2. *Dot plots* e gráficos de contorno das análises de citometria de fluxo, representando a população de monócitos e histogramas iNOS/IDO dentro das subpopulações CD14+CD16- ou CD16+. As PBMCs de pacientes com dengue ou de doadores saudáveis foram isoladas e marcadas como descrito nos Materiais e Métodos. Os gráficos de dispersão representam dados das PBMCs de um doador saudável e um paciente com dengue, analisados por citometria de fluxo para a expressão de CD14 e CD16. Os histogramas representam a detecção de iNOS e IDO (MFI) dentro das subpopulações de monócitos. (A) e (B) Perfil de citometria de fluxo celular mostrando a exclusão de *doublets* e os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) da população de monócitos. As células da região dos monócitos foram analisadas quanto à marcação de CD14-PerCP e CD16-APCeFluor780 e o controle isotipo de CD16 é mostrado em células marcadas com CD14. Os gráficos de contorno mostram as percentagens das subpopulações de células CD14+CD16- e CD14+CD16+ em um doador saudável (A) e um paciente infectado com DENV (B). (C) Histogramas representativos da detecção da média de intensidade de fluorescência (MFI) de iNOS-AlexaFluor488 e IDO-PE entre as subpopulações de monócitos CD14+CD16- e CD14+CD16+. Histogramas representativos de células de um doador saudável e um paciente com DENV.

A frequência da subpopulação de monócitos clássicos, CD14+CD16-, foi avaliada através do percentual de células positivas para o marcador CD14 e negativo para o CD16. Observou-se que a frequência desta subpopulação foi de cerca de 77-98%, sem diferença estatística entre o grupo controle e o de pacientes infectados com DENV. Foi observado uma redução estatisticamente significativa nesta subpopulação de monócitos nos pacientes com dengue (**Figura 4.3A**). Por outro lado, quando se avaliou a frequência de subpopulação de monócitos não clássicos, células CD14+CD16+, através da porcentagem de células positivas tanto para marcadores CD14 como CD16, a mesma apresentou uma variação entre 1.6 e 21.5%. Um brando, porém, significativo aumento nesta população foi observado no grupo dos pacientes quando comparados ao grupo controle (**Figura 4.3B**). Em ambas subpopulações, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos de pacientes com e sem sinais de alerta (dados não mostrados).

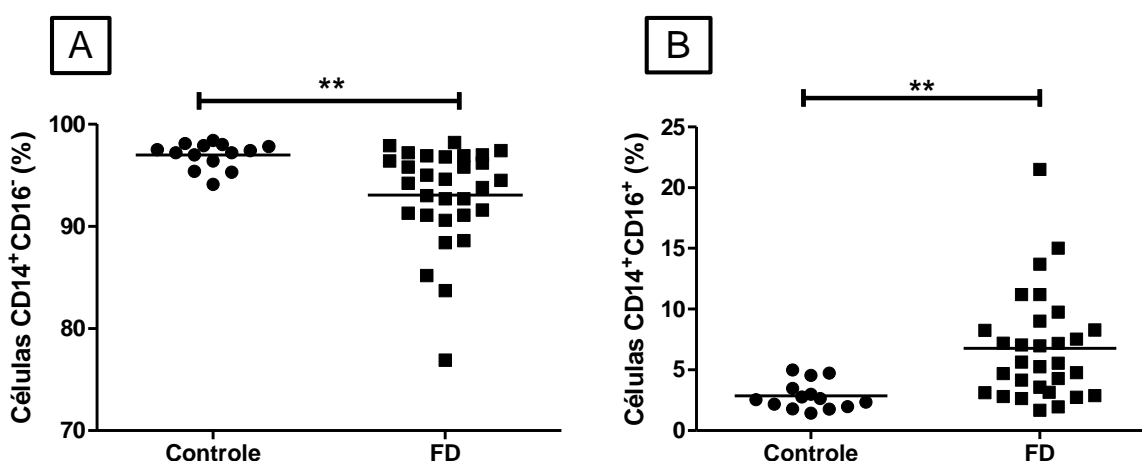


Figura 4.3. Frequências das células CD14+CD16-/CD16+ circulantes em pacientes com dengue. PBMCs de pacientes infectados com DENV-4 foram descongeladas e marcadas com anti-CD14PerCP e anti-CD16AlexaFluor780 e seu isotipo, e analisadas por citometria de fluxo. **Controle-** Grupo de indivíduos saudáveis; **FD-** Febre da Dengue; **SA-** sinais de alerta. (A) Frequência de células CD16⁻ dentro da população CD14⁺; (B) Frequência de células CD16⁺ dentro da população CD14⁺. Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste U de Mann Whitney. ** $P < 0.01$ foi considerado significativo.

4.4 - A detecção das enzimas iNOS e IDO está elevada na infecção pelo DENV-4 e associada a subpopulações de monócitos específicas

Em primeiro lugar, avaliou-se a indução das enzimas iNOS e IDO pela população de monócitos totais, células CD14+, durante a infecção pelo DENV-4. Mais uma vez, PBMCs descongeladas de pacientes infectados e indivíduos controles foram analisados quanto à presença do marcador característico de monócitos, CD14, por citometria de fluxo, como demonstrado nas figuras anteriores 4.2A e 4.2B. Posteriormente, dentro da população total de monócitos, foi analisada a detecção das enzimas iNOS e IDO, através da intensidade média de fluorescência (MFI) de cada uma. Pode-se observar que os pacientes infectados com DENV-4 apresentaram um aumento na detecção de iNOS quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 4.4A**). O mesmo foi observado para a enzima IDO, embora seu aumento nos pacientes infectados tenha sido em uma escala visivelmente menor (**Figura 4.4B**).

Em um segundo momento, avaliou-se a detecção de enzimas iNOS e IDO em cada população de monócitos aqui estudada. E como demonstrado nas figuras 4.3C e 4.4C, a detecção de iNOS, avaliada por meio de sua MFI, também mostrou um aumento nos pacientes infectados em ambas as subpopulações estudadas quando comparado com controles saudáveis. No entanto, foi possível observar um aumento significativamente maior na subpopulação CD14+CD16-, fato observado tanto em pacientes controles como em pacientes infectados com DENV-4 (**Figura 4.4C**). Com relação à detecção de IDO, também avaliada através de sua MFI, o mesmo aumento foi observado em ambas as subpopulações de monócitos, CD14+CD16- e CD14+CD16+, em pacientes *versus* controles saudáveis (**Figuras 4.2C e 4.4D**). No entanto, ao contrário do observado para iNOS, a detecção de IDO foi significativamente maior na população de monócitos não clássicos, CD14+CD16+, tanto em indivíduos controles como em pacientes infectados com DENV-4 (**Figura 4.4D**). Além disso, todas as análises foram realizadas entre os grupos de pacientes com e sem sinais de alerta, mas não houve diferença estatística entre eles (dados não mostrados).

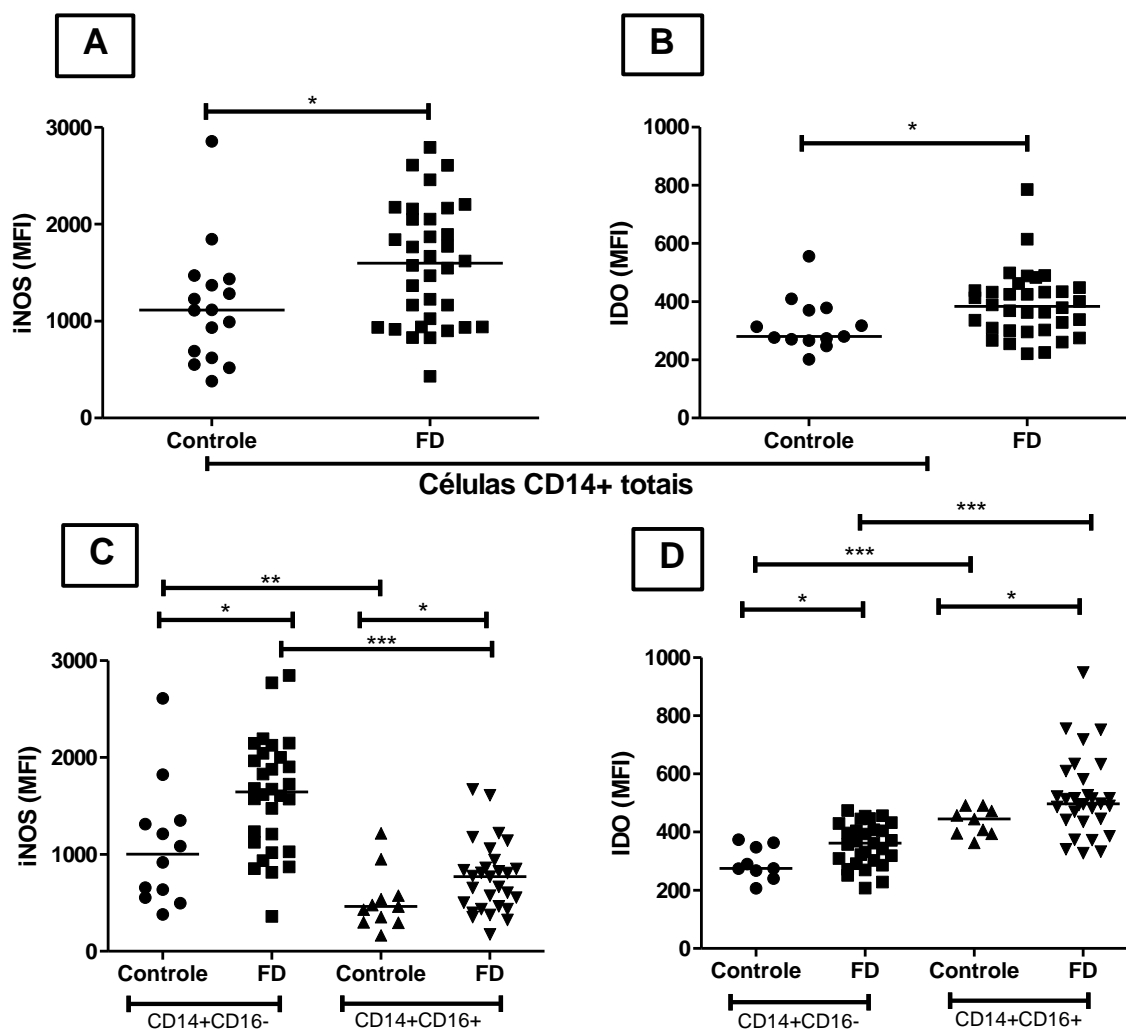


Figura 4.4. Intensidade média de fluorescência (MFI) de iNOS e IDO em células CD14+ em pacientes com dengue, de acordo com as subpopulações de monócitos. PBMCs de pacientes infectados com DENV-4 e controles saudáveis foram marcados com os anticorpos anti-CD14, anti-CD16, anti-iNOS e anti-IDO e analisados por citometria de fluxo. As MFIs para a marcação de iNOS (A) e IDO (B) dentro da população total de monócitos CD14+ foram analisadas e os pacientes infectados (DENV) foram comparados com indivíduos saudáveis. As MFIs das células positivas para iNOS (C) e IDO (D) também foram avaliadas de acordo com as subpopulações de monócitos. MFI das amostras marcadas com isotipo foi subtraído do MFI obtido das marcações específicas com anticorpos iNOS e IDO (Ver Materiais e Métodos). Diferenças estatísticas observadas entre os grupos foram avaliadas pelo teste U de Mann Whitney. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (**) foram considerados significativos.

4.5 - Os pacientes infectados com DENV-4 apresentam um aumento dos níveis plasmáticos de NO

A indução de iNOS, nos monócitos, é responsável pela produção de um importante fator inflamatório, o óxido nítrico (NO). Esta molécula tem muitas ações no organismo e também tem sido descrita como um importante fator antiviral em infecções por DENV. Assim, avaliou-se a presença de NO em plasma de pacientes com DENV-4 e comparou-se a controles saudáveis, a fim de entender se a indução de iNOS em monócitos de pacientes infectados levaria à produção de NO e se esse fato poderia estar relacionado com a característica mais branda deste sorotipo. Para tanto, foram utilizadas amostras de plasma de pacientes e indivíduos controle, previamente congelados, para a dosagem de nitrito, produto da reação de NO com o oxigênio, uma vez que a estabilidade da molécula de NO é muito baixa em amostras biológicas.

Foi possível observar que os pacientes infectados com DENV-4 apresentam um aumento significativo na produção de nitrito, em concentrações semelhantes ao controle positivo utilizado no ensaio, quando comparados aos indivíduos controle (**Figura 4.5**). Os grupos de pacientes com e sem sinais de alerta também foram avaliados, mas não houve diferenças estatísticas entre eles. Para os controles do ensaio, foi utilizado um doador de NO (SNAP), como controle positivo da sua produção, e um inibidor de NO (L-NMMA), como controle negativo.

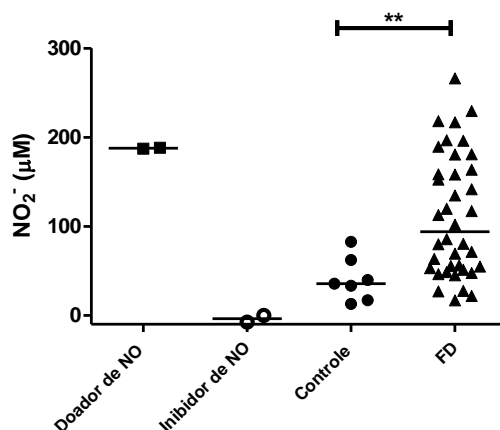


Figura 4.5. Dosagem de nitrito (NO_2^-) no plasma de pacientes com DENV. A concentração de óxido nítrico (NO) foi quantificada indiretamente em amostras de plasma de pacientes com dengue e indivíduos saudáveis. As amostras foram descongeladas e utilizadas para a determinação de nitrito (NO_2^-), um produto da reação de NO com o oxigênio, pela reação de Griess, como descrito em Materiais e Métodos. Como controle positivo, utilizou-se um doador de NO (SNAP) e como controle negativo, um inibidor de NO (L-NMMA). As diferenças estatísticas entre valores de (NO_2^-) de indivíduos saudáveis e pacientes com dengue foram analisadas pelo teste U de Mann Whitney e $p < 0,05$ (*) consideradas significativas.

4.6- Diferentes subpopulações de monócitos estão correlacionadas com os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas em pacientes com DENV-4

Um dos principais fatores envolvidos na gravidade da dengue é a chamada "tempestade de citocinas", que consiste em uma resposta exacerbada do sistema imune que leva à produção de muitas citocinas/quimiocinas e mediadores inflamatórios que podem levar a uma alteração da permeabilidade e outros mecanismos, agravantes da doença. Dentre as muitas moléculas responsáveis por esse mecanismo, avaliou-se neste estudo algumas relacionadas à ativação dos monócitos durante a infecção pelo DENV e à indução das enzimas analisadas, iNOS e IDO. Para avaliar se a produção de citocinas está associada à subpopulações de monócitos clássicos (CD14+CD16-) ou não clássicos (CD14+CD16+), além das subpopulações positivas para iNOS e IDO, utilizou-se amostras de plasma/soro de pacientes infectados com DENV-4 para a quantificação de mediadores solúveis, pelo ensaio de ELISA ou Luminex. A subpopulação de monócitos clássicos, CD14+CD16-, demonstrou estar negativamente correlacionada com a citocina IL-10 e a quimiocina IP-10/CXCL10. Monócitos não clássicos, CD14+CD16+ correlacionam-se positivamente com IL-10. Com relação as subpopulações expressando iNOS, ambas CD14+CD16-iNOS+ e CD14+CD16+iNOS+ apresentaram uma correlação positiva com os mediadores IL-10, IP-10/CXCL10 e MCP-1/CXCL20, demonstrando uma associação também entre o TNF- α e células CD16-iNOS+. Por outro lado, entre as subpopulações de monócitos CD14+ que expressam IDO, a população CD16-IDO+ correlacionou-se positivamente com TNF- α , IL-10 e IP-10/CXCL10; a população CD16+IDO+ correlacionou-se positivamente apenas com a IL-10 (**Tabela 5.3**). As demais populações de monócitos e subpopulações estudadas não mostraram correlação estatisticamente significativa com as citocinas/quimiocinas avaliadas.

Tabela 4.3. Correlação entre as subpopulações de monócitos circulantes e citocinas/quimiocinas em pacientes com dengue

| | TNF- α | IL-10 | IP-10/CXL10 | MCP-1/CCL2 | IFN- γ |
|---|--|---|---|--|---------------------------|
| Células CD14 ⁺ CD16 ⁻ (%) | r = -0.1607 P < 0.4139 | r = -0.4277 P < 0.0232 | r = -0.5678 P < 0.0112 | r = -0.3624 P < 0.1273 | r = 0.1777 P < 0.5997 |
| Células CD14 ⁺ CD16 ⁺ (%) | r = 0.0958 P < 0.6277 | r = 0.3786 P < 0.0470 | r = 0.3607 P < 0.1293 | r = 0,4186 P < 0.0745 | r = -0.1640 P < 0.6278 |
| Células CD14 ⁺ iNOS ⁺ (MFI) | r = 0.4213 P < 0.0163 | r = 0.4545 P < 0.0090 | r = 0.6105 P < 0.0055 | r = 0.3789 P < 0.1096 | r = 0.1818 P < 0.5926 |
| Células CD14 ⁺ IDO ⁺ (MFI) | r = 0.3100 P < 0.0843 | r = 0.2207 P < 0.2248 | r = 0.2940 P < 0.2218 | r = 0.1878 P < 0.4413 | r = -0.2909 P < 0.3855 |
| Células CD14 ⁺ CD16 ⁻ iNOS ⁺ (MFI) | r = 0.4154 P < 0.0279 | r = 0.4674 P < 0.0121 | r = 0.5860 P < 0.0084 | r = 0.5123 P < 0.0249 | r = 0.0000 P < 1.0090 |
| Células CD14 ⁺ CD16 ⁺ iNOS ⁺ (MFI) | r = 0.3010 P < 0.1195 | r = 0.4269 P < 0.0235 | r = 0.6877 P < 0.0011 | r = 0.6298 P < 0.0039 | r = -0.1958 P < 0.5431 |
| Células CD14 ⁺ CD16 ⁻ IDO ⁺ (MFI) | r = 0.4258 P < 0.0239 | r = 0.4346 P < 0.0208 | r = 0.4561 P < 0.0497 | r = 0.3211 P < 0.1802 | r = -0.1469 P < 0.6509 |
| Células CD14 ⁺ CD16 ⁺ IDO ⁺ (MFI) | r = 0.1078 P < 0.5850 | r = 0.5556 P < 0.0021 | r = 0.3719 P < 0.1169 | r = 0.0701 P < 0.7753 | r = -0.4965 P < 0.1006 |

Subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ analisadas foram correlacionadas com citocinas/quimiocinas dosados no plasma/soro de pacientes com DENV pelo teste de correlação de Spearman. Valores de *p* e *r* estão representados na tabela acima. *P* < 0.05 foi considerado significativo e destacado em negrito.

Parte II: Avaliação da resposta imune e do efeito dos tratamentos com o indutor de IDO e o doador e inibidor de NO em monócitos de doadores saudáveis infectados *in vitro* pelo DENV-2

4.7- O pico de replicação do DENV-2 ultracentrifugado, em monócitos humanos infectados *in vitro*, ocorre 24 horas após a infecção

Primeiramente, para estabelecer o melhor ponto de detecção do antígeno viral (Ag) a ser utilizado nos ensaios *in vitro*, realizados neste estudo, os monócitos humanos obtidos de doadores saudáveis foram infectados com DENV-2 Ultracentrifugado e avaliados por um período de 24, 48 e 72 horas após a infecção. Em cada ponto, as células foram recuperadas, submetidas à marcação intracelular com anticorpos específicos para detecção do Ag viral e

analisadas por citometria de fluxo. Na **Figura 4.6**, a análise feita através dos dados obtidos pela citometria de fluxo das células recuperadas demonstra que o grupo controle, como era esperado, não apresentou marcação para o antígeno viral, enquanto que a infecção com o DENV-2 resultou, nesse experimento representativo, em cerca de 34% de células positivas para o Ag viral. Durante a cinética de infecção do vírus foi possível detectar Ags virais nas primeiras 24 horas após a infecção, permanecendo presente em todos os dias analisados. De acordo com os resultados observados, vimos que o pico de detecção dos Ags virais ocorre nas primeiras 24h, correspondente à cerca de 34% de células positivas para o Ag viral, havendo uma queda em 48 horas, para 22% e uma redução mais brusca, chegando a 5%, em 72 horas após a infecção (**Figura 4.6**). De acordo com estes resultados, foi selecionado o ponto de 24 horas após a infecção para todos os ensaios *in vitro*, realizados neste estudo.

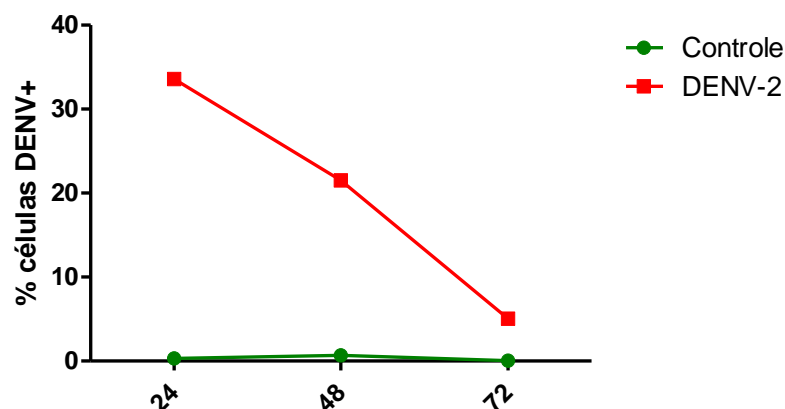


Figura 4.6. Cinética da infecção do DENV-2 ultracentrifugado em monócitos humanos, analisada por citometria de fluxo. Os monócitos obtidos a partir de PBMCs de doadores saudáveis foram isolados por uma seleção negativa com beads magnéticas e infectados *in vitro* com o DENV-2 ultracentrifugado. A detecção de células positivas para o Ag viral foi realizada por análise em citometria de fluxo do dia 1-3 em células infectadas com DENV-2 ou incubadas com meio de cultura apenas (Controle). O gráfico é representativo de 3 experimentos realizados independentemente.

