

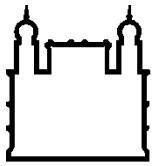
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA COMPLEMENTO NA INFECÇÃO, ATIVAÇÃO CELULAR  
E ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE ENDOTELIAL NA DENGUE**

CINTIA FERREIRA MARINHO

Rio de Janeiro  
Novembro de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

CINTIA FERREIRA MARINHO

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA COMPLEMENTO NA INFECÇÃO, ATIVAÇÃO CELULAR  
E ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE ENDOTELIAL NA DENGUE.**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>: Luzia Maria de Oliveira Pinto

Orientador no sanduíche: Prof Dr: Ernesto T.A. Marques Jr

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

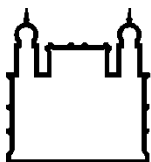
M338 Marinho, Cíntia Ferreira

Influência do sistema complemento na infecção, ativação celular e alteração da permeabilidade endotelial na dengue / Cíntia Ferreira Marinho. – Rio de Janeiro, 2015.  
xviii,120 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.  
Bibliografia: f. 96-119

1. Sistema complemento. 2. Dengue. 3. Receptores de complemento. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

Autor: Cintia Ferreira Marinho

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA COMPLEMENTO NA INFECÇÃO, ATIVAÇÃO CELULAR  
E ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE ENDOTELIAL NA DENGUE.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>: Luzia Maria de Oliveira Pinto

Aprovada em: 11/11/2015

Banca examinadora:

Presidente: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Torres Bozza  
(Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Barros de Arruda  
(Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes - UFRJ)

Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib  
(Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

**SUPLENTES**

Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto  
(Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Prof. Dr. Marciano Viana Paes  
(Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Dedico esta tese aos meus amados,  
que me deram forças para continuar.

# Agradecimentos

---

Aos meus amados: meus pais por toda dedicação, amor, apoio e paciência. Especialmente por colocarem a educação em primeiro lugar. Minha irmã e minha tia, pelo carinho e amor. Ao meu companheiro João sempre paciente, generoso, e compreensivo e ao meu Bob por só saber amar.

A minha amiga Amanda por compartilhar a vida, alegrias e tristezas e por me ensinar sobre amizade e paciência. Aos amigos e companheiros que convivi durante minha jornada no LIV Luciana, Cintia, Márcio, Jéssica e Iury e no CVR Isabelle, Mariana e Guagnchao, foi um imenso prazer ter a oportunidade de conviver com pessoas como vocês.

A Dra Luzia, agradeço profundamente a oportunidade de trabalho e sua importância na minha formação.

Ao Dr Ernesto Marques por me aceitar em seu grupo e me permitir trabalhar em um ambiente rico em discussões científicas fundamentais para o meu crescimento. E ao Dr Eduardo Nascimento pela valiosa orientação científica durante o período do doutorado sanduíche conquistando toda minha admiração e respeito.

À Dra Claire Kubelka e Elzinandes pela contribuição para o desenvolvimento deste projeto e aos demais membros do LIV.

À Pós-graduação em Biologia Parasitária e aos suportes financeiros, CAPES, FAPERJ, CNPq, FAPERJ, IOC/FIOCRUZ pelo suporte financeiro e apoio necessários para o desenvolvimento deste projeto.

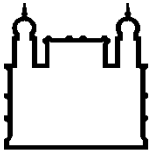
Aos integrantes da banca examinadora. Obrigada por gentilmente aceitarem nosso convite.

Aos pacientes, indivíduos saudáveis, médicos e membros de laboratório de Flavivirus que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

“Think before you speak;

Read before um think.”