4.8- A inibição da molécula NO aumenta a frequência de células CD16- e reduz a população CD16+ durante a infecção de monócitos humanos, *in vitro*, pelo DENV-2

As amostras de PBMCs obtidas de doadores saudáveis foram utilizadas para o estudo das subpopulações de monócitos, por citometria de fluxo. A região característica da população de monócitos foi delimitada pelos parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), com exclusão prévia de *doublets*, para tornar a análise mais limpa e confiável (**Figura 4.7A e 4.7B**), representando cerca de 12% da população total de células. Ambas as subpopulações de monócitos, CD14+CD16-, e os monócitos não clássicos, CD14+CD16+, foram avaliadas quanto às suas frequências em doadores controles (sem infecção) e infectados com DENV-2. Além disso, também foram utilizados controles positivos para a indução da enzimaIDO (LPS+ IFN- γ) (**Figura 4.8A e 4.8C**) e iNOS (Doador de NO - SNAP), bem como seu inibidor (Inibidor de NO – L-NMMA) (**Figura 4.8B e 4.8D**), afim de avaliar seus papéis sobre as populações de monócitos estudadas. Através do gráfico de *dot plot*, obtido por análise de citometria de fluxo e representativo de um doador controle (**Figura 4.7A**) e um doador infectado com DENV-2 (**Figura 4.7B**), pode-se observar o perfil de ativação dessas populações, bem como suas frequências. A frequência da subpopulação de monócitos clássicos, CD14+CD16-, foi avaliada através do percentual de células positivas para o marcador CD14 e negativo para o CD16. Observou-se que a frequência desta subpopulação foi de cerca de 62%, sem diferença estatística entre o grupo controle e o de doadores infectados com DENV (**Figura 4.8**). Entretanto, quando a frequência foi avaliada entre o grupo de doadores apenas infectados com DENV-2 *versus* aqueles infectados e tratados com o inibidor de NO (L-NMMA), observou-se um aumento significativo nesta subpopulação de monócitos nas células que receberam o tratamento (**Figura 4.8B**). Por outro lado, quando se avaliou a frequência de subpopulação de monócitos não clássicos, CD14+CD16+, através da percentagem de células positivas tanto para marcadores CD14 como CD16, a mesma foi de cerca de 13%, tanto para os controles quanto para os doadores infectados e não foi possível observar diferença estatística entre eles no ponto avaliado de 24h após a infecção. Apesar de não ter sido um dado

estatístico, foi possível observar que alguns doadores quando infectados, apresentaram um aumento nesta subpopulação. Da mesma forma, a molécula inibidora de NO alterou a frequência de células CD16+, levando à uma redução nesta subpopulação (**Figura 4.8D**).

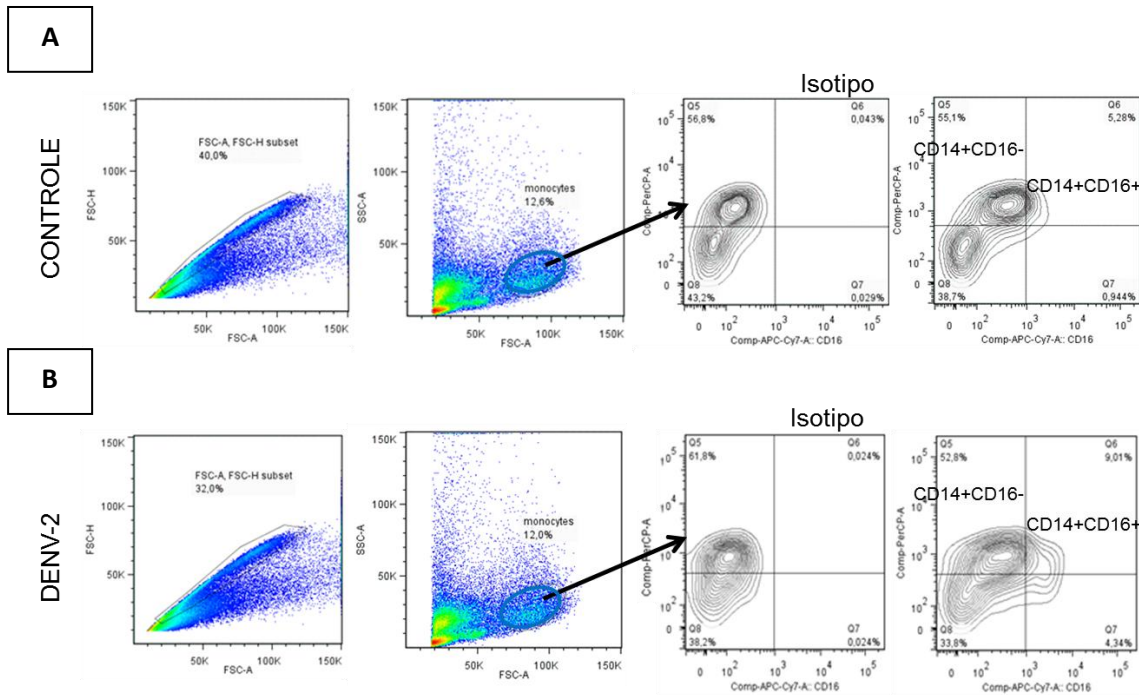


Figura 4.7. Dot plots e gráficos de contorno, representando a população de monócitos, a partir de análise de citometria de fluxo e suas subpopulações CD14+CD16- ou CD16+, em células controle, ou infectadas com DENV-2. As PBMCs de doadores saudáveis foram obtidas para isolamento dos monócitos humanos, sua infecção e marcação, como descrito nos Materiais e Métodos. Estão representadas culturas de monócitos de um doador saudável, sem infecção (A) e um infectado com DENV-2 (B), analisados por citometria de fluxo para a expressão de CD14 e CD16. (A) e (B) Perfil de citometria de fluxo celular mostrando a exclusão de *doublets* e os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) da população de monócitos. As células da região dos monócitos foram analisadas quanto à marcação com CD14-PerCP e CD16-APCeFluor780 e o isotipo do CD16 é mostrado em células marcadas com o CD14. Os gráficos de contorno são representativos do percentual das subpopulações de células CD14+CD16- e CD14+CD16+ em culturas de monócitos não infectadas (A) ou infectadas (B).

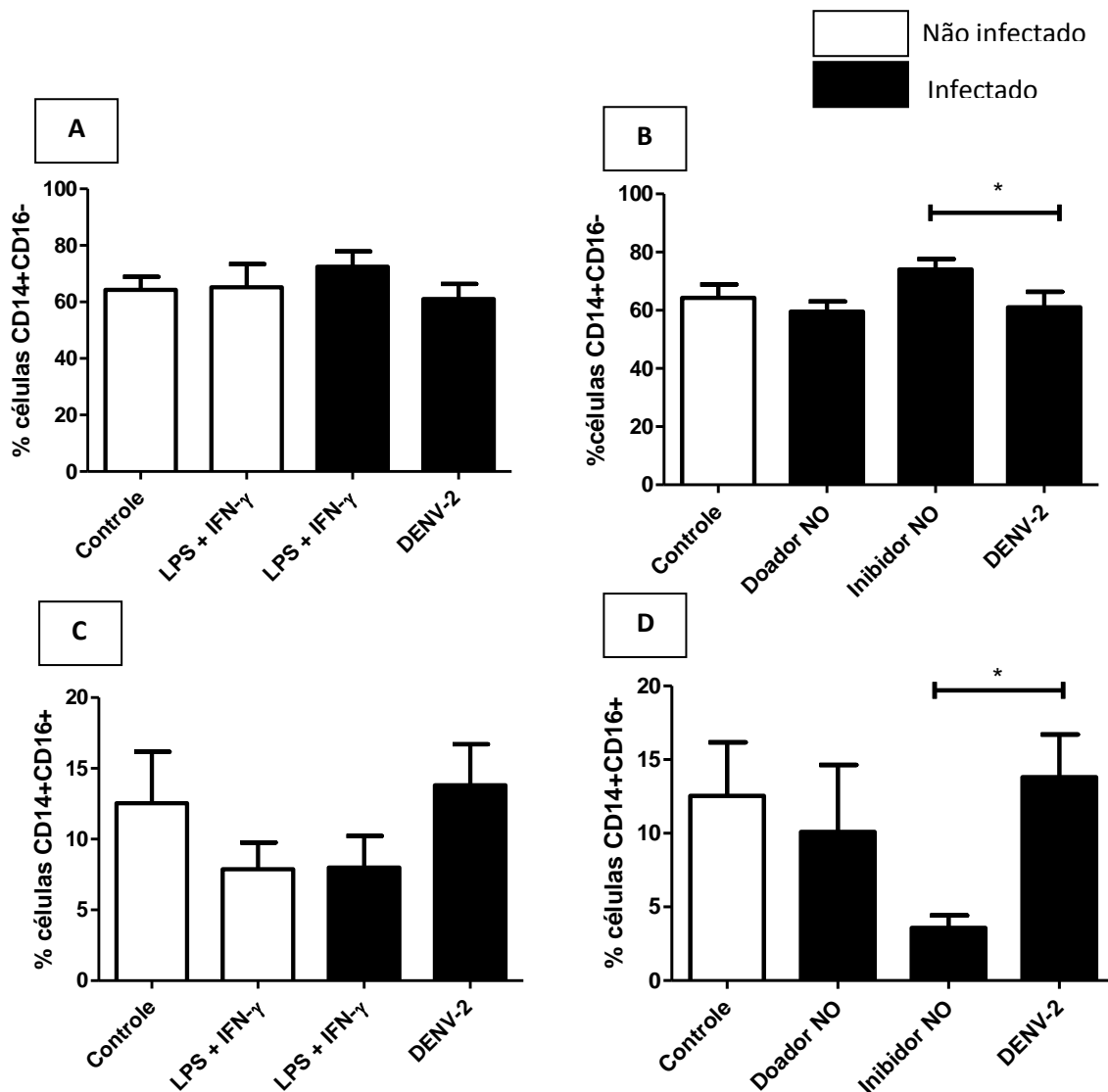


Figura 4.8. Frequências de células CD14+CD16+/CD16+, em cultura de monócitos infectadas *in vitro* pelo DENV-2 e submetidas à diferentes tratamentos. Os monócitos obtidos de doadores saudáveis foram infectados com DENV-2 ultracentrifugado e submetidos aos tratamentos com estimulador de IDO (LPS+IFN- γ) ou o inibidor (L-NMNA) e doador de NO (SNAP) por 24h. Após este período, as células foram marcadas com anti-CD14 e anti-CD16 e analisadas por citometria de fluxo (ver Figura 6 para mais detalhes). (A) frequência de células CD14+CD16- submetidas ou não ao estímulo com LPS+IFN- γ . (B) frequência de células CD14+CD16- submetidas ou não ao tratamento com doador/inibidor de NO. (C) frequência de células CD14+CD16+ submetidas ou não ao estímulo com LPS+IFN- γ . (D) frequência de células CD14+CD16+ submetidas ou não ao tratamento com doador/inibidor de NO. As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste t pareado. * $P < 0,05$ foi considerado significativo (n= 7 doadores).

4.9- A detecção de iNOS está associada à subpopulação de monócitos CD14+CD16-, independente da infecção

A detecção das enzimas iNOS (**Figura 4.9A**) e IDO (**Figura 4.9B**), bem como do Ag viral (**Figura 4.9C**), foi avaliada em cada subpopulação de monócitos estudada, por citometria de fluxo. Foi feita uma comparação entre os grupos controles, bem como entre os grupos infectados com DENV-2, entre as duas populações. Como demonstrado na figura 4.9, a detecção de iNOS, avaliada por meio de sua MFI, mostrou uma maior intensidade de detecção na subpopulação CD14+CD16- do que na CD14+CD16+, tanto em células não infectadas, quanto em células infectadas com DENV-2 (**Figura 4.9A**). A detecção de IDO, também avaliada através de sua MFI, não apresentou diferença entre os grupos, nas populações avaliadas. Da mesma forma, a detecção do Ag viral, expressa pelo percentual de células positivas para o DENV, também não demonstrou diferença estatística entre os grupos, apresentando praticamente o mesmo percentual de infecção em ambas subpopulações.

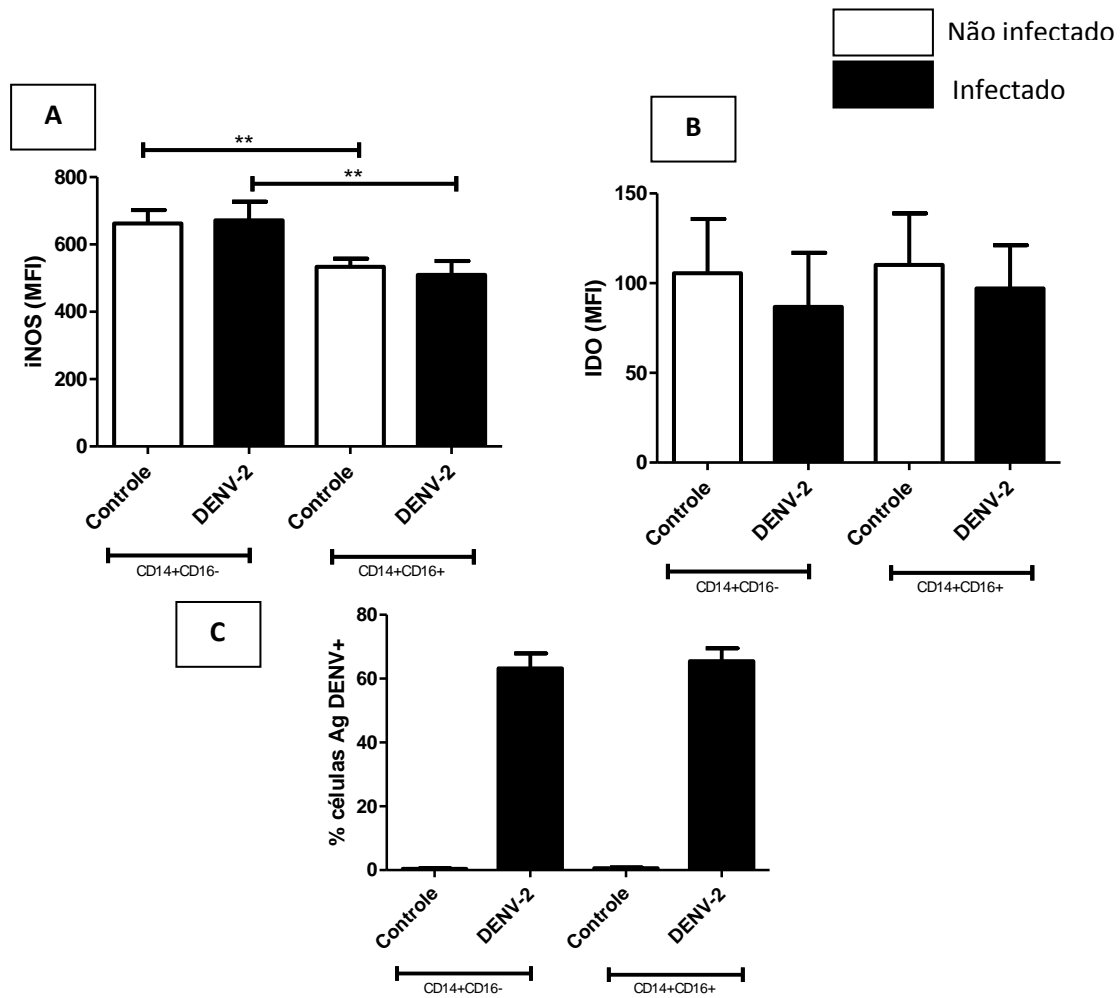


Figura 4.9: Médias das intensidades de fluorescências (MFI) de iNOS e IDO e a frequência de células positivas para o Ag viral nas diferentes subpopulações de monócitos CD14⁺. Os monócitos humanos, isolados de PBMCs de doadores saudáveis, foram cultivados e infectados com DENV-2. Após 24h, as células foram recuperadas e analisadas, por citometria de fluxo, para a detecção de iNOS (A) e IDO (B), bem como o Ag viral do DENV (C), em cada subpopulação de monócitos estudada. As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste t pareado. ** $P < 0.01$ foram considerados significativos (n= 7 doadores).

4.10- A detecção de iNOS não sofre alteração 24 horas após a infecção *in vitro* pelo DENV-2, mediante os diversos tipos de tratamentos, independente das subpopulações de monócitos

Os monócitos humanos, obtidos a partir de PBMCs de doadores saudáveis, foram infectados com DENV-2 ultracentrifugado e analisados quanto à presença do marcador característico de monócitos, CD14, por citometria de fluxo, como demonstrado nas figuras anteriores 4.6A e 4.6B. Dentro da população total de monócitos, células CD14+, foi, então, analisada a detecção da enzima iNOS, através de sua intensidade média de fluorescência (MFI), 24h após a infecção *in vitro* pelo DENV-2 e os tratamentos com estimuladores e inibidores da enzima IDO e da molécula NO. Observamos que não houve diferença na detecção desta enzima, na população total de monócitos, entre o grupo controle e infectado com DENV-2, sugerindo que não houve ativação da enzima 24hs após a infecção. Também não foi observada diferença em sua detecção, mediante os tratamentos com o estimulador de IDO (LPS+IFN- γ) tanto em controles quanto em células infectadas (**Figura 4.10A**), bem como com os inibidores e doadores de NO (**Figura 4.10B**). Posteriormente, foi detectada a enzima iNOS, em cada subpopulação de monócitos avaliada e submetidas a diferentes tratamentos. Como podemos observar nas figuras 4.9C e 4.9D, respectivamente, não houve alteração na iNOS, 24h após a infecção e o tratamento com o estimulador de IDO, bem como o inibidor e doador de NO, na subpopulação CD16-. O mesmo foi observado na população CD16+, onde a detecção desta enzima não sofreu nenhuma alteração mediante os diferentes tratamentos e infecção (**Figura 4.10E e 4.10F**).

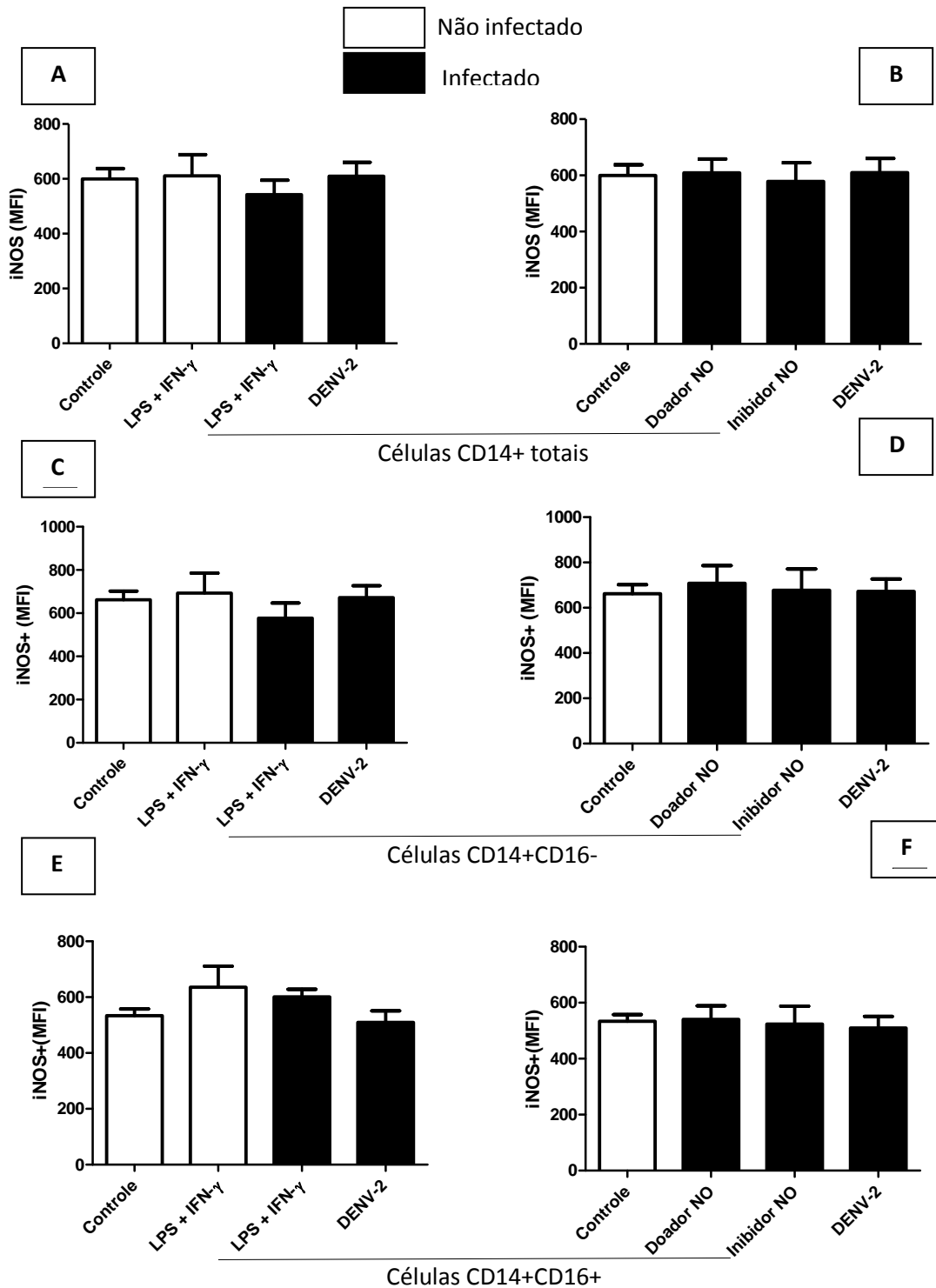


Figura 4.10. Média da intensidade de fluorescência (MFI) de iNOS nas células CD14⁺, de acordo com as subpopulações de monócitos e os diferentes tratamentos. Os monócitos humanos, isolados de PBMCs de doadores saudáveis, foram cultivados, infectados com DENV-2 e submetidos aos tratamentos com estimulador de iNOS (LPS+IFN- γ) ou inibidor (L-NMMA) e doador de NO (SNAP). Após 24h, as células foram recuperadas e analisadas, por citometria de fluxo, para a detecção de iNOS em células CD14⁺ totais, estimuladas com LPS+IFN- γ (A) ou com o inibidor/doador de NO (B). A mesma análise foi feita para células CD14⁺CD16⁻ estimuladas com LPS+IFN- γ (C) ou com o inibidor/doador de NO (D) e para células CD14⁺CD16⁺ também estimuladas com LPS+IFN- γ (E) ou com o inibidor/doador de NO (F). As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste t pareado (n= 7 doadores).

4.11- A detecção deIDO não sofre alteração 24 horas após a infecção *in vitro* pelo DENV-2, mas é elevada pelo estímulo com LPS+IFN- γ em células CD14+ totais e CD16-, além de ser elevada também pela inibição de NO, em células CD16+

Da mesma forma que foi feito para a detecção de iNOS, também foi realizada a detecção da enzima IDO, nos monócitos humanos obtidos a partir de PBMCs de doadores saudáveis e infectados com DENV-2 ultracentrifugado. Como descrito anteriormente, os monócitos foram analisados quanto à presença do marcador CD14, por citometria de fluxo. A detecção da enzima IDO foi determinada pela sua intensidade média de fluorescência (MFI), dentro da população total de monócitos, CD14+, 24h após a infecção *in vitro* pelo DENV-2 e os tratamentos com estimuladores e inibidores da enzima IDO e da molécula NO. Na população de células CD14+, observamos que não houve diferença na detecção desta enzima entre o grupo controle e infectado com DENV-2, sugerindo que, da mesma forma que a iNOS, não houve ativação de IDO 24hs após a infecção. Por outro lado, foi observado que o estímulo com LPS+IFN- γ foi capaz de aumentar a detecção de IDO, tanto no grupo controle, quanto no grupo infectado com DENV-2 (**Figura 4.11A**). Já a inibição ou o estímulo da molécula de NO não interferiram na detecção desta enzima, na população total de células CD14+ (**Figura 4.11B**). Quando a enzima IDO foi avaliada em cada subpopulação de monócitos estudada, pudemos observar que na população CD16-, o estímulo com LPS+IFN- γ também aumentou a detecção de IDO nos grupos controles e infectados (**Figura 4.11C**). Surpreendentemente, na população CD16+ o estímulo com LPS+IFN- γ , não foi capaz de alterar IDO, entretanto, o tratamento com o inibidor de NO aumentou significativamente a detecção desta enzima nesta subpopulação (**Figura 4.11D**).

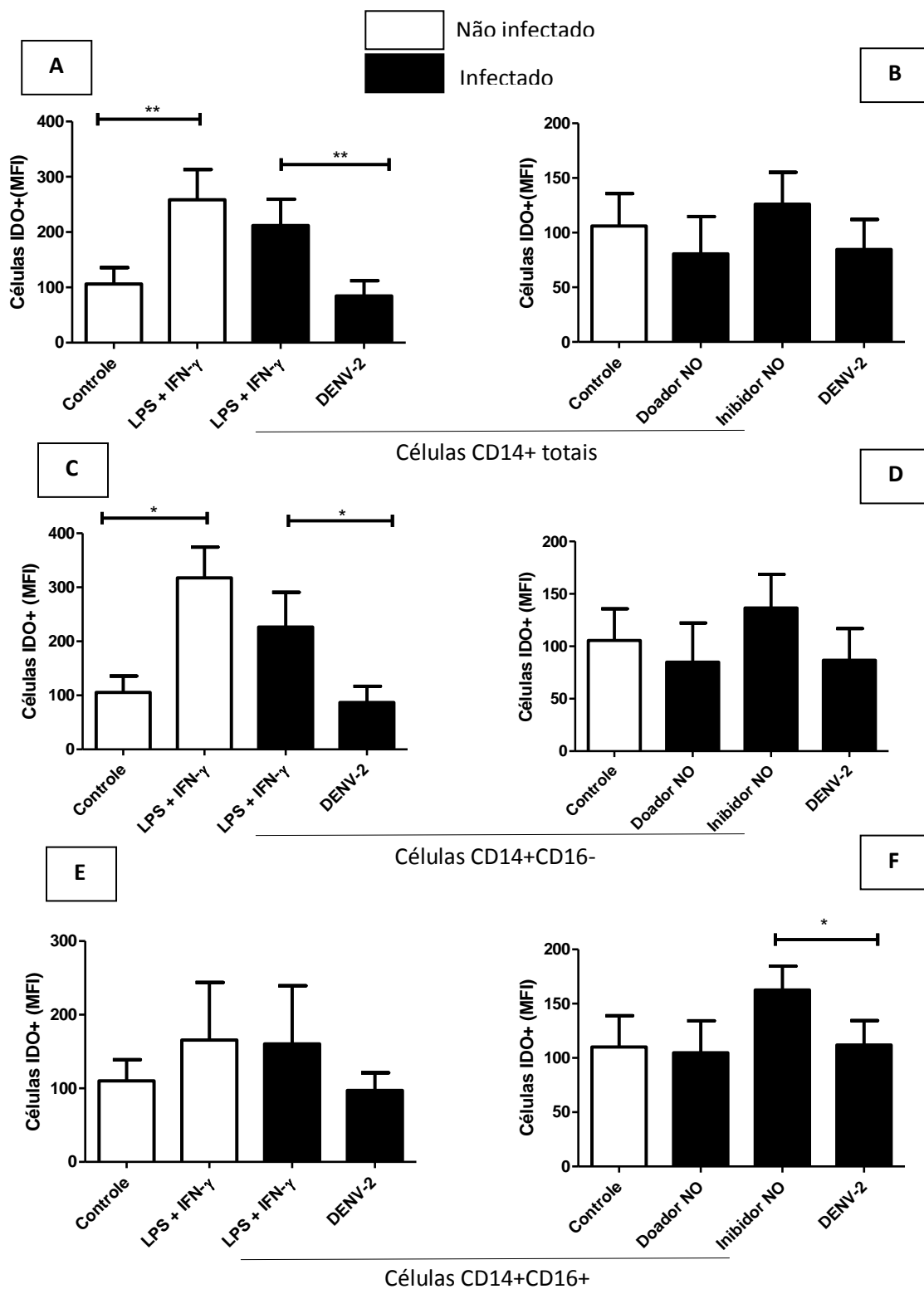


Figura 4.11. Média da intensidade de fluorescência (MFI) de IDO em células CD14⁺, de acordo com as subpopulações de monócitos e os diferentes tratamentos. Os monócitos humanos, isolados de PBMCs de doadores saudáveis, foram cultivados, infectados com DENV-2 e submetidos aos tratamentos com estimulador de IDO (LPS+IFN- γ) ou inibidor (L-NMNA) e doador de NO (SNAP). Após 24h, as células foram recuperadas e analisadas, por citometria de fluxo, para a detecção de IDO em células CD14⁺ totais, estimuladas com LPS+IFN- γ (A) ou com o inibidor/doador de NO (B). A mesma análise foi feita para células CD14⁺CD16⁻ estimuladas com LPS+IFN- γ (C) ou com o inibidor/doador de NO (D) e para células CD14⁺CD16⁺ também estimuladas com LPS+IFN- γ (E) ou com o inibidor/doador de NO (F). As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste t pareado. * $P < 0.05$ e ** $p < 0.01$ foram considerados significativos (n= 7 doadores).

4.12- A frequência de células positivas para o Ag viral está elevada 24h após a infecção *in vitro* pelo DENV-2, e o doador de NO, bem como o estímulo com LPS+IFN- γ são capazes de reduzir a infecção em ambas subpopulações de monócitos estudadas

O antígeno viral do DENV também foi detectado neste estudo, pela técnica de citometria de fluxo, em monócitos humanos obtidos a partir de PBMCs de doadores saudáveis e infectados com DENV-2 ultracentrifugado. Primeiramente, foi avaliado o percentual de células positivas para o antígeno viral, DENV-2, na população total de monócitos, identificada pelo marcador CD14, 24h após a infecção *in vitro* e os diferentes tratamentos com estimuladores e inibidores da enzimaIDO e da molécula NO. Observamos que, nas células CD14+ totais, a infecção pelo DENV-2 aumentou significativamente o percentual de células infectadas. Além disso, o tratamento dos monócitos com o doador de NO (SNAP) foi capaz de reduzir a infecção (**Figura 4.12A**). Da mesma forma, o estímulo destas células com LPS+IFN- γ reduziu significativamente o percentual de células positivas para o Ag viral, demonstrando também uma redução bastante acentuada na taxa de infecção destas células (**Figura 4.12B**). Posteriormente, foram avaliados os efeitos dos tratamentos e da infecção em cada subpopulação de monócitos. Os resultados demonstram que a infecção foi capaz de elevar a detecção de Ags virais do DENV-2, bem como o estímulo com LPS+IFN- γ demonstrou uma forte capacidade de reduzir a infecção na subpopulação CD16- (**Figura 4.12C**). Ainda na subpopulação de monócitos clássicos, CD14+CD16-, o tratamento com o doador de NO reduziu de forma bastante significativa a taxa de infecção destas células. Já o inibidor de NO também apresentou uma leve redução no percentual de células infectadas (**Figura 4.12D**). Na subpopulação de monócitos não clássicos, CD14+CD16+, o mesmo foi observado, com relação à infecção pelo DENV-2, que foi capaz de aumentar efetivamente a detecção dos Ags virais, e o efeito do estímulo com LPS+IFN- γ , capaz de reduzir significativamente a taxa de infecção destas células (**Figura 4.12E**). Também nesta subpopulação, o doador de NO reduziu a infecção dos monócitos pelo DENV-2 (**Figura 4.12F**).

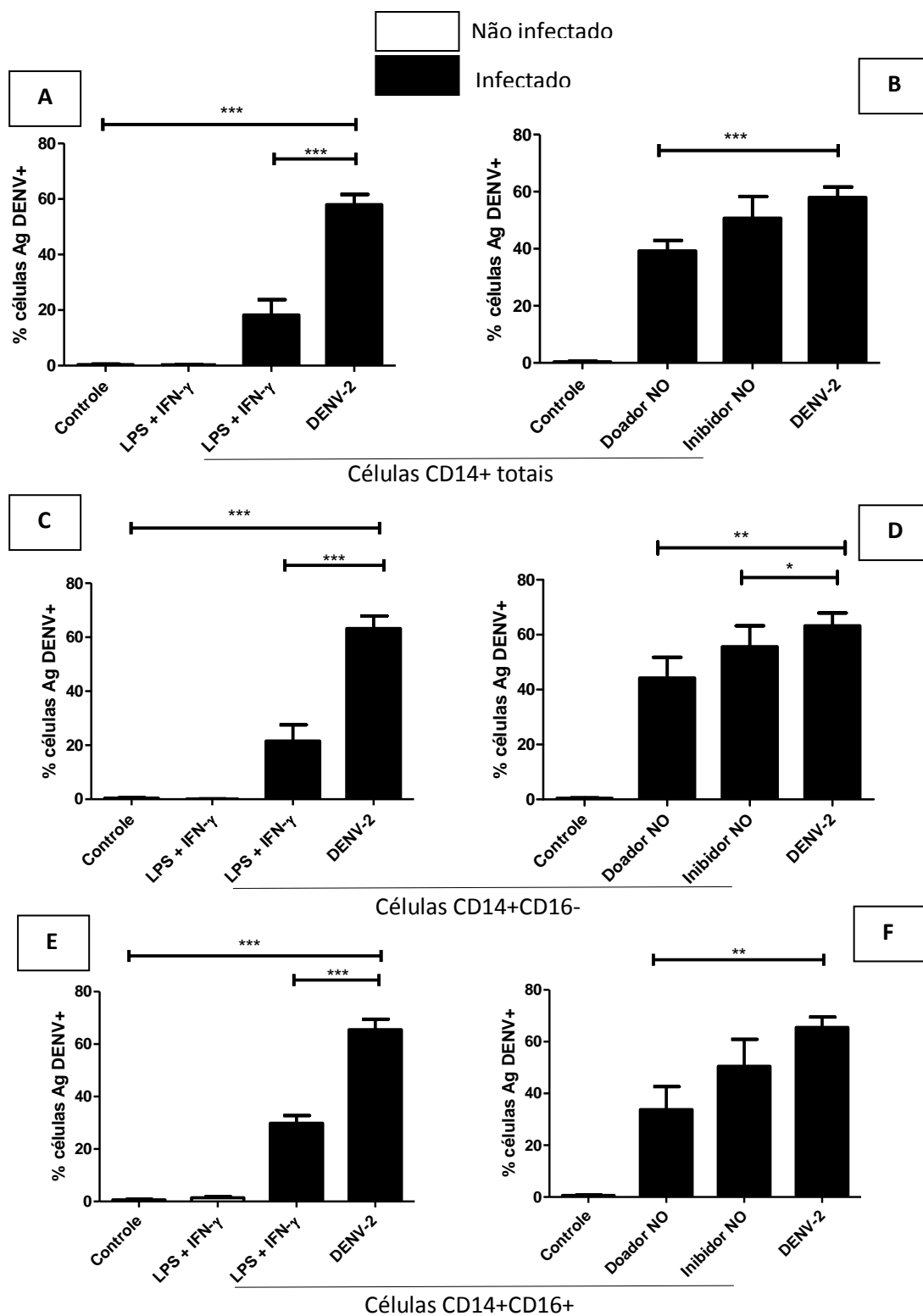


Figura 4.12. Percentual de células positivas para o Ag viral, em células CD14⁺, de acordo com as subpopulações de monócitos e os diferentes tratamentos. Os monócitos humanos, isolados de PBMCs de doadores saudáveis, foram cultivados, infectados com DENV-2 e submetidos aos tratamentos com estimulador de IDO (LPS+IFN- γ) ou inibidor (L-NMNA) e doador de NO (SNAP). Após 24h, as células foram recuperadas e analisadas, por citometria de fluxo, para a detecção dos Ags virais, em células CD14⁺ totais, estimuladas com LPS+IFN- γ (A) ou com o inibidor/doador de NO (B). A mesma análise foi feita para células CD14⁺CD16⁻ estimuladas com LPS+IFN- γ (C) ou com o inibidor/doador de NO (D) e para células CD14⁺CD16⁺ também estimuladas com LPS+IFN- γ (E) ou com o inibidor/doador de NO (F). As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste t pareado. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ foram considerados significativos (n= 7 doadores).

4.13- O estímulo com LPS+IFN- γ , assim como a inibição da molécula de NO, aumentam a produção de IL-10, MCP-1 e TNF- α ;

Os sobrenadantes das culturas de monócitos infectadas *in vitro* pelo DENV-2 ultracentrifugado e submetidas a diferentes tratamentos com o estimulador de IDO, bem como o doador e inibidor de NO, foram utilizados para dosagem de citocinas/quimiocinas, por ELISA. A fim de compreender o efeito da infecção e dos tratamentos sobre a produção de fatores solúveis, foram avaliadas algumas citocinas e quimiocinas, tais como IL-10, MCP-1, TNF- α e IFN- α e o efeito dos tratamentos sobre elas, bem como a correlação de sua produção com as subpopulações de monócitos estudadas e detecção das enzimas iNOS e IDO. Como os resultados demonstram, a infecção não alterou a produção destes mediadores solúveis, 24 horas após a infecção *in vitro* dos monócitos (**Figura 4.13**). Já o estímulo com LPS+IFN- γ foi capaz de aumentar significativamente a produção das citocinas IL-10 (**Figura 4.13A**) e TNF- α (**Figura 4.13C**), e da quimiocina MCP-1 (**Figura 4.13B**). Da mesma forma, o uso de um inibidor da molécula NO, também foi capaz de elevar a produção destes fatores, em monócitos infectados. O aumento na produção de MCP-1 pelo estímulo com LPS+IFN- γ também foi observado no grupo controle, onde não houve infecção das células, demonstrando o possível papel do estimulador de IDO na indução desta quimiocina, independente da condição de infecção (**Figura 4.13B**). De forma surpreendente e não esperada, o uso do doador de NO também gerou um aumento na produção da quimiocina MCP-1(**Figura 4.13B**). Nenhum dos tratamentos alterou a produção da citocina IFN- α (**Figura 4.13D**). O resumo dos efeitos observados pelos diferentes tratamentos sobre a produção destes mediadores pode ser observado na **Tabela 4.4**. Também foi observado um aumento na produção de IFN- γ , pelas culturas infectadas ou não, estimulados com LPS+IFN- γ , demonstrando a eficácia deste tratamento (dados não mostrados).

No estudo de correlação entre a produção destas citocinas/quimiocinas e as subpopulações de monócitos, CD14+CD16- e CD14+CD16+, bem como as populações de monócitos expressando iNOS e IDO, observamos apenas uma correlação positiva entre a citocina TNF- α com a detecção de iNOS nos monócitos totais (CD14+iNOS+), além de uma correlação também positiva

entre a quimiocina MCP-1 e a população de monócitos não clássicos, CD14+CD16+ (dados não mostrados).

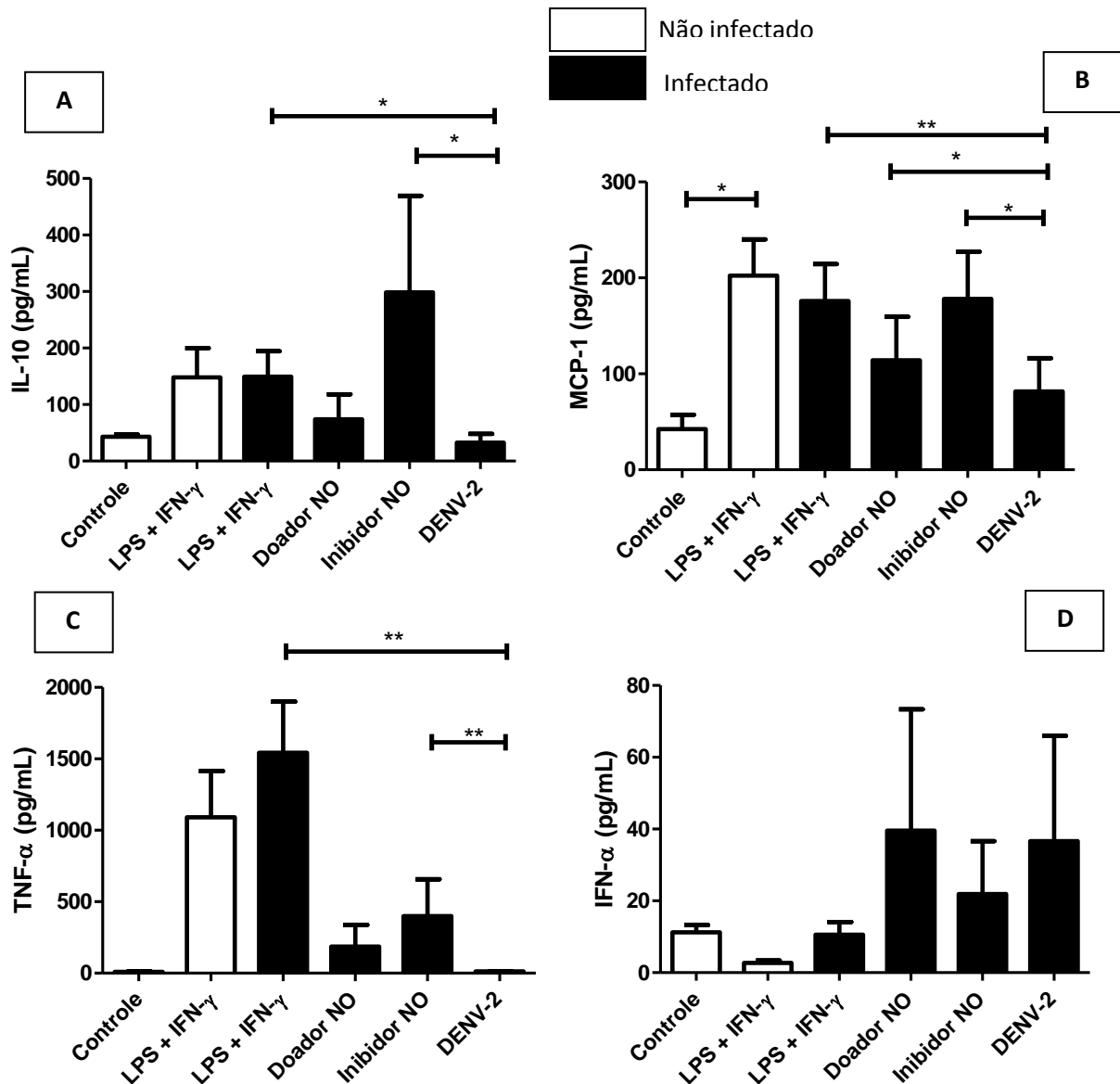


Figura 4.13. Produção de citocinas/quimiocinas no sobrenadante de culturas de monócitos infectadas e submetidas a diferentes tipos de tratamentos. Os sobrenadantes das culturas de monócitos, isolados a partir de PBMCs de doadores saudáveis, infectados e tratados com estimulador de IDO (LPS+IFN- γ) e inibidor (L-NMNA) ou doador de NO (SNAP) foram utilizados para a dosagem de diferentes citocinas e quimiocinas, por ELISA, 24h depois. (A) Produção de IL-10; (B) Produção de MCP-1; (C) Produção de TNF- α e (D) Produção de IFN- α . As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste pareado de Wilcoxon. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ foram considerados significativos (n= 9 doadores).

Tabela 4.4. Efeito dos tratamentos sobre a produção de citocinas/quimiocinas

| | LPS+IFN- γ (Indutor de IDO) | SNAP (Doador de NO) | L-NMMA (Inibidor de NO) |
|---------------|---------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| IL-10 | ↑ | — | ↑ |
| MCP-1 | ↑ | ↑ | ↑ |
| TNF- α | ↑ | — | ↑ |
| IFN- α | — | — | — |

Sobrenadante de cultura de monócitos infectados e tratados com estimulador de IDO (LPS+IFN- γ) ou inibidor (L-NMNA) e doador de NO (SNAP) foram utilizados para dosagem de citocinas/quimiocinas, por ELISA. O efeito dos tratamentos sobre a produção destes fatores está resumido na tabela acima. Os dados foram avaliados pelo teste de Wilcoxon (n=9 doadores).

4.14- A infecção pelo DENV-2, assim como a inibição da molécula NO aumenta a taxa de NS1, enquanto o estímulo com LPS+IFN- γ reduz a taxa dessa proteína viral

Novamente, os sobrenadantes das culturas de monócitos infectadas *in vitro* pelo DENV-2 e submetidas aos tratamentos com estimulador de IDO (LPS+IFN- γ) e da molécula NO (SNAP), bem como seu inibidor (L-NMNA), foram utilizados para dosagem da proteína não estrutural do DENV (NS1) 24h após a infecção e os diferentes tratamentos. A proteína NS1 está relacionada à replicação viral, além de ter seu aumento associado à gravidade da dengue. Primeiramente, foi possível observar que a infecção pelo DENV-2 elevou de forma significativa a taxa de NS1 nos sobrenadantes de culturas infectadas, como mostra a **figura 4.14**. Com relação ao tratamento com o estimulador da enzima IDO (LPS+IFN- γ), os resultados demonstram que, nas culturas infectadas, o tratamento reduz potencialmente a replicação viral, representada pela redução na taxa de NS1 (**Figura 4.14A**). Já o tratamento com o doador de NO não afetou a taxa desta proteína viral. Por outro lado, seu inibidor, L-

NMMA, foi capaz de aumentar de forma significativa a produção de NS1, nas células infectadas (Figura 4.14B).

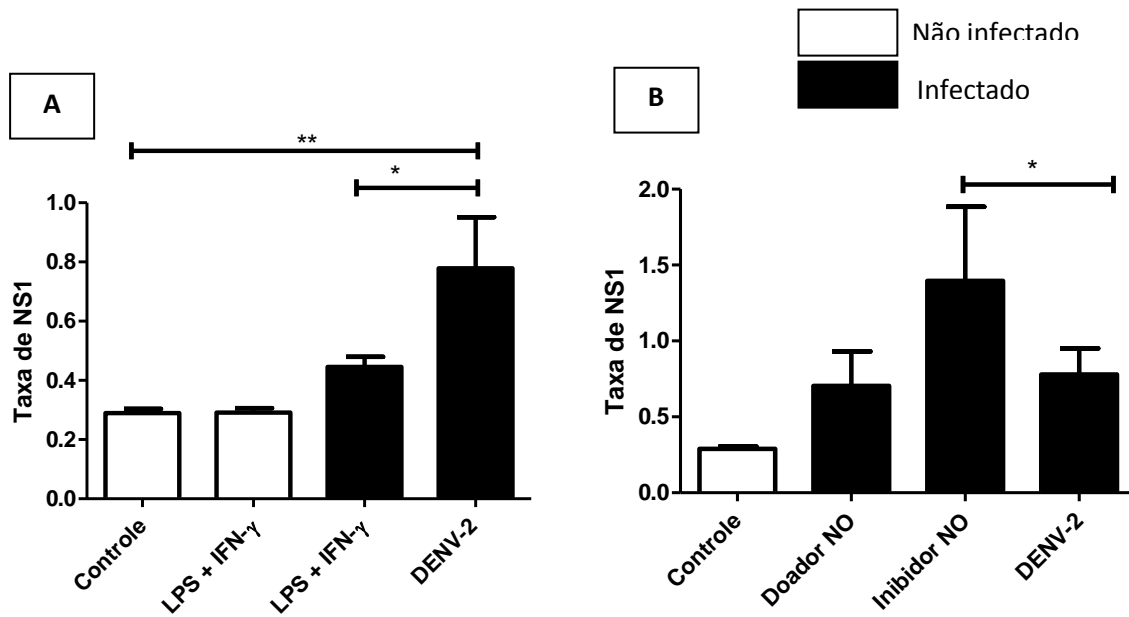


Figura 4.14. Detecção de NS1 no sobrenadante de culturas enriquecidas com monócitos, infectados *in vitro* pelo DENV-2 e submetidos a diferentes tratamentos. Os sobrenadantes das culturas de monócitos, infectados e tratados com o estimulador de IDO (LPS+IFN- γ)(A) ou inibidor (L-NMNA) e doador de NO (SNAP) (B) foram utilizados para a dosagem da proteína viral, NS1, 24h depois. As taxas de produção de NS1 foram calculadas pela divisão das D.O. da amostra pela D.O. da amostra padrão de *cutoff* (vide materiais e métodos). As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste pareado de Wilcoxon. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ foram considerados significativos (n= 9 doadores).

5- Discussão

A dengue possui diversas características clínicas e laboratoriais bem estabelecidas e caracterizadas, como aumento do hematócrito e dos níveis de enzimas hepáticas, trombocitopenia, entre outras (157, 159). Neste estudo, investigamos pacientes infectados pelo DENV-4, de uma epidemia causada por este sorotipo no Mato Grosso do Sul e avaliamos seus parâmetros clínicos, além das subpopulações de monócitos específicas que expressam iNOS e IDO, bem como as citocinas/quimiocinas produzidas em resposta à infecção. Em contraste ao que foi observado em infecções por diferentes sorotipos do DENV, observou-se um perfil mais brando nas infecções pelo DENV-4, ao que diz respeito às características demográficas e clínicas dos pacientes (22). Não foram encontradas diferenças nos parâmetros clínicos avaliados entre os grupos com sinais de alerta e aqueles sem sinais de alerta, exceto na contagem de plaquetas, mostrando menor contagem nos pacientes com sinais de alerta, de acordo com a classificação estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (1). A presença de apenas cinco pacientes com manifestações hemorrágicas e a ausência de pacientes com dengue grave neste estudo também demonstram a característica mais branda da infecção pelo DENV-4. Apesar do aumento nas transaminases ALT e AST ser notável em nossas amostras, não houve diferença estatística entre os nossos grupos de estudo e esses níveis foram maiores em comparação com outras epidemias (157, 159). Provavelmente, esses resultados foram um pouco diferentes dos estudos anteriores envolvendo pacientes com DENV, devido ao sorotipo diferente ou ao uso de uma classificação clínica mais atual, levando a uma diversificação na interpretação dos resultados.

Os monócitos desempenham um papel importante na infecção pelo DENV (59, 62, 244), porém, a função das diferentes subpopulações de monócitos continua incerta. O uso de um DENV-2 purificado por ultracentrifugação resultou em um pico de detecção intracelular que ocorreu 24h após a infecção dos monócitos humanos isolados a partir de PBMCs de doadores saudáveis, ao contrário do esperado e observado em 48h como descrito em diversos trabalhos de nossa equipe com este mesmo tipo celular (244, 245, 258). A diversidade destes resultados para aqueles encontrados em

nossos trabalhos anteriores possivelmente está associada ao método de produção da massa viral, uma vez que neste estudo utilizamos uma técnica de ultracentrifugação, onde há uma maior concentração do inóculo viral, consistindo em um elevado título viral e uma infecção mais precoce.

Em processos patológicos diversos, as subpopulações de monócitos podem desempenhar papéis diferentes. Em várias condições inflamatórias e infecciosas, os monócitos CD16+ estão elevados e são propostos por desempenhar papéis pró-inflamatórios (249). Embora alguns estudos demonstrem que ambas as subpopulações de monócitos são igualmente infectadas com o DENV, (258, 259), em outras infecções como HIV, a subpopulação de monócitos CD16+ mostrou-se mais permissiva (261). Nosso presente estudo mostrou que durante uma infecção pelo DENV-4, os monócitos são ativados, como demonstrado pelo aumento na detecção de iNOS e IDO e adquirem preferencialmente um perfil não-clássico, pelo aumento da co-expressão de células CD14+CD16+. Este resultado é corroborado por dados anteriores obtidos por nossa equipe, onde pacientes provenientes de uma epidemia pelo DENV-2 também demonstraram uma ativação da subpopulação CD14+CD16+. Entretanto, neste estudo, envolvendo pacientes com DENV-4, a ativação dessas células ocorreu de forma menos intensa, o que está de acordo com as manifestações clínicas mais brandas (258). É importante destacar que a classificação adotada para a dengue, no trabalho anterior, não foi a mesma que é utilizada atualmente, bem como o sorotipo infectante. Vale ressaltar, também, que este é o primeiro relato sobre a ativação das subpopulações de monócitos pelo DENV-4 e, sendo um novo sorotipo no Brasil, os resultados podem ser inesperados.

Não pudemos estabelecer, no entanto, uma correlação entre estas subpopulações de monócitos com a gravidade da doença, uma vez que em pacientes infectados não houve diferença entre os grupos com e sem sinais de alerta e nenhum paciente grave foi incluído no estudo. Apesar dos vários estudos sobre a imunologia da dengue, a compreensão de todos os mecanismos que estão associados à gravidade da doença ainda é incompleta. Um desequilíbrio entre as subpopulações de monócitos circulantes ou na expressão de enzimas envolvidas na patogenia e presentes nestas populações poderia estar envolvido na imunopatogenia da dengue.

Por outro lado, nossos resultados *in vitro*, não demonstraram uma ativação destas células pelo DENV-2, como era esperado. A infecção de monócitos humanos *in vitro* pelo DENV-2 leva ao aumento da frequência de células CD14+CD16+, como consequência de sua ativação, 48h após a infecção (258). Possivelmente, nossos resultados não demonstraram um aumento na frequência destas células, devido as nossas análises terem sido realizadas em um ponto mais precoce da infecção, de 24h.

Como é bem descrito, os monócitos são uma das principais células alvo do DENV e desempenham um papel fundamental durante a infecção. Estas células são capazes de produzir vários mediadores inflamatórios (244, 245) e, quando ativadas, induzem a expressão de enzimas com papéis reguladores na dengue, como iNOS e IDO. INOS é uma enzima induzida por vários estímulos infecciosos e responsável pela produção da molécula de NO (172), a qual possui importantes funções antivirais na dengue, como descrito por muitos autores (165, 181, 183, 184). Mostramos que monócitos isolados de pacientes infectados com DENV-4 apresentam um aumento na detecção de iNOS, em comparação com controles saudáveis. Demonstramos também, pela primeira vez, a indução de IDO em monócitos de pacientes infectados com DENV-4, indicando seu envolvimento na doença e também sua indução pelo sorotipo 4.

Em um estudo com pacientes infectados pelo DENV-4, realizado pela nossa equipe, foi observada uma atividade aumentada de IDO, juntamente com uma redução nos níveis circulantes de triptofano. Também neste trabalho, a IDO foi correlacionada inversamente com níveis séricos de AST/TGO e ALT/TGP e sua atividade associada diretamente com células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+), demonstrando um possível papel antiviral e indutor de células com perfil regulador, durante a infecção (262). Uma vez que a avaliação da atividade desta enzima é de extrema importância para compreender sua ação na dengue, futuros estudos envolvendo a ativação de IDO, pelo ensaio padrão de HPLC serão necessários para a melhor compreensão de seu papel na doença.

A cultura de monócitos infectados *in vitro* pelo DENV-2, por 24h, não nos permitiu, no entanto, detectar nenhuma das duas enzimas iNOS ou IDO pela técnica aqui usada - imunoensaio em citometria de fluxo -, embora a carga viral detectada tenha sido intensa, quer pela detecção intracelular, quer pela

secreção de NS1. Estudos anteriores demonstraram a presença de iNOS na população de monócitos de pacientes infectados com DENV, bem como monócitos infectados *in vitro*. Este mesmo estudo também demonstrou que a detecção de iNOS ocorre em um ponto mais tardio da doença, de 3 a 6 dias (63), podendo ser este o motivo de não termos observado um aumento na detecção dessa enzima 24h após a infecção, dificultando também a eficácia dos tratamentos. Uma cinética de cultura mais prolongada ou o uso de técnicas de biologia molecular (detecção de RNA, p.ex) seriam necessários para que esses dados possam ser obtidos.

Estudos com culturas primárias apresentam algumas limitações que devem ser consideradas, como a necessidade de operadores experientes que utilizem condições assépticas adequadas no manuseio das culturas, morte celular após períodos prolongados de cultura, entre outras.

A divergência entre estes resultados sugere que o sorotipo viral pode estar relacionado à uma maior ou menor indução de IDO e iNOS, na dengue, e que a indução da mesma pode estar associada à um período mais tardio da doença, não tendo, por este motivo, sido detectada 24h após a infecção *in vitro* dos monócitos. Por este motivo, torna-se relevante estudos posteriores que permitam detectar tais enzimas em diferentes tempos de infecção, bem como em infecções com diferentes sorotipos do Dengue. Em outras doenças, como na infecção de monócitos pela *Micobacterium leprae* observou-se um aumento na enzima IDO, 24h após a infecção destas células, por um mecanismo dependente de IL-10. O bloqueio desta citocina reduziu a atividade da enzima, avaliada através da taxa quinurenina/triptofano (226).

Os tratamentos por 24h de culturas de monócitos infectados com estimuladores e inibidores de IDO e iNOS nos levaram a deduções interessantes. O tratamento de LPS+IFN- γ , usado com o intuito de estimular a IDO, de fato estimulou essa enzima em monócitos 24h depois. Além disso, esse aumento de IDO esteve associado com a diminuição da carga viral, quer seja pela detecção de antígenos intracelulares quanto secretados (NS1). Esses dados sugerem o envolvimento da IDO no controle da replicação viral, já que o tratamento com LPS+IFN- γ não estimulou a expressão de iNOS nesse período. Apesar de não ser o tratamento ideal para o estímulo de IDO, o uso de LPS+IFN- γ já foi utilizado previamente em outros estudos e demonstrou maior

eficiência na indução da atividade desta enzima, quando comparado ao uso apenas de IFN- γ , o qual seria mais adequado para este estudo (239). De fato, uma das limitações deste trabalho é a ausência da dosagem de NO ou da avaliação da expressão de iNOS, de forma a garantir que esta enzima não tenha influenciado no resultado observado para IDO no controle da replicação viral, uma vez que iNOS também pode ser estimulada por LPS+IFN- γ . Outra limitação importante do estudo foi a ausência de um tratamento com o inibidor de IDO, o 1-metil-triptofano (1-MT), para comprovar a participação da IDO no efeito antiviral observado. Este inibidor foi utilizado nos ensaios iniciais (10 $\mu\text{g/mL}$), após os devidos testes para avaliar a concentração ideal a ser utilizada nas culturas de monócitos primários. Porém, a falta de eficácia observada nos ensaios seguintes levou à exclusão deste inibidor para os demais ensaios e, por isso, não foi demonstrado neste estudo. Possivelmente uma nova avaliação das concentrações ideais deste inibidor para culturas de monócitos primários, bem como o aumento no número de doadores utilizados e a realização de uma cinética de detecção de IDO, com o uso de seu inibidor, ajude a esclarecer, com maior precisão, as questões relativas ao papel da IDO na dengue.

A futura determinação da carga viral dos pacientes infectados pelo DENV, usados neste estudo, também poderá ajudar a elucidar o papel da IDO no controle da replicação viral, através da quantificação do RNA viral pela técnica do RT-PCR. Podemos especular que algumas citocinas, principalmente TNF- α possam também estar envolvidos neste controle viral, já que essa citocina pode ter propriedades antivirais (263, 264) e que a IDO pode ser induzida pela citocina TNF- α (220).

O doador de NO (SNAP), foi capaz de diminuir a carga viral, quer pela detecção intracelular, quer pela detecção de NS1 secretado na cultura, confirmando o papel dessa molécula no *clearance* viral. O estímulo de células de neuroblastoma de ratos, infectadas com DENV-2, com o mesmo doador de NO utilizado em nosso estudo, o SNAP, é capaz de regular negativamente a síntese do RNA viral, culminando na redução de NS1 (181). Da mesma forma, a inibição desta molécula, pelo inibidor L-NMMA, reverteu a ação do NO, causando um aumento na replicação viral, avaliado pelo ensaio da taxa de NS1, por ELISA. De forma contraditória, este inibidor levou ao aumento da detecção de antígenos virais, através da técnica de citometria de fluxo. Porém,

o ensaio de ELISA de NS1 é mais sensível e confiável para avaliação da carga viral, uma vez que esta proteína acumula-se com o tempo e pode ser mais facilmente detectada no sobrenadante das culturas. Por outro lado, a avaliação da carga viral através da técnica de citometria de fluxo não permite, por exemplo, a detecção de antígenos virais em células que sofreram morte celular após a infecção. Sendo assim, o resultado mais esperado e considerado para o efeito do inibidor de NO neste estudo é o ensaio de ELISA de NS1.

O inibidor de NO (L-NMMA), além de aumentar a frequência de células CD16-, também gerou uma redução na frequência das células CD16+. Como se sabe, o NO é um potente antiviral nas infecções pelo DENV e é induzido pela enzima iNOS (63, 172, 181), detectada em maior proporção no estudo *in vivo* em pacientes, nas células CD16-, como foi discutido. Uma redução na produção de NO, ainda que não detectável pelo imunoenensaio da iNOS, pode estar acarretando uma resposta do sistema imune ao elevar a população de monócitos clássicos CD16-, onde há uma detecção de iNOS mais intensa, da mesma forma que reduz a população CD16+, afim de evitar uma maior ativação celular. Além disso, outros fatores podem estar envolvidos neste mecanismo regulador. A citocina TNF- α , relacionada em nosso estudo com populações de monócitos CD14+ expressando iNOS, também é importante para a indução desta enzima, podendo interferir nas frequências das subpopulações observadas.

Já na população de monócitos CD14+CD16+, a inibição da molécula NO aumentou a detecção de IDO, corroborando com os trabalhos que demonstram que o óxido nítrico é capaz de inibir a atividade de IDO, dependendo de sua concentração no ambiente (238, 239). Sendo assim, uma vez que a ação do NO foi inibida, a detecção de IDO foi elevada, possivelmente pelo aumento também em sua atividade. Esse resultado demonstra, pela primeira vez, que o NO interfere na atividade desta enzima, na dengue.

Muito interessante são as evidências de que tanto a IDO quanto a iNOS sejam induzidas pelo IFN- γ e que, no entanto, a molécula de NO seja capaz de inibir a atividade de IDO. Estudos com as linhagens de células monocíticas THP-1 e U-937 demonstraram que o NO causa um efeito bimodal na função de IDO, em células estimuladas por IFN- γ . Altas concentrações micromolares dos doadores de NO, SIN-1 e DETA-NO, reduziram a atividade de IDO, enquanto

baixas concentrações micromolares destes doadores de NO aumentaram a atividade desta enzima (239).

Esta enzima desempenha um papel imunossupressor, criando um ambiente que inibe respostas de células T antígeno-específicas, além disso, os metabólitos gerados pela degradação do triptofano levam à inibição da proliferação destas células, sua apoptose e anergia (205, 265, 266). O papel desta enzima na dengue, no entanto, ainda não está claro. Poucos estudos demonstram a ação dessa enzima na doença, e sua atividade antiviral relatada não está bem definida (241).

Determinamos a presença dessas enzimas nas diferentes subpopulações de monócitos de pacientes com dengue e encontramos uma detecção mais intensa de iNOS na população conhecida como monócitos clássicos (CD14+CD16-), enquanto a intensidade da IDO foi maior em monócitos não clássicos (CD14+CD16+), independentemente da gravidade da doença. Monócitos infectados *in vitro* pelo DENV-2 também apresentaram um aumento de iNOS associado à subpopulação CD14+CD16-, embora não alterada em 24h em relação aos controles. Não houve alteração na detecção de IDO e de Ags virais entre as subpopulações estudadas, onde a detecção de IDO e a taxa de infecção foram as mesmas tanto nas culturas infectadas quanto nas controles. Estudos demonstraram que as duas subpopulações de monócitos são igualmente infectadas *in vitro* pelo DENV (258, 259), corroborando nossos resultados.

O fato de cada enzima ser encontrada, majoritariamente, em uma subpopulação diferente pode ser explicado pelo fato, citado anteriormente, de diferentes concentrações da molécula NO, induzida pela expressão de iNOS, serem capazes de inibir a atividade de IDO (238). Com isso, onde há uma maior indução de iNOS e conseqüentemente uma maior produção de NO, haveria também uma menor detecção de IDO.

Ambas as enzimas iNOS e IDO foram encontradas em subpopulações de monócitos em diversas outras condições clínicas diferentes da dengue (199, 240, 267), mas esta é a primeira vez que foi demonstrada sua associação com uma subpopulação específica. Os monócitos clássicos, CD16-, são conhecidos por serem anti-inflamatórios e assim produzem citocinas com um papel mais protetor na dengue (259). A detecção mais intensa de iNOS nesta

subpopulação poderia indicar seu papel antiviral na doença e, possivelmente, contribuir para o perfil descrito para esta subpopulação clássica. Além disso, os monócitos não clássicos, CD16+, são conhecidos por serem pró-inflamatórios e relacionados à produção de algumas citocinas que levam à gravidade da dengue (259). A presença de IDO em maior intensidade nesta subpopulação pode indicar uma reação do sistema imunológico para controlar a resposta inflamatória, uma vez que a IDO tem um papel chave na indução de células T reguladoras (268).

Uma das principais características da gravidade da dengue é a chamada "tempestade de citocinas", onde há uma produção exacerbada de vários mediadores inflamatórios. Várias citocinas e outros fatores como TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-18, IL-10 e IL-8, estão relacionados com a gravidade da doença quando produzidos em altos níveis (51). Estes mediadores podem promover a ativação plaquetária e endotelial, resultando em trombocitopenia, permeabilidade vascular, hipotensão e choque, como visto em casos graves (142). Durante a fase aguda, as citocinas inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , bem como a anti-inflamatória IL-10 e a quimiocina CXCL10/IP-10 foram encontradas elevadas em crianças (157). Demonstramos aqui que a infecção aguda por DENV-4 também foi capaz de estimular a produção de mediadores inflamatórios importantes como o NO, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-10 e IP-10.

As moléculas de NO e IFN- γ possuem importantes funções antivirais na resposta à infecção por diferentes sorotipos de DENV e, neste estudo, seu aumento sugere sua possível relação com a característica mais branda observada na infecção pelo sorotipo 4. Alguns autores afirmam que o IFN- γ é essencial para a resposta antiviral de camundongos infectados com DENV-2 (164, 165). A idéia de que a produção desta citocina é essencial para o controle da replicação viral e resistência à infecção também é corroborada pela correlação entre o aumento da produção de IFN- γ e altas taxas de sobrevivência de pacientes com FHD. Uma série de investigações relataram um aumento nos níveis de IFN- γ durante a fase aguda da dengue, mas sua função na gravidade ou proteção não é muito clara. Níveis elevados de IFN- γ em pacientes tailandeses adultos infectados com DENV-2 foram encontrados em pacientes com FD comparados com FHD (269).

Sabe-se que monócitos infectados *in vitro* também possuem a capacidade de produzir diversos mediadores inflamatórios, com funções importantes na dengue (244, 245). De forma surpreendente, em nosso estudo, a infecção de monócitos, *in vitro*, pelo DENV-2 não alterou a produção de citocinas/quimiocinas, tais como IL-10, MCP-1, TNF- α e IFN- α , 24h após a infecção. Possivelmente, este fato se deve ao período precoce de dosagem destes mediadores frente aos demais estudos, que utilizam o ponto de 48h após a infecção ou devido à uma característica mais agressiva do inóculo viral concentrado utilizado aqui, gerando a morte de células infectadas e, com isso a não detecção de citocinas/quimiocinas produzidas frente à infecção. De fato, monócitos infectados com DENV-2 expressam níveis mais elevados do receptor de morte Fas (CD95) e, deste modo, são susceptíveis a processos apoptóticos (244).

Por outro lado, o estímulo com LPS+IFN- γ , bem como o inibidor de NO, foram ambos capazes de aumentar a produção de praticamente todas as citocinas/quimiocinas analisadas, com exceção do IFN- α , sugerindo fortemente que a indução deIDO leva à produção elevada de IL-10, MCP-1 e TNF- α , em culturas de monócitos infectados *in vitro* com o DENV-2. A IDO está correlacionada às células CD4+CD25+Foxp3+, além de sua ativação induzir a mudança do perfil de células T para o perfil regulatório, responsável pela produção da citocina IL-10 (262, 266, 268). Esta enzima ainda possui reconhecida ação antimicrobiana, demonstrando estar envolvida na resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. gondii*, por um mecanismo dependente de IFN- γ e IRF-1 (224). Outra molécula com propriedades antivirais descrita em infecções pelo DENV e que está elevada neste estudo com DENV-4 é, como temos enfatizado, o NO. Levy e colaboradores (2010) demonstraram uma associação entre o aumento dos níveis de NO com manifestações brandas de dengue, sugerindo um papel protetor do NO na infecção pelo DENV, *in vivo*. Níveis elevados de NO também foram observados em sobrenadantes de cultura de monócitos infectados, demonstrando que o NO está envolvido na infecção pelo DENV e que os monócitos podem ser uma fonte importante de sua produção (184). A produção de NO, como se sabe, é importante para a atividade antiviral na dengue e, com isso, sua inibição observada aqui levou à uma maior carga viral e, possivelmente a consequente ativação do sistema

imune, com aumento na produção de citocinas tanto pró-inflamatórias, como MCP-1 e TNF- α como anti-inflamatórias, tal como a IL-10, pelas células infectadas.

A infecção por células THP-1 (linhagem monocítica) com isolados clínicos de baixa passagem também estimula a produção de NO, relacionada à diminuição do número de cópias do RNA viral detectado (182). De acordo com esses estudos, o papel do NO na infecção pelo DENV parece estar relacionado à proteção do hospedeiro, estimulando uma resposta antiviral e colaborando para o controle da infecção. Seu aumento nos pacientes infectados com o sorotipo 4 do vírus Dengue pode ser uma explicação para a característica mais branda desta infecção, juntamente com um aumento na produção de IFN- γ . Eventualmente níveis muito elevados de IFN- γ podem exercer um efeito patológico aumentando, por exemplo a permeabilidade vascular, entre outros efeitos (146).

Além dessas moléculas com funções protetoras, também foi observado um aumento nas citocinas e quimiocinas relacionadas à gravidade da doença. Altos níveis circulantes de TNF- α têm sido associados a casos graves de dengue (152). Esta citocina foi uma das primeiras a ser descrita como estando relacionada à gravidade da doença (143, 145, 155, 156). Alguns estudos demonstraram que sua associação com a gravidade pode estar relacionada ao sorotipo infectante (146, 147) e a presença de um polimorfismo do gene *CLEC-5A* (112). Os níveis plasmáticos da quimiocina MCP-1 também foram associados com um quadro clínico significativo de dengue, a trombocitopenia. Podemos contestar que, embora aumentados, os níveis de TNF- α aqui mostrados são bem baixos, provavelmente sendo mais benéficos do que deletérios. Além disso, os níveis aumentados de MCP-1 também foram correlacionados com hipotensão (146). Foi demonstrado que os monócitos humanos, infectados *in vitro* pelo DENV, são capazes de produzir MCP-1, bem como sua atribuição ao aumento da permeabilidade vascular, em células endoteliais (144). Recentemente, também foi demonstrado por nossa equipe que os pacientes com dengue, durante uma infecção aguda, têm níveis elevados de MCP-1 (148).

A IL-10 e CXCL10/IP-10 foram recentemente atribuídas à indução de extravasamento vascular e alterações na disfunção hepática, em crianças com

dengue (157). Na Malásia, tanto a IL-10 como a IP-10 foram relatadas estarem elevadas em pacientes adultos com dengue (158). Os pacientes com FHD apresentaram níveis mais elevados de IL-10 em relação aos FD e correlacionados com índices de efusão pleural (149). Outros estudos, no entanto, não encontraram diferenças entre pacientes brandos e graves em infecções pelo DENV (159). Um dos mecanismos pelos quais a IL-10 poderia estar contribuindo para a patogênese da dengue é a inibição de respostas de células T específicas para o DENV. Na resposta de células T aos peptídeos NS3 do DENV, o bloqueio da IL-10 aumentou significativamente algumas respostas antivirais, tais como a produção de IFN- γ , expressão de CD107a e produção de TNF- α (151). O aumento de CXCL10/IP-10 foi relatado anteriormente por nossa equipe em pacientes com um sorotipo viral diferente (148). O aumento dessas citocinas/quimiocinas em pacientes infectados com DENV-4 resulta da ativação do sistema imunológico e de importantes células-alvo do vírus, como monócitos, por este sorotipo. O equilíbrio entre a elevação dos mediadores inflamatórios, acompanhada pelo aumento dos fatores anti-inflamatórios tem um papel fundamental nos resultados das infecções. Como é sabido, a IL-10 pode ser um potencial biomarcador preditor da gravidade da doença (157, 270), mas também uma potente citocina anti-inflamatória (271). O aumento da produção desta citocina, em nosso grupo de pacientes, poderia ser uma estratégia do sistema imune para controlar a produção de citocinas pró-inflamatórias, também observada neste estudo.

Nós também demonstramos uma correlação entre a produção de alguns mediadores inflamatórios com as subpopulações de monócitos estudadas. Observou-se uma associação negativa entre a subpopulação clássica de monócitos, CD14+CD16-, com a citocina IL-10 e a quimiocina IP-10/CXCL10. Conforme demonstrado neste estudo, nesta subpopulação também foi observado um aumento na detecção da enzima iNOS, a qual colabora na resposta antiviral do hospedeiro contra o DENV-2, em camundongos (165) e humanos (272). A IL-12 em conjunto com a IL-18 parece ser essencial para a indução de NOS2, levando à resistência do hospedeiro contra a infecção pelo DENV (165). Sabe-se que a iNOS pode desempenhar um papel importante na resposta antiviral durante a infecção por dengue, induzindo a produção de óxido nítrico, conhecido pelas suas funções antivirais (181, 192). Sendo assim,

a maior detecção de iNOS nesta subpopulação pode colaborar para o controle da infecção, e conseqüentemente, para uma menor produção de IP-10/CXCL10 e também de IL-10.

Demonstrou-se, também, uma associação positiva entre a população de monócitos que expressam iNOS (CD14+iNOS+) com algumas importantes citocinas/quimiocinas, como TNF- α , tanto em pacientes com DENV-4 quanto em doadores infectados *in vitro* pelo DENV-2, além da IL-10 e CXCL10/IP-10. Os monócitos são importantes células-alvo do vírus e, quando ativados, são capazes de produzir mediadores anti e pró-inflamatórios (62, 244, 245). A detecção de iNOS nestas células poderia atuar como um mecanismo antiviral e protetor do organismo contra a infecção e frente à produção aumentada destas citocinas/quimiocinas devido à presença de partículas virais nestas células. Em doadores infectados *in vitro* pelo DENV-2, também foi observada uma correlação positiva entre a população CD14+CD16+ e a quimiocina MCP-1. Como mencionado anteriormente, esta subpopulação é conhecida por ser majoritariamente pró-inflamatória, produzindo algumas citocinas de importância na gravidade da dengue (259).

A associação das células CD14+iNOS+ com citocinas/quimiocinas, como TNF- α , IP-10/CXCL10 e MCP-1/CCL2 indicam ativação celular, e a correlação com IL-10, possivelmente, reflete um mecanismo controlador do processo inflamatório.

Entre as subpopulações de monócitos que expressam a enzima IDO, foi demonstrado neste estudo uma correlação positiva entre a população CD14+CD16+IDO+ com a citocina IL-10. Considerando o aumento dos níveis plasmáticos de IL-10 observados aqui, em pacientes com DENV-4, podemos especular que a detecção de IDO nesta subpopulação de monócitos, pode gerar um ambiente imunorregulador, uma vez que ela está ligada à indução da diferenciação de células T para o perfil T regulador (268), essencial na regulação do sistema imune e capaz de produzir citocinas inibitórias como a IL-10. Como sabemos, a IL-10 está envolvida na manutenção do equilíbrio entre a eliminação de patógenos e a imunopatologia durante infecções virais (273). Frequências de células T reguladoras estão aumentadas em casos brandos de dengue (274), e pode ser uma explicação para a característica mais branda da infecção pelo DENV-4, uma vez que a IDO está aumentada nestes pacientes.

Além disso, observamos em resultados preliminares um aumento da frequência de células Treg em pacientes brandos infectados com DENV-4, em comparação com pacientes graves infectados com DENV-2 (dados não publicados).

A população CD16-IDO+ também está positivamente correlacionada com a produção da citocina IL-10, indicando um mecanismo regulador desta enzima em ambas as subpopulações de monócitos. Além disso, a indução de IDO na população clássica, CD14+CD16-, pode estar associada à produção de TNF- α , uma vez que esta citocina é um indutor de IDO e tem sido positivamente correlacionada com esta subpopulação (220).

Em resumo, relatamos que pacientes com DENV-4 apresentaram aumento na detecção de iNOS e IDO em diferentes subpopulações de monócitos, além da expansão de células CD14+CD16+. Estes pacientes também mostraram aumento na produção de NO e algumas citocinas/quimiocinas durante a fase aguda da infecção.

6- Conclusões

A dengue é uma doença relacionada à ativação do sistema imune, envolvendo diversos mecanismos reguladores e células-alvo em sua patogênese. Porém, o papel dos diversos fatores envolvidos na doença ainda não está esclarecido. Baseado nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o sorotipo 4 do DENV possui uma característica mais branda, causando infecções com manifestações clínicas menos graves, além de não causar grandes alterações nos exames laboratoriais dos pacientes infectados. Por outro lado, bem como outros sorotipos do Dengue, ele é capaz de ativar o sistema imunológico, levando à produção de citocinas e quimiocinas e induzindo enzimas como iNOS e IDO. Subpopulações de monócitos não clássicos (CD14+CD16+) apresentam uma frequência aumentada em decorrência da infecção. Além disso, a associação de subpopulações clássicas (CD14+CD16-) com a enzima iNOS e da subpopulação não clássica (CD14+CD16+) com a IDO, bem como suas correlações com citocinas como IL-10 destaca um possível papel imunorregulador para estas subpopulações de monócitos. O aumento na produção da molécula NO, importante fator antiviral na dengue, sugere o envolvimento deste mediador no padrão mais branda de infecção pelo sorotipo 4 do Dengue.

Ainda, conclui-se que a infecção *in vitro* de monócitos humanos pelo sorotipo 2 do Dengue, apesar de aumentar a detecção dos Ags e da carga viral, não foi capaz de ativar o sistema imunológico, 24 horas após a infecção, uma vez que não alterou a frequência de monócitos não clássicos (CD14+CD16+), a produção de mediadores inflamatórios e a indução das enzimas iNOS e IDO. Possivelmente, a indução dessas enzimas ocorre em um ponto mais tardio da infecção ou é influenciada pelo sorotipo viral, uma vez que pacientes infectados com DENV-4 foram capazes de ativar ambas as enzimas. Também podemos sugerir, pela primeira vez, que a IDO está envolvida na redução da taxa de infecção de monócitos, bem como da carga viral, indicando um possível papel antiviral desta enzima na dengue, além de sua capacidade de influenciar na ativação do sistema imune, aumentando a produção de citocinas e quimiocinas envolvidas na doença. Além da IDO, a molécula de NO

também possui uma importante ação antiviral na dengue, reduzindo a infecção de monócitos pelo DENV-2.

Por fim, destaca-se neste estudo a importância das subpopulações de monócitos, bem como das enzimas iNOS e IDO na proteção e regulação do sistema imune na patogenia da dengue.

7- Referências bibliográficas

1. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control 2009;New edition: 160.
2. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis.* 2016 Jun;16(6):712-23.
3. Kimura R, Hotta S. Studies on dengue virus (VI). On the inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi.* 1944;3379:629-33.
4. Sabin AB, Schlesinger MC. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science.* 1945;101:640-2.
5. Hammon WMCD. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Transactions of the Association of American Physicians.* 1960;73:140-55.
6. Mairuhu AT, Wagenaar J, Brandjes DP, van Gorp EC. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004 Jun;23(6):425-33.
7. Holmes EC. RNA virus genomics: a world of possibilities. *J Clin Invest.* 2009 Sep;119(9):2488-95.
8. Twiddy SS, Woelk CH, Holmes EC. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *Journal of General Virology.* 2002;83:1679-89.
9. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as global public health problem. New York: CAB International: In: DJ Gubler e G Kuno (ed). 1997.
10. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jul;11(3):480-96.
11. Gubler DJ, Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res.* 1999;53:35-70.
12. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Vald s L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis.* 1999 Spring;3(3):130-5.

13. Kouri G. [Dengue, a growing problem of health in the Americas]. *Rev Panam Salud Publica*. 2006 Mar;19(3):143-5.
14. Meira R. "Urucubaca" flu or dengue? *Dengue*. *Med Clin Sao Paulo*. 1916:273-85.
15. Pedro A. O dengue em Nictheroy. *Brazil Med*. 1923;1:173-7.
16. Osanai CH, Rosa AP, Tang AT, Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1983;25:53-4.
17. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araujo ES, de Filippis AM, et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 May-Jun;94(3):297-304.
18. Teixeira Mda G, Costa Mda C, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica*. 2005 Sep-Oct;21(5):1307-15.
19. 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.
20. Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95 Suppl 1:179-81.
21. Lourenco-de-Oliveira R, Honorio NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguacu, State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Sep;97(6):799-800.
22. Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simoes JB, Nogueira Fde B, da Rocha Queiroz Lima M, et al. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2095.
23. Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011 May;17(5):938-40.
24. Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourao MP, et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Apr;14(4):667-9.

25. SVS. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 27, 2016. Boletim epidemiológico- Secretaria de Vigilância em Saúde- Ministério da Saúde. 2016;47(31).
26. SES. Boletim epidemiológico- Dengue semana 1 a 7. Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul. 2014(6).
27. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in microbiology*. 2002 Feb;10(2):100-3.
28. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):13-22.
29. WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva 2009.
30. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):504-7.
31. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Aug;67(16):2773-86.
32. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23-61.
33. 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.
34. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*. 2004 Apr;113(7):946-51.
35. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Dec;8(12 Suppl):S7-16.
36. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990 Oct;3(4):376-96.
37. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006 Oct;87(Pt 10):2755-66.

38. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* 2008 Apr;3(2):155-65.
39. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006 Dec;80(23):11418-31.
40. Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 2002 Jun;76(11):5480-91.
41. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.
42. Lee E, Weir RC, Dalgarno L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. *Virology.* 1997 Jun 9;232(2):281-90.
43. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 10;100(12):6986-91.
44. Chang GJ. Molecular biology of Dengue virus. In: GUBLER, D J; KUNO, G (Ed) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* 1997:175-97.
45. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol.* 1999 Jul;73(7):6104-10.
46. Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Science translational medicine.* [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2015 Sep 9;7(304):304ra141.
47. Falgout B, Chanock R, Lai CJ. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J Virol.* 1989 May;63(5):1852-60.
48. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002 Oct 15;186(8):1165-8.

49. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2006 Oct;19(5):429-36.
50. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006 Apr 15;193(8):1078-88.
51. Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;338:67-82.
52. Lin SW, Chuang YC, Lin YS, Lei HY, Liu HS, Yeh TM. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *J Infect.* 2012 Mar;64(3):325-34.
53. Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 28;110(22):E2046-53.
54. Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008 Feb;40(2):91-101.
55. Sampath A, Xu T, Chao A, Luo D, Lescar J, Vasudevan SG. Structure-based mutational analysis of the NS3 helicase from dengue virus. *J Virol.* 2006 Jul;80(13):6686-90.
56. Preugschat F, Strauss JH. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology.* 1991 Dec;185(2):689-97.
57. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 25;100(24):14333-8.
58. McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem.* 2011 Jun 24;286(25):22147-59.
59. Kelley JF, Kaufusi PH, Volper EM, Nerurkar VR. Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology.* 2011 Sep 15;418(1):27-39.

60. Rothman AI. Viral pathogenesis of dengue infections. IDJGeGK, New York: CAB International. 1997.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):476-81.
65. Bunyaratvej A, Butthep P, Yoksan S, Bhamarapravati N. Dengue viruses induce cell proliferation and morphological changes of endothelial cells. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28 Suppl 3:32-7.
66. 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.
67. 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.
68. Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, et al. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol*. 2002 Dec;76(23):12242-9.
69. 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.
70. 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.

71. Kyle JL, Beatty PR, Harris E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *J Infect Dis.* 2007 Jun 15;195(12):1808-17.
72. King CA, Marshall JS, Alshurafa H, Anderson R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J Virol.* 2000 Aug;74(15):7146-50.
73. De La Guardia C, Leonart R. Progress in the identification of dengue virus entry/fusion inhibitors. *Biomed Res Int.* 2014;2014:825039.
74. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses.* 2011 Feb;3(2):160-71.
75. Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005 Apr;79(8):4557-67.
76. Mercado-Curiel RF, Esquinca-Aviles HA, Tovar R, Diaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Munoz Mde L. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol.* 2006 Oct 02;6:85.
77. Yazı Mendoza M, Salas-Benito JS, Lanz-Mendoza H, Hernandez-Martinez S, del Angel RM. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jul;67(1):76-84.
78. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 1997 Aug;3(8):866-71.
79. Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology.* 2000 Nov;32(5):1069-77.
80. Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology.* 2002 Jan 5;292(1):162-8.
81. 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.

82. 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.
83. Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol.* 2004 Nov;78(22):12647-56.
84. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe.* 2009 Apr 23;5(4):318-28.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. Miller JL, de Wet 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.
89. Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature.* 2008 May 29;453(7195):672-6.
90. Carlos CC, Oishi K, Cinco MT, Mapua CA, Inoue S, Cruz DJ, et al. Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Aug;73(2):435-40.
91. Guzman MG, Vazquez S. [Notes on the laboratory diagnosis of dengue virus]. *Rev Cubana Med Trop.* 2002 Sep-Dec;54(3):180-8.

92. Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, Siripanichgon K. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J Clin Virol*. 2007 Jun;39(2):76-81.
93. Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, et al. Dengue--how best to classify it. *Clin Infect Dis*. 2011 Sep;53(6):563-7.
94. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 2004 Oct;80(948):588-601.
95. Torres E. Dengue. *Estudos Avançados*. 2008;22(64):33-52.
96. WHO. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 1997(2 ed. Geneva: World Health Organization).
97. Yacoub S, Mongkolsapaya J, Scream G. The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Jun;26(3):284-9.
98. Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martinez E, et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis*. 2011 Apr 21;11:106.
99. Gan VC, Lye DC, Thein TL, Dimatatac F, Tan AS, Leo YS. Implications of discordance in world health organization 1997 and 2009 dengue classifications in adult dengue. *PLoS One*. 2013;8(4):e60946.
100. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1977 May;26(3):337-43.
101. Halstead SB, Simasthien P. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med*. 1970 Apr;42(5):276-92.
102. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol*. 1984 Nov;120(5):653-69.
103. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg*. 1990 Feb;42(2):179-84.

104. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis.* 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S830-9.
105. 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.
106. Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature.* 1977 Feb 24;265(5596):739-41.
107. Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ.* 2005 Apr;83(4):308-14.
108. Halstead SB. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D J; KUNO, G (Ed) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* 1997:23-44.
109. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;60:421-67.
110. Mathew A, West K, Kalayanarooj S, Gibbons RV, Srikiatkachorn A, Green S, et al. B-cell responses during primary and secondary dengue virus infections in humans. *The Journal of infectious diseases.* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2011 Nov 15;204(10):1514-22.
111. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003 May;27(1):1-13.
112. Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, de Souza Santos R, Goncalves Cruz O, et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: a case-control, functional and meta-analysis study. *Infect Genet Evol.* 2013 Dec;20:197-205.
113. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol.* 2000 Feb;8(2):74-7.
114. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis.* 1995 Apr-Jun;1(2):55-7.
115. Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):816-20.

116. Huang KJ, Yang YC, Lin YS, Huang JH, Liu HS, Yeh TM, et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol*. 2006 Mar 1;176(5):2825-32.
117. Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Green S, et al. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Jan;58(1):96-101.
118. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res*. 2008;72:1-76.
119. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997 Apr 14;230(2):244-51.
120. Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, et al. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol*. 2004 Nov;138(2):299-303.
121. Lin CF, Lei HY, Shiao AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol*. 2003 Jan;69(1):82-90.
122. Falconar AK. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 May;14(5):493-504.
123. Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, et al. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest*. 2008 Oct;88(10):1079-89.
124. Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011 May 1;236(5):515-23.
125. Cheng HJ, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Luo YH, et al. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Jan;234(1):63-73.
126. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol*. 2006 Summer;19(2):127-32.

127. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis.* 1998 Jan-Mar;4(1):89-92.
128. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ.* 1989;67(4):375-80.
129. 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.
130. Fang X, Hu Z, Shang W, Zhu J, Xu C, Rao X. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Nov;66(2):134-46.
131. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj 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.
132. 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.
133. Kalayanaroj S, Gibbons RV, Vaughn D, Green S, Nisalak A, Jarman RG, et al. Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *J Infect Dis.* 2007 Apr 1;195(7):1014-7.
134. 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.
135. 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.
136. Chen RF, Wang L, Cheng JT, Chuang H, Chang JC, Liu JW, et al. Combination of CTLA-4 and TGFbeta1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. *Clin Immunol.* 2009 Jun;131(3):404-9.

137. Lan NT, Hirayama K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Trop Med Health*. 2011 Dec;39(4 Suppl):73-81.
138. 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 May;37(5):507-13.
139. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002 Jan;2(1):33-42.
140. Butthep P, Chunhakan S, Yoksan S, Tangnararatchakit K, Chuansumrit A. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Dec;31(12):e232-8.
141. 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.
142. Fink J, Gu F, Vasudevan SG. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol*. 2006 Jul-Aug;16(4):263-75.
143. 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.
144. 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.
145. 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.
146. 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.

147. 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.
148. de-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setubal S, et al. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1beta and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Feb;107(1):48-56.
149. Green S, Vaughn DW, Kalayanaraj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol*. 1999 Nov;59(3):329-34.
150. Kumar Y, Liang C, Bo Z, Rajapakse JC, Ooi EE, Tannenbaum SR. Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1887.
151. Malavige GN, Jeewandara C, Alles KM, Salimi M, Gomes L, Kamaladasa A, et al. Suppression of virus specific immune responses by IL-10 in acute dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(9):e2409.
152. Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. *Am J Pathol*. 2013 Jun;182(6):1950-61.
153. Zellweger RM, Prestwood TR, Shresta S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. *Cell host & microbe*. 2010 Feb 18;7(2):128-39.
154. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2003 Jan 21;35(1):33-42.
155. Iyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med J*. 1995 Apr;36(2):218-21.
156. Kuno G, Bailey RE. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994 Apr-Jun;89(2):179-82.
157. Ferreira RA, de Oliveira SA, Gandini M, Ferreira Lda C, Correa G, Abiraude FM, et al. Circulating cytokines and chemokines associated with

plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. *Acta Trop.* 2015 Sep;149:138-47.

158. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One.* 2012;7(12):e52215.

159. Torrentes-Carvalho A, Hottz ED, Marinho CF, da Silva JB, Pinto LM, Fialho LG, et al. Characterization of clinical and immunological features in patients coinfecting with dengue virus and HIV. *Clin Immunol.* 2016 Mar;164:95-105.

160. Ong SP, Lee LM, Leong YF, Ng ML, Chu JJ. Dengue virus infection mediates HMGB1 release from monocytes involving PCAF acetylase complex and induces vascular leakage in endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(7):e41932.

161. Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF- α in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine.* 2005 Jun 21;30(6):359-65.

162. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jul 15;11(8):532-43.

163. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor- α & interferon- γ in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res.* 2006 Jan;123(1):25-30.

164. Costa VV, Fagundes CT, Valadao DF, Cisalpino D, Dias AC, Silveira KD, et al. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1663.

165. Fagundes CT, Costa VV, Cisalpino D, Amaral FA, Souza PR, Souza RS, et al. IFN- γ production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Dec;5(12):e1449.

166. Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN- α /beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol.* 1998 Oct;10(5):383-90.

167. Munoz-Jordan JL. Subversion of interferon by dengue virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:35-44.
168. Morrison J, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. Innate immunity evasion by Dengue virus. *Viruses*. 2012 Mar;4(3):397-413.
169. Omur O, Daglyoz G, Akarca U, Ozcan Z. Subacute thyroiditis during interferon therapy for chronic hepatitis B infection. *Clin Nucl Med*. 2003 Oct;28(10):864-5.
170. De La Cruz Hernandez SI, Puerta-Guardo H, Flores-Aguilar H, Gonzalez-Mateos S, Lopez-Martinez I, Ortiz-Navarrete V, et al. A strong interferon response correlates with a milder dengue clinical condition. *J Clin Virol*. 2014 Jul;60(3):196-9.
171. Ignarro LJ. Physiological significance of endogenous nitric oxide. *Semin Perinatol*. 1991 Feb;15(1):20-6.
172. Dusse LMSV, L. M.; Carvalho, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003;39(4):350.
173. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.
174. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):2002-12.
175. Bogdan C. The multiplex function of nitric oxide in (auto)immunity. *J Exp Med*. 1998 May 4;187(9):1361-5.
176. Silva AA, Gonçalves RC. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*. 2010;40(4):994-1002.
177. Yang HC, Cheng ML, Ho HY, Chiu DT. The microbicidal and cytotregulatory roles of NADPH oxidases. *Microbes Infect*. 2011 Feb;13(2):109-20.
178. Paiva CN, Bozza MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal*. 2014 Feb 20;20(6):1000-37.
179. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993 Jun 15;268(17):12231-4.
180. James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev*. 1995 Dec;59(4):533-47.

181. Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy TP, Mammen MP, Jr., Libraty DH, Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *J Med Virol.* 2005 Sep;77(1):89-95.
182. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007 Feb;88(Pt 2):365-75.
183. Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol.* 2006 Oct;87(Pt 10):3003-11.
184. Levy A, Valero N, Espina LM, Anez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010 Jan;104(1):16-23.
185. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.
186. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 1994 Sep 23;78(6):927-30.
187. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5159-62.
188. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Nov;86(22):9030-3.
189. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul;87(13):5193-7.
190. Dusting GJ, Macdonald PS. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann Med.* 1995 Jun;27(3):395-406.
191. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 2001 Oct;22(10):556-60.

192. Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, Seguin MC, Klotz FW, Slayter M, et al. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett.* 1994 Dec;43(1-2):87-94.
193. Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):911-22.
194. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):103-15.
195. Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem.* 2003 Oct-Nov;384(10-11):1343-64.
196. Mungrue IN, Husain M, Stewart DJ. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev.* 2002 Oct;7(4):407-22.
197. Rees DD. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990;101:746-52.
198. Szabó C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. *New Horizons.* 1995;3(1):2-32.
199. Rouzaut A, Subira ML, de Miguel C, Domingo-de-Miguel E, Gonzalez A, Santiago E, et al. Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1451:319-33.
200. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, et al. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp Hematol.* 2004 Aug;32(8):748-55.
201. Olaghier D, Peri S, Steel C, van Montfoort N, Chiang C, Beljanski V, et al. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathog.* 2014 Dec;10(12):e1004566.
202. Cheng A, Han C, Fang X, Sun J, Chen X, Wan F. Extractable and non-extractable polyphenols from blueberries modulate LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in RAW264.7 macrophages via the NF-kappaB signalling pathway. *J Sci Food Agric.* 2016 Aug;96(10):3393-400.
203. Hayaishi O, Nozaki M. Nature and mechanisms of oxygenases. *Science.* 1969 Apr 25;164(3878):389-96.

204. Lancellotti S, Novarese L, De Cristofaro R. Biochemical properties of indoleamine 2,3-dioxygenase: from structure to optimized design of inhibitors. *Curr Med Chem*. 2011;18(15):2205-14.
205. Fallarino F, Grohmann U. Using an ancient tool for igniting and propagating immune tolerance: IDO as an inducer and amplifier of regulatory T cell functions. *Curr Med Chem*. 2011;18(15):2215-21.
206. Mackay GM, Forrest CM, Stoy N, Christofides J, Egerton M, Stone TW. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. *European Journal of Neurology*. 2006;13(1):30-42.
207. Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *Eur J Immunol*. 2012 Aug;42(8):1932-7.
208. Orabona C, Pallotta MT, Grohmann U. Different partners, opposite outcomes: a new perspective of the immunobiology of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Mol Med*. 2012 Jul 18;18:834-42.
209. Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res*. 2009;2:1-19.
210. Ferry G, Ubeaud C, Lambert PH, Bertin S, Coge F, Chomarat P, et al. Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem J*. 2005 May 15;388(Pt 1):205-15.
211. Pantouris G, Serys M, Yuasa HJ, Ball HJ, Mowat CG. Human indoleamine 2,3-dioxygenase-2 has substrate specificity and inhibition characteristics distinct from those of indoleamine 2,3-dioxygenase-1. *Amino Acids*. 2014 Sep;46(9):2155-63.
212. Metz R, Smith C, DuHadaway JB, Chandler P, Baban B, Merlo LM, et al. IDO2 is critical for IDO1-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation. *Int Immunol*. 2014 Jul;26(7):357-67.
213. Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, et al. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*. 2007 Jul 1;396(1):203-13.
214. Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Mar;41(3):467-71.

215. Yoshida R, Urade Y, Tokuda M, Hayaishi O. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Aug;76(8):4084-6.
216. Mellor AL, Chandler P, Baban B, Hansen AM, Marshall B, Pihkala J, et al. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol*. 2004 Oct;16(10):1391-401.
217. Musso T, Gusella GL, Brooks A, Longo DL, Varesio L. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood*. 1994 Mar 1;83(5):1408-11.
218. Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. The actions of interferon and antiinflammatory agents of induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in human peripheral blood monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 May 14;144(3):1147-53.
219. Dai W, Gupta SL. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *J Biol Chem*. 1990 Nov 15;265(32):19871-7.
220. Babcock TA, Carlin JM. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine*. 2000 Jun;12(6):588-94.
221. Hissong BD, Byrne GI, Padilla ML, Carlin JM. Upregulation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide, and interleukin-1. *Cell Immunol*. 1995 Feb;160(2):264-9.
222. Thomas SR, Stocker R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep*. 1999;4(5):199-220.
223. Xu H, Zhang GX, Ciric B, Rostami A. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol Lett*. 2008 Nov 16;121(1):1-6.
224. Silva NM, Rodrigues CV, Santoro MM, Reis LF, Alvarez-Leite JI, Gazzinelli RT. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma*

- gondii: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):859-68.
225. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):762-74.
226. de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol*. 2011 Aug;165(2):251-63.
227. de Souza Sales J. Papel imunossupressor da indoleamine 2,3 dioxigenase na Hanseníase. Tese (doutorado em Biologia Parasitária). 2010:128.
228. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol*. 2012 Nov;42(11):2925-36.
229. Liu WL, Lin YH, Xiao H, Xing S, Chen H, Chi PD, et al. Epstein-Barr virus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocyte-derived macrophages through p38/mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways: impairment in T cell functions. *J Virol*. 2014 Jun;88(12):6660-71.
230. Maria NI, van Helden-Meeuwsen CG, Brkic Z, Paulissen SM, Steenwijk EC, Dalm VA, et al. Association of Increased Treg Cell Levels With Elevated Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity and an Imbalanced Kynurenine Pathway in Interferon-Positive Primary Sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Jul;68(7):1688-99.
231. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999 May 3;189(9):1363-72.
232. Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, Munn DH. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol*. 2002 Apr 15;168(8):3771-6.
233. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*. 2002 Sep 13;297(5588):1867-70.

234. Puccetti P, Fallarino F. Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism. *Blood Cells Mol Dis.* 2008 Jan-Feb;40(1):101-5.
235. Grohmann U, Volpi C, Fallarino F, Bozza S, Bianchi R, Vacca C, et al. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat Med.* 2007 May;13(5):579-86.
236. Brastianos HC, Vottero E, Patrick BO, Van Soest R, Matainaho T, Mauk AG, et al. Exiguamine A, an indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor isolated from the marine sponge *Neopetrosia exigua*. *J Am Chem Soc.* 2006 Dec 20;128(50):16046-7.
237. Pereira A, Vottero E, Roberge M, Mauk AG, Andersen RJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors from the Northeastern Pacific Marine Hydroid *Garveia annulata*. *J Nat Prod.* 2006 Oct;69(10):1496-9.
238. Thomas SR, Terentis AC, Cai H, Takikawa O, Levina A, Lay PA, et al. Post-translational regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17;282(33):23778-87.
239. Lopez AS, Alegre E, Diaz A, Mugueta C, Gonzalez A. Bimodal effect of nitric oxide in the enzymatic activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocytic cells. *Immunol Lett.* 2006 Aug 15;106(2):163-71.
240. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Uribe-Urbe N, Avila-Casado C, Mancilla E, Morales-Buenrostro LE, et al. High levels of IDO-expressing CD16+ peripheral cells, and Tregs in graft biopsies from kidney transplant recipients under belatacept treatment. *Transplant Proc.* 2010 Nov;42(9):3489-96.
241. Becerra A, Warke RV, Xhaja K, Evans B, Evans J, Martin K, et al. Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. *J Gen Virol.* 2009 Apr;90(Pt 4):810-7.
242. Villar LA, Gelvez RM, Rodriguez JA, Salgado D, Parra B, Osorio L, et al. [Biomarkers for the prognosis of severe dengue]. *Biomedica.* 2013 Sep;33 Suppl 1:108-16.
243. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953-64.

244. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Dec;104(8):1091-9.
245. Reis SR, Sampaio AL, Henriques M, 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.
246. Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today*. 1996 Sep;17(9):424-8.
247. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989 Nov 15;74(7):2527-34.
248. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008 Feb;67(2):152-9.
249. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):584-92.
250. 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.
251. 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.
252. 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.
253. Spain-Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL. MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *J Med Virol*. 2001 Oct;65(2):324-30.
254. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 1996 Jan 1;87(1):373-7.

255. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3536-42.
256. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80.
257. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001 Jan;69(1):11-20.
258. Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*. 2010 Jun;130(2):202-16.
259. Wong KL, Chen W, Balakrishnan T, Toh YX, Fink K, Wong SC. Susceptibility and response of human blood monocyte subsets to primary dengue virus infection. *PLoS One*. 2012;7(5):e36435.
260. Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Pinto LM, Smith N, Despres P, et al. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN-alpha production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6):e2257.
261. Ellery PJ, Tippett E, Chiu YL, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, et al. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6581-9.
262. Villa Nova LG. Papel da indoleamina 2,3 dioxigenase na Infecção pelo Dengue. Dissertação (mestrado em Biologia Parasitária). 2015:98.
263. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annual review of immunology*. 1995;13:29-60.
264. Ruby J, Bluethmann H, Peschon JJ. Antiviral Activity of Tumor Necrosis Factor (TNF) Is Mediated via p55 and p75 TNF Receptors. *The Journal of experimental medicine*. 1997 05/28/received 08/22/revised;186(9):1591-6.
265. Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 2003 Aug;81(4):247-65.

266. Barth H, Raghuraman S. Persistent infectious diseases say - IDO. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in disease pathogenesis and implications for therapy. *Crit Rev Microbiol*. 2014 Nov;40(4):360-8.
267. Lopez-Moratalla N, Gonzalez A, Aymerich MS, Lopez-Zabalza MJ, Pio R, de Castro P, et al. Monocyte inducible nitric oxide synthase in multiple sclerosis: regulatory role of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997 Feb;1(1):95-104.
268. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):6752-61.
269. Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, et al. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 Apr 1;44(1):43-50.
270. Wilson EB, Brooks DG. The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;350:39-65.
271. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):170-81.
272. Jiang H, Stewart CA, Leu RW. Tumor-derived factor synergizes with IFN-gamma and LPS, IL-2 or TNF-alpha to promote macrophage synthesis of TNF-alpha and TNF receptors for autocrine induction of nitric oxide synthase and enhanced nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Immunobiology*. 1995 Apr;192(5):321-42.
273. Suvas S, Azkur AK, Kim BS, Kumaraguru U, Rouse BT. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4123-32.
274. Luhn K, Simmons CP, Moran E, Dung NT, Chau TN, Quyen NT, et al. Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):979-85.

Anexo 1. Artigo aceito

Journal: *Intervirology*

Antiviral and immunomodulatory effects of *Norantea brasiliensis* Choisy on Dengue virus-2

Luciana Gomes Fialho-Torres ^a, Vagner Pereira da Silva ^b, Sônia Regina Nogueira Ignácio Reis ^a, Elzinandes Leal Azeredo ^a, Maria Auxiliadora Coelho Kaplan ^c
Maria Raquel Figueiredo ^b, Claire Fernandes Kubelka ^{a,*}

^aLaboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

^bLaboratório de Química de Produtos Naturais 3, Instituto Tecnológico de Fármacos, FIOCRUZ.

^cInstituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ.

* *Corresponding author.*

Abstract

Background/Aims: Severe Dengue fever is a result of exacerbated immune responses and no specific treatments are available. We evaluated antiviral and immunomodulatory effects from the *Norantea brasiliensis* Choisy species. **Methods:** Human adherent monocytes infected *in vitro* with Dengue virus (DENV)-2 were incubated with the leave crude ethanolic extract (NB1) and three fractions derived from its dichlorometanic (NB3), ethyl acetate (NB5) and butanolic (NB6) partitions. The antiviral and immunomodulatory activities were determined by intracellular detection of DENV antigen within monocytes and by secreted NS1 viral protein and cytokines. **Results:** The crude extract sole exhibit both antiviral activities and all fractions derived from this extract modulated NS1 production. Regarding to the immunomodulatory effect, among the secreted factors, TNF- α was inhibited by NB3 and NB6, IL-6 was inhibited by NB1, NB3 and NB6, IL-10 by NB1 and NB3 and IFN- α by NB6. The crude extract (NB1) presented the best antiviral effect whereas the dichloromethanic fraction (NB3) presented immunomodulatory effect in the inflammatory and anti-inflammatory cytokines without interfering in the antiviral molecule INF- α production. **Conclusion:** During Dengue virus infection *in vitro*, *Norantea brasiliensis* Choisy exerts both antiviral and immunomodulatory effects that are likely associated, considering that less viral load may lead to less immunostimulation.

Key Words: dengue; *Norantea brasiliensis* Choisy; antiviral; immunomodulation.

Introduction

Among the viral diseases transmitted by mosquitoes, dengue is one that spread most quickly around the world. In the last fifty years, it has a 30% increase in incidence with geographic expansion for new countries [1]. In Brazil, it is placed among one of the most serious public health issues, and it had been reported about 1.2 million cases until the nineteenth week of 2016 [2].

The disease is transmitted by mosquitoes, mainly by *Aedes aegypti*, which inoculates the virus while feeding [3]. The Dengue virus (DENV) belongs to the *Flavivirus* genre, from *Flaviviridae* family and has four specific serotypes (DENV-1 to -4). Its genome encodes a polyprotein that is translated into three structural proteins and seven non-structural proteins [4]. Among the non-structural proteins, the NS1 is expressed both in the resident form within the endoplasmic reticulum (ER), associated to the membrane of infected cells or in soluble form in infected patient's plasma. It appears to be involved in viral replication [5,6] and moreover, it was recently described to be involved in the increase of endothelial permeability, which leads to vascular leakage during *in vivo* infection [7].

DENV has been shown to infect a wide range of cells including dendritic cells (DCs), monocytes, hepatocytes and endothelial cells either *in vivo* [8,9] or *in vitro* [10-14]. Infected cells become activated after infection, producing pro-inflammatory mediators including TNF, IL-6 and IL-8, among others that compromise the integrity of the endothelial cell layer, likely inducing vascular leakage [15-18]. On the other hand, monocytes may be involved in protective mechanisms, by producing IFN- α in response to DENV [19] and becoming activated as CD14^{high} CD16⁺ monocytes that express Toll Like Receptors [20]. Previously, we reported that in an DENV-2 infection model of primary human monocytes that were treated with *Uncaria tomentosa* extracts presented immunomodulatory properties, reducing TNF- α production, and had also antiviral activities [21]. Most studies involving natural products focus on their possible antiviral action against DENV not paying attention to immunomodulatory effects.

The Marcgraviaceae family is formed by eight genera and approximately 110-130 species [22,23]. In the Brazilian flora, about four genera and 35 species are present. In this study the Brazilian species *Norantea brasiliensis* Choisy, discovered by a Jacques Denis Choisy (1799-1859) was used [24]. This is a climbing shrub type that

occurs in the sandbanks of Rio de Janeiro, popularly known as “agarra-pé” (grab-foot) and is distributed in all Brazilian coastal sandbanks from the State of Paraíba until Santa Catarina, including seafront of Rio de Janeiro State [25,26]. It is a species rich in flavonoids, considered chemosystematics’ markers for the Ericales order [27] and were detected in our samples by thin layer chromatography using specific reagents. Pharmacological tests, performed with this species, in order to evaluate biodynamics potentials, have been done, such as cytotoxicity test and nitric oxide production inhibition, showing its potential anti-inflammatory activities [28].

In the present study, we assessed the antiviral and immunomodulatory activities of *N. brasiliensis* crude leave ethanolic extract and three of its partitioned fractions in an *in vitro* DENV-2 infected monocytes model and identified the constituents of the fractions which showed potential for developing a future herbal medicine for dengue treatment.

Materials and methods

Plant material and extraction

N. brasiliensis leaves were collected in Rio de Janeiro, Rio de Janeiro State, Brazil. The material was identified by the botanist Dr. Geisa Lauro Ferreira and a voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Jardim Botânico in Rio de Janeiro, Brazil, under number 152017. Dried and ground leaves (975 g) were submitted to extraction at room temperature with ethanol. The solvent was removed under low pressure yielding 170 g of the dried extract.

After sample preparation, they were solubilized in 1% DMSO, with the help of an ultrasonic bath. Then, samples were diluted in PBS pH 7.4, and stored in the concentration of 1 mg/ml. For sample sterilization, it was used Gammacell 220 Irradiator, with Cobalt-60 source, from Nuclear Instrumentation Laboratory (LIN)-UFRJ, used at 67.200 rads. Samples were aliquoted and stored at -20 °C. To confirm the sterilization, it was performed the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test (LONZA cat. N184-06) for endotoxin detection. The result of this test was negative for all samples (Data not shown).

Liquid-liquid partition of crude extract

In order to perform liquid-liquid partition procedure, part of this extract was solubilized in methanol:water 1/9 v/v. The total volume achieved in this hydroalcoholic solution was exactly the same volume of each of the organic solvents used in the partition: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol. The number of times that each organic solvent used was varied as necessary observed in each case. The fractions resulting from the partition techniques and the aqueous residue were concentrated in a rotary evaporator and lyophilized.

The subtitle for each extract/fraction used in this work is defined below:

NB1 - Leaf crude ethanolic extract

NB3 - Dichloromethanic fraction

NB5 - Ethyl acetate fraction

NB6 - Butanolic fraction

Thin layer chromatography (TLC) analyses

Thin layer chromatography (TLC) analyses were performed in pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) plates using mobile phase butanol/acetic acid/water 4:1:5 v/v and spraying with NP-PEG reagent and sequential UV irradiation at 365 nm. The profiles from the four samples are represented in fig. 1, having hiperoside as a chemical marker for the ethanolic extract.

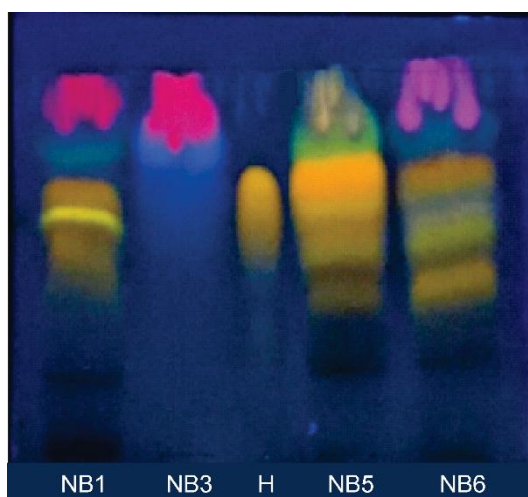


Fig. 1. Silica gel TLC chromatogram showing samples and standard derived from *N. brasiliensis*. Leaf crude ethanol extract (NB1) and its fractions derived from liquid-liquid partition: dichloromethane fraction (NB3); hyperoside standard (H); ethyl acetate fraction (NB5), and butanol fraction (NB6). Mobile phase: butanol/acetic acid/water (4:1:5 v/v); spray reagent: NP-PEG.

High-performance liquid chromatography (HPLC) profiling of the extracts and fractions

Crude extract and fractions were analyzed by a HPLC apparatus, which consisted of a Shimadzu (Kyoto, Japan) model Nexera Series 20 liquid chromatograph, two Shimadzu LC-20DXR pumps equipped with a binary gradient valve, a Shimadzu SPD-M20A diode array detector, a Shimadzu SIL-30AC autosampler, a Shimadzu CTO-20AC oven, a Shimadzu CBM 20-A communications bus module and a Shimadzu DGU-20A5R degasser. Separation was achieved on a Supelco (Bellefonte, PA, USA) Supelcosil LC-18 column (250 mm × 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size). The mobile phase was a methanol:water gradient, the injection volume was 20 μL at 10 mg/ml, the flow rate was 1.0 ml/min and the effluent was monitored at 254 nm. The profile from the four preparations is represented in fig. 2.

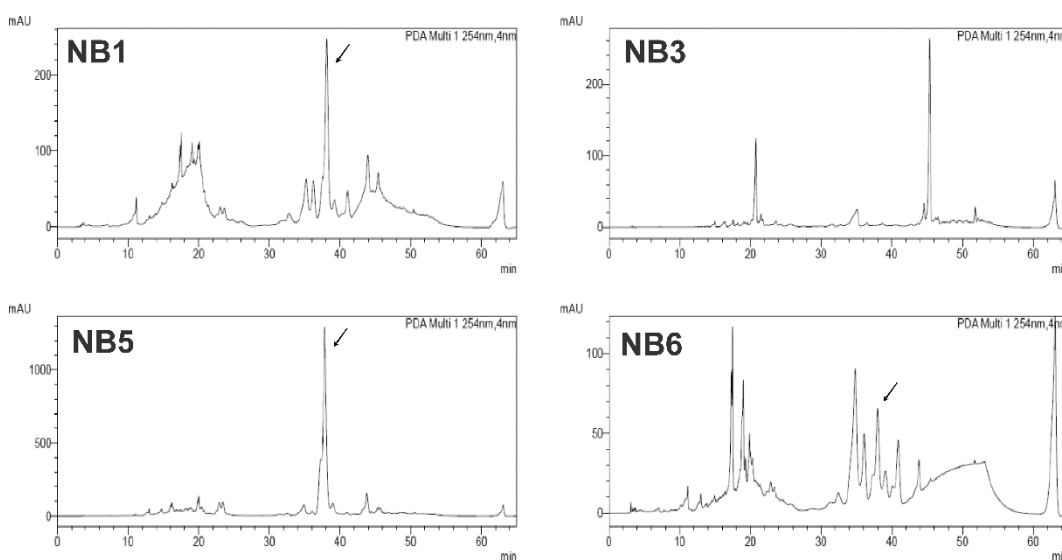


Fig. 2. High-performance liquid chromatograms from samples derived from *N. brasiliensis*. Leaf crude ethanol extract (NB1) and its fractions derived from liquid-liquid partition: dichloromethane fraction (NB3), ethyl acetate fraction (NB5), and butanol fraction (NB6). Arrows: hyperoside standard.

Cell viability assay by MTT

The sample cytotoxicity was evaluated by a MTT assay. The primary human monocytes were plated in 96-well flat microtiter plates (3×10^5 cells/ well) with complete RPMI 1640 medium (with 200 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 10 μg/streptomycin), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), both from Gibco,

Life Technologies, and incubated 24 h at 37 °C with 5% CO₂, for monocyte adherence. After this period, the medium was removed with non-adherent cells and adherent cells were incubated with different dilutions (10 and 1 µg/ml) from NB extract/fractions for 48 h. For performing cytotoxicity assays, it was used a RPMI 1640 without phenol red (Gibco, Life Technologies), and then added 10 µl of the 12 mM MTT reagent (Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit, Life Technologies Cat# M6494) per well. The cells were incubated 4 h at 37° C with 5% CO₂, added 50 µl DMSO to solubilize the formazan formed in the process and the concentration determined by D.O. at 570 nm by the SpectraMax spectrophotometer, with Paradigm Software SoftMax® Pro 6. The tested concentrations used in this work were determined as non-cytotoxic for all samples at 48 h (> 90% viability as compared to untreated cells; data not shown).

Virus and cell culture

The DENV-2 16681 original strain was obtained from Dr. S. Halstead, Military Institute of Research Walter Reed, Maryland/EUA [29] and used for the virus stock preparation. The virus was cultured and propagated in *Aedes albopictus* cell line C6/36 at 28 °C with Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Life Technologies) containing 5% FBS. The supernatant from infected C6/36 cell was collected, 8 days later, and stored at -70°C for titer determination as well as subsequent experiments.

Virus titration

The viral mass from DENV-2 was titrated by serial dilution cultures in 96-well microtiter plates and detected by immunofluorescence. Virus titer was calculated as 50 percent tissue culture infectious dose (TCID₅₀), according to the Reed & Munch formula. [30] The virus stock used had a titer of $1,37 \times 10^8$ TCID₅₀/ml.

Human peripheral blood mononuclear phagocyte enrichment

Human peripheral blood was provided by the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ. Buffy coat cells from healthy donors were submitted through a density gradient centrifugation (350g, 30 min in Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life Sciences) to isolate the human peripheral blood mononuclear leukocytes (PBMLs). After this procedure, cells were suspended in complete RPMI 1640 and incubated at 37 °C under 5% CO₂ during 90 min to allow monocyte enrichment. Non-adherent cells were removed by washing while adherent cells were detached by mechanical cell harvesting with cell scrapers in cold medium. Then, the recovered adherent cells –

enriched monocytes - were suspended in complete RPMI supplemented with 10% FBS, seeded at 2×10^6 cells/ml on 48-well plates and incubated for 24 h.

Monocyte infection and treatment with N. brasiliensis samples

After incubation, adherent monocytes were infected with a virus diluted inoculum (1/5) in cell culture medium (2.74×10^7 TCID₅₀/ml in 300 μ l). Cells were incubated for 2 h for virus adsorption and then, the supernatant was replaced with a 2% FBS containing *N. brasiliensis* leave crude ethanolic extract or either NB3, NB5 and NB6 fractions at different concentrations (10 e 1 μ g/ml) and subsequently incubated at 37 °C under 5% CO₂. After 48h, supernatants were collected and stored at -20 °C for cytokine measurement and cells recovered for viral antigen determination. Wells containing no treatment nor infection, fractions without infection, and infectious DENV was assayed.

Viral antigen detection by flow cytometry

Monocytes previously treated or not with *N. brasiliensis* were recovered by scraping with a plastic microtip in a cold cell culture medium, set at 1×10^6 cells/well in a 96-well plate, then centrifuged (350 g, 7 min) while their supernatants were collected for subsequent measurement of cytokines/chemokines. The cells were, then, suspended in a wash buffer (phosphate-buffered saline pH 7.4 containing 1% bovine serum albumin and 0.1 % NaN₃ (PBS/BSA). Afterwards, cells were fixed with a 2 % paraformaldehyde PBS/BSA solution at 4 °C for 20 min and permeabilized with a 0.15 % saponin in PBS/BSA solution for 10 min. Then, permeabilized cells were blocked with 5 % inactivated human plasma in PBS/BSA at 4 °C for 30 min, washed, and incubated with mouse anti-Dengue Complex monoclonal antibody (1/100 dilution, Chemicon, Merk) at 4 °C for 60 min. After washing the cells, they were incubated with anti-mouse IgG labeled with Alexa Fluor™ 488 (1/400 dilution) for 30 min at 4°C. Cells were washed again with PBS/BSA, recovered in 2% paraformaldehyde, and kept at 4 °C until cell acquisition (10000 events for gated monocytes) by FACS Calibur flow cytometer (Beckon & Dickinson) and analyzed with FlowJo Software (TreeStar Inc.). An isotype-matched antibody was adopted as negative control.

NS1 semi-quantitative detection by ELISA

To evaluate the antiviral activity from *N. brasiliensis* samples, the DENV non-structural protein, NS1 were evaluated. For this, the culture supernatants, submitted to different treatment conditions and previously stored at -20 °C, were used for determination of NS1 ratios by Dengue NS1 Ag kit Platelia (BioRad # 72830), according to the manufacturer's instructions. Plates were read at 450 nm in the SpectraMax Paradigm Software SoftMax® Pro 6. To calculate the NS1 ratio, it was used the optical density (O.D.) from tested samples over the O.D. from the “cut-off” sample supplied by the kit.

Cytokine/Chemokines detection by multiplex microbead immunoassay

To evaluate the immunomodulatory activity from *N. brasiliensis* samples, culture supernatants from cells submitted to different treatment conditions and previously stored at - 20 °C, were also used for cytokine determinations of TNF- α , IL-6, IL-10, and IFN- α . It was employed a High Sensitivity multiplex biometric immunoassay, containing fluorescent dyed microspheres conjugated with a monoclonal antibody specific for a target protein, according to the manufacturer's instructions (Upstate) and following earlier description [21]. Assay sensibility range was 1.95-8,000 pg/ml. Cytokine levels were determined with a multiplex array reader from Luminex Instrumentation System (Bio-Plex Work-station from Bio-Rad Laboratories). The analyte concentration was calculated with software provided by the manufacturer (Bio-Plex Manager Software). It provided a regression analysis to derive the equation for cytokine concentration prediction in samples.

Statistical analysis

Data were initially tested for normality, with Prism version 6, GraphPad Software, using the Kolmogorov-Smirnov test. Since data groups mostly did not pass the normality test, we performed a two-group comparison between virus infected cultures submitted to plant treatment with untreated ones that were evaluated for significance with the paired and non-parametric statistical Wilcoxon's test. Altered parameters were considered significant when $P < 0.05$.

Results

In vitro antiviral activity of *N. brasiliensis* Choisy in infected monocytes detected by intracellular DENV antigen (Ag) labeling and NS1 secretion

DENV-2 strain 16681 has been efficient in inducing monocyte infection and we observed that the intracellular antigen detection peak occurs on the second day after infection [31]. This model has already been used for *Uncaria tomentosa* testing antiviral and immunomodulating activities [21]. Here, the strain 16681 was used for *in vitro* infection of human adherent peripheral blood mononuclear leukocytes (PBML), enriched for monocytes in order to test *N. brasiliensis* Choisy effects evaluated for dengue infection and cytokine production.

The *in vitro* antiviral activities of *N. brasiliensis* on DENV-2 were assessed in two different assays. DENV infected adherent peripheral blood mononuclear leukocyte (PBML), enriched for monocytes from nine donors were treated with the crude extract or its three partition fractions derived from the *N. brasiliensis*. After 48 h infection, the intracellular labeling detected DENV-Ag⁺ cell rates by flow cytometry analysis in the regions containing cells with monocyte morphology, accordingly to FSC and SSC parameters (fig. 3A; 80-90% gated cells are CD14⁺). The crude extract NB1 significantly decreased monocyte DENV-Ag detection in the tested 1 and 10 µg/ml doses (fig. 3A and 3B). The treatments with NB3, NB5 and NB6 fractions demonstrated no effect on DENV infection rates in any of the tested concentrations. The dose of 10 µg/ml NB3 and NB5 presented an unspecific Ag labeling in uninfected cells (data not shown).

NS1 non-structural protein secreted in the adherent monocyte culture supernatants was detected 48 h post-infection. To determine the antiviral activity of *N. brasiliensis*, the reduction of NS1 secretion was detected in the supernatants from infected cells that were treated either with the 1 or 10µg/ml doses of the crude extract or with its partition fractions when compared to untreated ones. The decrease in NS1 secretion was statistically significant when the infected monocytes were treated either with the crude extract NB1 or its three fractions NB3, NB5 or NB6 at 1 µg/ml dose. None of the tested samples demonstrated antiviral activities in reducing NS1 rates at the 10 µg/ml dose (fig. 4).

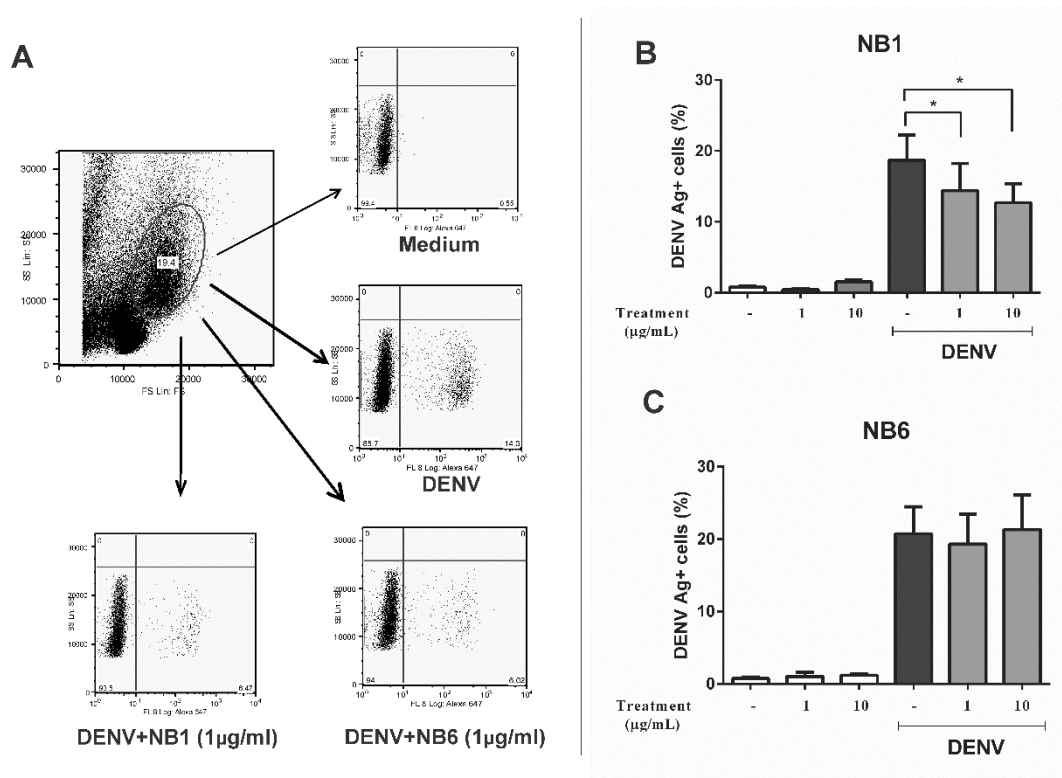


Fig. 3. DENV Antigen (DENV Ag) detection in monocytes population infected with DENV-2 and submitted to a treatment with the crude extract NB1 and butanolic fraction NB6 derived from *N. brasiliensis*. Enriched monocytes obtained from healthy PBML buffy coats were infected with DENV-2 (2.74×10^7 TCID₅₀/ml) and treated with different concentrations of the NB1 extract, NB6 fraction or untreated. The DENV antigen (DENV Ag) was detected intracellularly by flow cytometry analysis (Alexa-647). **A.** Gated monocyte population accordingly to size (FSC) and granularity (SSC) parameters and representative dot plots within the monocyte gate from uninfected, DENV-infected or DENV-infected and NB1 treated cultures (SSC vs. FL8-Alexa-647). **B and C.** Histograms obtained from data of eight PBML donors. Enriched monocytes were treated with NB1 (B). or NB6 (C). Values represent as mean \pm SEM. The assays were performed in triplicate and treated samples were compared to untreated ones by Wilcoxon paired test. * $P < 0.05$.

In general, NB1 presented more efficient effects in DENV antiviral activity, reducing both the intracellular detection of DENV Ag and also NS1 viral protein reduction at 1 µg/ml concentration.

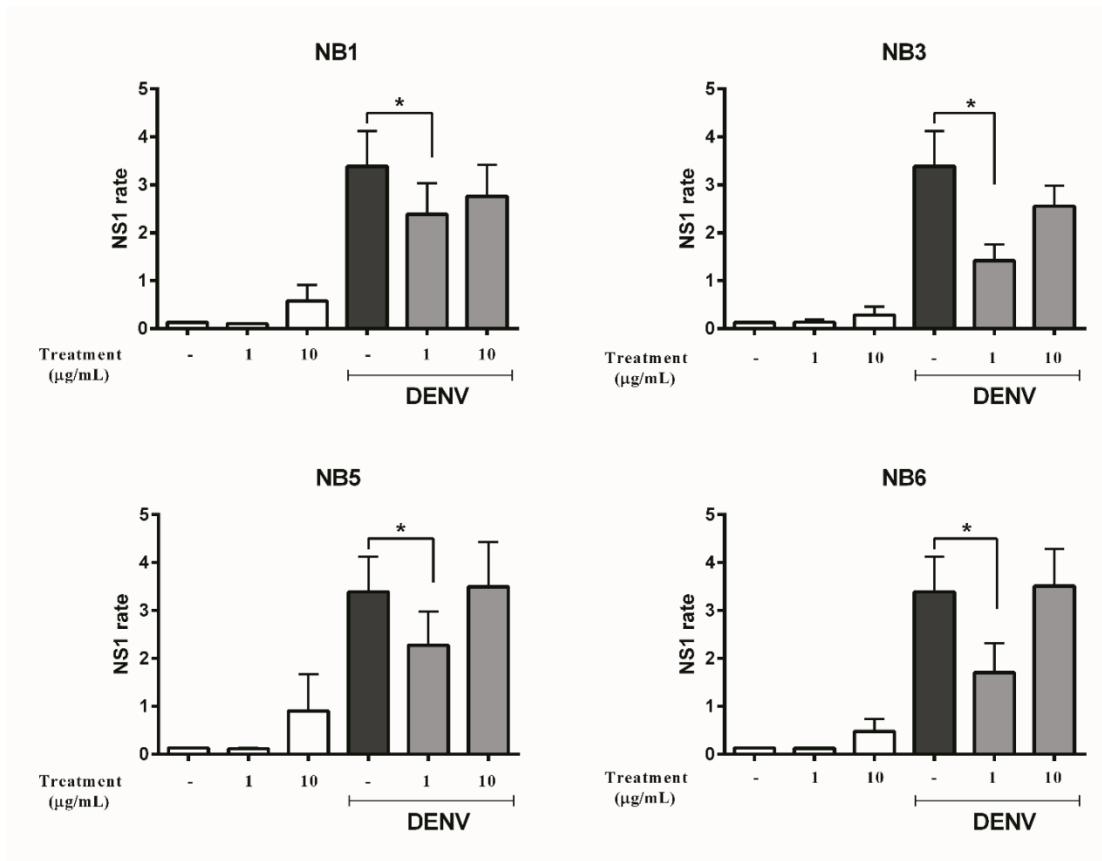


Fig. 4. Non-structural protein NS1 detected in supernatants from DENV-2 infected enriched monocyte cultures treated with NB compounds derived from *N. brasiliensis*. Enriched monocytes obtained from healthy PBML buffy coats were infected with DENV-2 (2.74×10^7 TCID₅₀/ml) and treated with 1 µg/mL from the crude extract NB1 and its dichlorometanic (NB3), ethyl acetate (NB5) and butanolic (NB6) fractions or untreated. After 48 hours, the cell culture supernatants were recovered and tested for NS1 presence by ELISA (Dengue NS1 Ag kit Platelia). The represented NS1 ratio was calculated accordingly to the manufacturer instruction, using the optical density (O.D.) obtained from samples and O.D from NS1 cut-off (average of duplicates from kit calibrator, CO). The values were represented as mean ± SEM. Eight independent experiments are represented and treated samples were compared to untreated ones by Wilcoxon's test. * P < 0.05.

In vitro immunomodulatory activity of N. brasiliensis detected by colorimetric assays in infected monocytes

The *in vitro N. brasiliensis* immunomodulatory activity was detected on the same DENV-2 infected adherent PBML monocyte-enriched culture supernatants assayed for DENV antigens at 48 h post-infection. TNF-α, IL-6, IL-10 and IFN-α determinations were performed using seven PBML donors. These immune mediators produced during monocyte DENV infection at significant levels in cell supernatants, were evaluated by the Luminex™ technique as described in materials and methods. Considering that the

10 µg/ml dose did not present expected effects in the antiviral assays performed so far, only the 1 µg/ml dose was assayed for the immunomodulation assay.

In TNF-α determination, a significant modulation of this cytokine was observed when infected monocytes were treated with NB3 and NB6 fractions (fig. 5A). No significant changes were detected with the crude extract NB1 or with NB5 fraction treatments. The crude extract NB1, NB3 and NB6 inhibited significantly IL-6 (fig. 5B) and IL-10 levels were downregulated significantly by NB1 and NB3, with a tendency by NB6 (fig. 5C) at the tested concentration in monocyte supernatants at 48 h post-infection. The NB6 fraction also reduced significantly the IFN-α production in the infected monocyte culture supernatants (Figure 5D). The NB5 fraction was ineffective in inducing immunomodulatory activities here assayed.

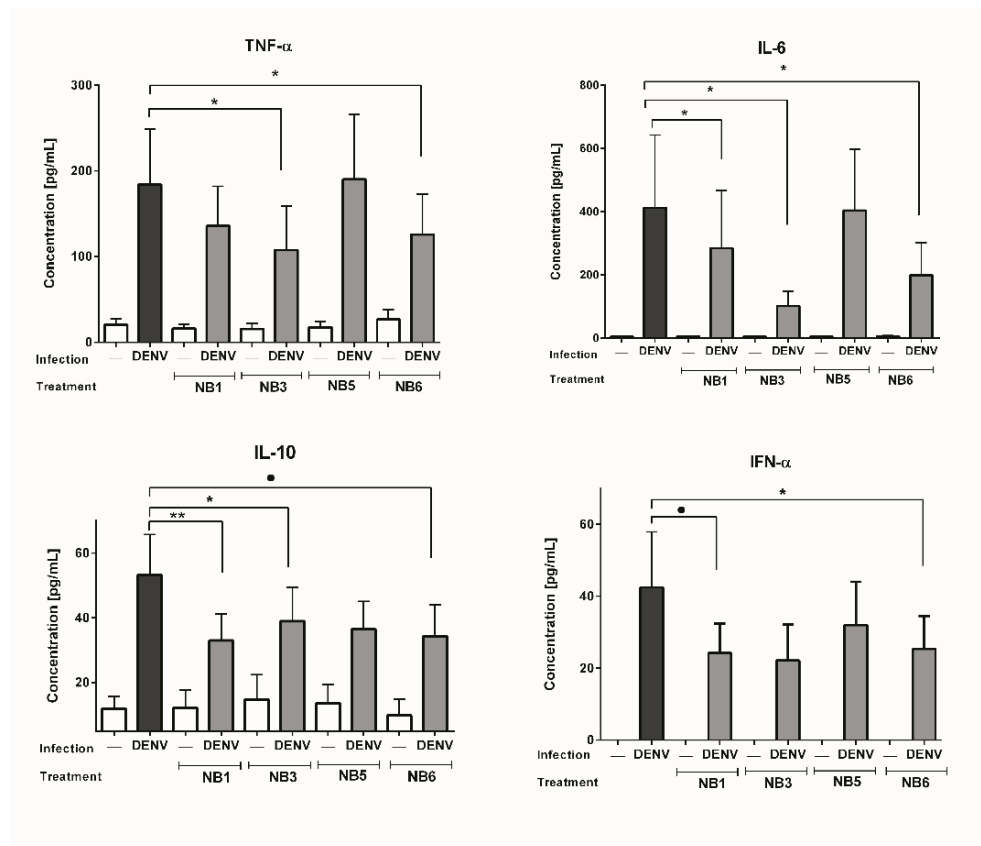


Fig. 5. Cytokine production detected in supernatants from DENV-2 infected enriched monocyte cultures treated with NB compounds derived from *N. brasiliensis*. Enriched monocytes obtained from healthy PBML buffy coats were infected with DENV-2 (2.74×10^7 TCID₅₀/ml) and treated with 1 µg/mL from the crude extract NB1 and its dichlorometanic (NB3), ethyl acetate (NB5) and butanolic (NB6) fractions or untreated. After 48 hours, the cell culture supernatants were recovered and tested for TNF-α IL-6, IL-10 and IFN-α using the Luminex™ technology. The values were represented as mean ± SEM from eight independent PBML donors and treated samples were compared to untreated ones by Wilcoxon's test. * P < 0.05.

Discussion

Physiopathology of Dengue virus in patients with severe dengue characteristically involves a ‘cytokine storm’, presenting high levels of circulating cytokines and chemokines that are detected in circulating blood and associated with severe outcomes including shock and hemorrhages. Pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IFN- γ , but also anti-inflammatory factors such as IL-10, and chemokines such as IL-8, MIP-1 β , MCP-1 among others are believed to be acting on endothelium integrity, disturbing hemostasis and the coagulation cascade. [32-36]. Therefore, serum levels of these molecules may serve as a laboratory tool for predicting severe disease [37].

Here we adopted a model of human primary monocytes to evaluate the immunomodulatory potential of our extracts from *N. brasiliensis* Choisy and observed downregulation of TNF- α , IFN- α , IL-6, IL-10, associated with an antiviral effect detected by the reduction in cellular viral antigenic load and secreted NS1 protein. This study outstands for its use of primary monocytes, the main target cells for DENV in patients [14], aiming to identify medicinal plants that have effects against DENV. This cell type is relevant for the *in vitro* performed assays, regarding its permissivity to DENV-2 infection and capability to induce cytokines and other inflammatory mediators related to dengue severity during infection. [21,31,38].

There are currently no specific treatments for dengue fever [39], only standard treatment for management of fever is given, i.e., nursing care, fluid balance, electrolytes and blood clotting parameters [1]. Therefore, the need for an effective treatment for dengue is urgent and, taking into account the cytokine role in dengue pathogeny, it is still important the search for medicinal plants that act as immunomodulatory agents.

Dysregulation of the immune system has long been treated in several diseases by herbal medicine and its therapeutic effects may be achieved by cytokine modulation [40,41]. Natural products have become the main source of test material in the development of drugs based on traditional medical practices [42] and also have been used to treat viral infections in animals and humans. Several plants have been reported to display antiviral activities [43-46]. More recently, these medicinal products are described as antiviral agent against DENV, inhibiting the viral load and/or their replication [47-49]. To date, at least 31 species have been found to have the potential to treat dengue but some of them have not yet been investigated scientifically [50]. However, most studies did not use human primary monocytes and very few

investigations have addressed the immunomodulatory properties of anti-dengue products. Our earlier work showing anti-inflammatory properties from a medicinal plant, *Uncaria tomentosa* was a pioneer utilizing the *in vitro* DENV-2 strain 16681 infection of primary human monocytes and describing immunosuppressive properties of products originated from traditional medicinal use [21]. Here we present another plant with such effects and improved our model detecting the viral non-structural protein NS1 that is secreted.

Anti-inflammatory property from *N. brasiliensis* was earlier reported as an inhibitor of the NO production [28] and it attracted our attention for investigating its effects on the DENV infection and also for its potential to a new therapeutic agent for treating the disease. We showed herein that the hydroalcoholic extract from *N. brasiliensis* leaves and three derivate fractions presented an antiviral activity, reducing significantly the percentage of DENV Ag⁺ cells or the NS1 protein, a viral load indicator. Also an immunomodulatory effect is reported by the reduction in the production of some important cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-10. Considering that severe clinical manifestations are associated with to an exacerbated cytokine production, we believe that this immunomodulation is an important step to reduce or avoid undesired disease outcomes. Besides, it is important to note that possibly the actual reduction in viral load may be taking, as a consequence, to a reduction in the immune response and contributing to a good prognosis.

For the first time, the NS1 was used in this study for the evaluation of the antiviral activity of natural products in an *in vitro* DENV infection model using human primary monocytes as targets. This protein have already been used for this activity in mice models, in which NS1 levels were related with the circulating virus detected by plaque forming assay and RNA quantification by PCR [51] and more recently, in studies involved Vero cells infection by the four DENV serotypes [48]. We have earlier reported the IL-10 role in association with hepatic dysfunctions and effusions in children with dengue [34]. Moreover, both DENV NS1 antigen and the IL-10 serum levels were associated with severity in acute dengue infection, and IL-10 has suppressed dengue-specific T cell responses [52]. Malavige *et al* demonstrated that NS1 is positively correlated with IL-10 production in monocytes, and acts inducing its production, leading to the severity [53]. Therefore, our results showing an IL-10 reduction could be a consequence of *N. brasiliensis* effects in reducing NS1 and DENV

production, acting, simultaneously, as antiviral and immunomodulatory and improving the prognosis of infection.

The data presented here strongly suggest that the assay for NS1 determination is more indicated for screening tests to evaluate the antiviral activities of medicinal plants, in the monocyte study model, since it presented a higher sensitivity in detecting viral load changes than the intracellular antigen labelling. The stable NS1 protein accumulates in culture, unlike the flow cytometry analysis that may not detect cells destroyed by the virus.

Recently, a study revealed that during severe cases of dengue Indian children IL-8 and IL-6 play a predominant role as markers of disease severity during acute dengue and the reduction in IL-8 and IL-10 levels were identified as the most significant markers of recovery from severe disease [54]. The TNF- α has been classically associated with more severe cases of dengue fever [35,55] and is also known to be an endothelial cell activator, inducing the expression of adhesion molecules and disrupting bridges with adherent molecules as catenin, thereby, favoring endothelial permeability, fluid leakage, and resulting at the end in hypotension and hemoconcentration [56,57].

Type 1 interferon (IFN- α/β) has a significant role in establishing protection against virus infections [58]. DENV activates *in vitro* a robust IFN- α/β response. However, DENV viral proteins, such as non-structural NS4b can inhibit IFN signaling, down-regulating the JAK/STAT pathway, impairing this antiviral interferon regulated gene expression. [59-61] We remark that the role played by the IFN type 1 response in dengue patients is not fully understood. IFN- α in excess may induce autoimmune diseases for example during the treatment for hepatitis [62]. Therefore, the IFN- α downregulation, detected by the tested NB6 fraction, may represent a decrease in immunological stimulation associated with the reduced virus replication. Moreover the virus elimination could be achieved by other antiviral molecules than IFNs, such as nitric oxide [14,63].

Acknowledgments

We acknowledge Amanda Torrentes-Carvalho and Mariana Gandini for technical assistance. The work was supported by Technological Platforms RPT03C-Luminex – RJ and RPT11D-/Bioensaios IV (Dengue) from VPPLR, PROEP/IOC, Farmanguinhos all at

FIOCRUZ; CNPq; FAPERJ and CAPES in Brazil. The NMR spectra were performed at the Analytical Platform, Far-Manguinhos/FIOCRUZ.

Conflicts of interest

No conflicts of interest are declared.

References

- 1 WHO/TDR.: Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition. World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf [Accessed 05 December 2015].
- 2 Brazilian-Federal-Government: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 9, 2016. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/16/2016-019---Dengue-SE19.pdf> (Accessed 17 June 2016). 2016, 47.
- 3 Gubler DJ: Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2002;10:100-103.
- 4 Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG: A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:13-22.
- 5 Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V: Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 1999;73:6104-6110.
- 6 Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM: Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol* 1990;44:649-688.
- 7 Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E: Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med* 2015;7:304ra141.
- 8 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;189:1411-1418.
- 9 Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS: Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 2000;6:816-820.
- 10 Dalrymple NA, Mackow ER: Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Adv Virol* 2012;2012:840654.
- 11 Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, Lai JH: Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol* 2001;166:1499-1506.
- 12 Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR: Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol* 2007;79:300-307.
- 13 Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA: DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197:823-829.
- 14 Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF: 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.

- 15 Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, Fournier MV, Ennis FA, Rothman 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;76:5588-5597.
- 16 Carr JM, Hocking H, Bunting K, Wright PJ, Davidson A, Gamble J, Burrell CJ, Li P: Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. *J Med Virol* 2003;69:521-528.
- 17 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;76:9877-9887.
- 18 Spain-Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL: MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *J Med Virol* 2001;65:324-330.
- 19 Kurane I, Ennis FA: Production of interferon alpha by dengue virus-infected human monocytes. *J Gen Virol* 1988;69 (Pt 2):445-449.
- 20 Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, Nogueira RM, Oliveira-Pinto LM, Kubelka CF: Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* 2010;130:202-216.
- 21 Reis SR, Valente LM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, D'Avila LA, Mazzei JL, Henriques M, Kubelka CF: Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *Int Immunopharmacol* 2008;8:468-476.
- 22 Barroso GM: Marcgraviaceae. In: *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Vicoça. Imp. Univ. UFV, 1: 137-138. 1978.
- 23 Hammel BE: Three new species of marcgraviaceas from Costa Rica, with references to related species and notes on the generic placement of *Schwartzia jimenesii*. *Lankesteriana* 2006;6:73-81.
- 24 Gledhill D: *The Names of Plants*, ed Third Edition. Cambridge University Press, 2002.
- 25 Soares C: *O Livro de Ouro das Flores - As Cem Variedades mais Belas, suas Características e Histórias*. Rio de Janeiro: Ediouro Publicações S/A; 2002.
- 26 Pinheiro MCB, Ormond WT, Lima HA, Correia MCR: Biologia da Reprodução de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). *Rev Brasil Biol* 1995;55:79-88.
- 27 Rocha MEdN, Figueiredo MR, Kaplan MAC, Durst T, Arnason JT: Chemotaxonomy of the Ericales. *Biochem Syst Ecol* 2015;61:441-449.
- 28 Rocha MEN: Potencialidades biodinâmicas de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2002.
- 29 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;69:5-11.
- 30 Reis SR, Sampaio AL, Henriques M, 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;102:983-990.
- 31 Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, Kubelka CF: Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:1091-1099.
- 32 de Azeredo EL, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM: Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators. *Mediators Inflamm* 2015;2015:313842.
- 33 Srikiatkachorn A: Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost* 2009;102:1042-1049.
- 34 Ferreira RA, de Oliveira SA, Gandini M, Ferreira Lda C, Correa G, Abiraude FM, Reid MM, Cruz OG, Kubelka CF: Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. *Acta Trop* 2015;149:138-147.

- 35 Green S, Rothman A: Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:429-436.
- 36 Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF: Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* 2008;8:86.
- 37 John DV, Lin YS, Perng GC: Biomarkers of severe dengue disease - a review. *J Biomed Sci* 2015;22:83.
- 38 Correa G, de ALC, Fernandes-Santos C, Gandini M, Petitinga Paiva F, Coutinho-Silva R, C FK: The purinergic receptor P2X7 role in control of Dengue virus-2 infection and cytokine/chemokine production in infected human monocytes. *Immunobiology* 2016;221:794-802.
- 39 Beauté J, Vong S: Cost and disease burden of dengue in Cambodia. *BMC Pub Health* 2010;10:521.
- 40 Wang Q, Kuang H, Su Y, Sun Y, Feng J, Guo R, Chan K: Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2013;146:9-39.
- 41 Williams JE: Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. *Altern Med Rev* 2001;6:567-579.
- 42 Meneses R, Ocazionez RE, Martinez JR, Stashenko EE: Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009;8:8.
- 43 WHO: Traditional medicine. Fact Sheet. World Health Organization <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en/>. 2003
- 44 Betancur-Galvis L, Saez J, Granados H, Salazar A, Ossa J: Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:531-535.
- 45 Kudi AC, Myint SH: Antiviral activity of some Nigerian medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol* 1999;68:289-294.
- 46 Cardile AP, Mbuy GKN: Anti-herpes virus activity of silibinin, the primary active component of *Silybum marianum*. *J Herb Med* 2013;3:132-136.
- 47 Chu JJ, Yang PL: c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3520-3525.
- 48 Sood R, Raut R, Tyagi P, Pareek PK, Barman TK, Singhal S, Shirumalla RK, Kanoje V, Subbarayan R, Rajerethinam R, Sharma N, Kanaujia A, Shukla G, Gupta YK, Katiyar CK, Bhatnagar PK, Upadhyay DJ, Swaminathan S, Khanna N: *Cissampelos pareira* Linn: Natural Source of Potent Antiviral Activity against All Four Dengue Virus Serotypes. *PLoS neglected tropical diseases* 2015;9:e0004255.
- 49 Lima-Junior RS, Mello Cda S, Siani AC, Valente LM, Kubelka CF: *Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue virus. *Nat Prod Commun* 2013;8:1547-1550.
- 50 Abd Kadir SL, Yaakob H, Mohamed Zulkifli R: Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *J Nat Med* 2013;67:677-689.
- 51 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;195:665-674.
- 52 Malavige GN, Jeewandara C, Alles KM, Salimi M, Gomes L, Kamaladasa A, Jayaratne SD, Ogg GS: Suppression of virus specific immune responses by IL-10 in acute dengue infection. *PLoS neglected tropical diseases* 2013;7:e2409.
- 53 Adikari TN, Gomes L, Wickramasinghe N, Salimi M, Wijesiriwardana N, Kamaladasa A, Shyamali NL, Ogg GS, Malavige GN: Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes. *Clin Exp Immunol* 2016;184:90-100.

- 54 Singla M, Kar M, Sethi T, Kabra SK, Lodha R, Chandele A, Medigeshi GR: Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India--Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. *PLoS neglected tropical diseases* 2016;10:e0004497.
- 55 Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, Kubelka CF: 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;96:229-232.
- 56 Cardier JE, Rivas B, Romano E, Rothman AL, Perez-Perez C, Ochoa M, Caceres AM, Cardier M, Guevara N, Giovannetti R: Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells. *Endothelium* 2006;13:335-340.
- 57 Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-3561.
- 58 Biron CA: Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol* 1998;10:383-390.
- 59 Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A: Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14333-14338.
- 60 Morrison J, Aguirre S, Fernandez-Sesma A: Innate immunity evasion by Dengue virus. *Viruses* 2012;4:397-413.
- 61 Munoz-Jordan JL, Fredericksen BL: How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses* 2010;2:676-691.
- 62 Omur O, Daglyoz G, Akarca U, Ozcan Z: Subacute thyroiditis during interferon therapy for chronic hepatitis B infection. *Clin Nucl Med* 2003;28:864-865.
- 63 Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S: Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol* 2006;87:3003-3011.
- 64 Spelman K, Burns J, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M: Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Altern Med Rev* 2006;11:128-150.

Anexo 2. Artigos publicados, realizados em colaboração.

Clinical Immunology 164 (2016) 95–105



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yclim



Characterization of clinical and immunological features in patients coinfected with dengue virus and HIV



Amanda Torrentes-Carvalho^{a,*}, Eugênio Damaceno Hottz^b, Cintia Ferreira Marinho^a,
Jéssica Badolato-Corrêa da Silva^a, Luzia Maria de Oliveira Pinto^a, Luciana Gomes Fialho^a,
Fernando Augusto Bozza^b, Rivaldo Venâncio Cunha^c, Paulo Vieira Damasco^d,
Claire Fernandes Kubelka^a, Elzinandes Leal de Azeredo^{a,*}

^a Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^b Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Clínica Médica, FM, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

^d Hospital Universitário Gaffrêe Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNI RIO, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2015

Received in revised form 2 January 2016

accepted with revision 14 January 2016

Available online 28 January 2016

Keywords:

Coinfection

Lymphocytes

Cytokines

Dengue

HIV

ABSTRACT

The pathogenesis of dengue in subjects coinfected with HIV remains largely unknown. We investigate clinical and immunological parameters in coinfected DENV/HIV patients. According to the new dengue classification, most coinfected DENV/HIV patients presented mild clinical manifestations of dengue infection. Herein, we show that DENV/HIV coinfected patients had higher CD8 T cells percentages reflected as a lower CD4/CD8 ratio. Furthermore, CCR5 expression on CD4 T cells and CD107a expression on both T subsets were significantly higher in coinfected patients when compared with monoinfected DENV and HIV individuals respectively. Increased inflammatory response was observed in treated HAART coinfected patients despite undetectable HIV load. These data indicate that DENV infection may influence the clinical profile and immune response in individuals concomitantly infected with HIV.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.



Original Article

Cissampelos sympodialis has anti-viral effect inhibiting dengue non-structural viral protein-1 and pro-inflammatory mediators



Fagner Carvalho Leite^{a,b}, Cíntia da Silva Mello^c, Luciana Gomez Fialho^c, Cintia Ferreira Marinho^c, Ana Luisa de Araujo Lima^a, José Maria Barbosa Filho^d, Claire Fernandes Kubelka^c, Marcia Regina Piuvezam^{a,*}

^a Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^b Faculdade São Francisco da Paraíba, Cajazeiras, PB, Brazil

^c Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2015

Accepted 6 March 2016

Available online 19 May 2016

Keywords:

Cissampelos sympodialis

Dengue

Huh-7 cells

Cytokines

NS1

Warifteine

ABSTRACT

Dengue is the most important viral infection transmitted among humans by arthropod-borne. There are currently no vaccines or specific therapeutical treatment. Therefore, immunomodulatory compounds from plants have been widely examined for their antiviral effects. *Cissampelos sympodialis* Eichler, Menispermaceae, has scientifically proven to present immunomodulatory activities. Here we assessed the antiviral activity of leaf hydroalcoholic extract, warifteine or methylwarifteine from *C. sympodialis* in an *in vitro* dengue virus infection model. The results demonstrated that leaf hydroalcoholic extract or warifteine/methylwarifteine treatment did not reduce dengue virus-Ag+ hepatocyte (Huh-7 cell) rates in present experimental conditions. However, we assessed the potential antiviral effect of leaf hydroalcoholic extract or warifteine/methylwarifteine on dengue virus-infection by the production of inflammatory molecules, TNF- α , MIF, IL-8 and PGE₂. Dengue virus infection enhanced TNF- α , MIF, IL-8 and PGE₂ production in infected Huh-7 cells and leaf hydroalcoholic extract but not warifteine/methylwarifteine treatments, significantly reduced these molecules in infected cells. In dengue virus-infected Huh-7 cells, non-structural protein-1 is produced and leaf hydroalcoholic extract significantly inhibited it independently of alkaloids. Our findings imply that leaf hydroalcoholic extract may attenuate dengue virus infection in Huh-7 cells by inhibiting the enhanced of pro-inflammatory mediators and non-structural protein-1 production induce by dengue virus independently of warifteine/methylwarifteine its major compound.

© 2016 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).