Fran Lebowitz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

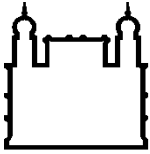
Fundação Oswaldo Cruz

## INFLUÊNCIA DO SISTEMA COMPLEMENTO NA INFECÇÃO, ATIVAÇÃO CELULAR E ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE ENDOTELIAL NA DENGUE

### RESUMO

O Sistema Complemento (SC) desempenha papel importante no controle de infecções atuando na eliminação do patógeno e na regulação da resposta imune. Contudo, uma ativação desregulada do SC gera efeitos deletérios ao hospedeiro, contribuindo para a patogênese de diversas doenças, como na Dengue. Entretanto, o envolvimento do SC na infecção pelo vírus Dengue (DENV) ainda tem vários aspectos a serem investigados. Assim, avaliamos a contribuição do SC na infecção *in vitro* de monócitos pelo DENV; o perfil de expressão dos Receptores de Complemento (CR) CR1, CR2, CR3, CR4, CD46, CD55 e CD59, e de moléculas de ativação nos monócitos e linfócitos T circulantes de pacientes infectados pelos DENV-1,-2 ou -4 por citometria de fluxo. Dosamos os níveis de SC5b-9 e citocinas em pacientes por ELISA. Avaliamos ainda, a contribuição da ativação do SC na permeabilidade e viabilidade endotelial, utilizando modelo *in vitro* de células endoteliais (CEs) pela medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) e liberação de LDH sobrenadante de culturas. Por fim investigamos a interação DENV-2 com componentes purificados do SC por eletroforese das proteínas. Como achados principais, observamos diminuição na frequência de monócitos CD14+ expressando CR3, CR4 e CD59 em pacientes comparado aos controles saudáveis. De forma interessante, o bloqueio do CR3 levou à diminuição em cerca de 30% da infecção *in vitro* pelo DENV-2 em monócitos, sem alterar o fenótipo de ativação ou a ativação da caspase-1 destas células. No entanto, com o bloqueio de CR3, detectamos diminuição na produção de TNF-alfa e IFN-alfa. Não observamos diferença significativa na frequência de linfócitos T expressando CR3, CD46, CD55 e CD59 de em pacientes-Dengue-4. Apesar disso, os linfócitos T CR+ apresentaram um perfil ativado coexpressando CD29, CCR5 e CD107a. Na infecção pelo DENV, independente do sorotipo viral, detectamos elevados níveis circulantes de SC5b-9. Na infecção pelo DENV-1/-2 os níveis mais elevados de SC5b-9 foram observados em pacientes que apresentaram sangramentos e extravasamento plasmático, enquanto nos pacientes-DENV-4, os níveis de SC5b-9 foram correlacionados diretamente com a manutenção da integridade vascular. Entretanto, o SC5b-9 parece estar associado com a liberação de LDH intracelular. Finalmente, vimos que DENV-2 promove a clivagem de C3 na ausência de fator D. Nossos dados sugerem que uma frequência diminuída de monócitos expressando CR3 em pacientes poderia ser uma tentativa de controle da infecção, uma vez que detectamos diminuição da infecção, com o bloqueio de CR3 *in vitro* e ainda, vimos que o DENV-2 modula a clivagem de C3. O aumento da frequência de linfócitos T CR+ coexpressando moléculas de ativação sugere que células de perfil ativado, capazes de controlar a infecção, estariam protegidas da lise via SC. Confirmamos que o SC está ativado na Dengue, pelos altos níveis de SC5b-9. Entretanto, os níveis de SC5b-9 foram associados com a gravidade nos pacientes-DENV-1/-2 enquanto, nos pacientes-DENV-4 foram correlacionados com a manutenção da integridade vascular. Esses dados sugerem que a ativação do SC estaria relacionada diferencialmente com a patogênese de acordo com o sorotipo da infecção.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INFLUENCE OF COMPLEMENT SYSTEM IN INFECTION, CELLULAR ACTIVATION AND ALTERATION ON ENDOTHELIAL CELL PERMEABILITY ON DENGUE

### ABSTRACT

The complement system (CS) develops an important role in the infection control, by direct elimination of pathogens and regulation of the immune response. However, a deregulated CS activation is responsible to induce deleterious effects to the host, contributing to the pathogenesis of several diseases, including Dengue. Besides this, the involvement of the CS on Dengue virus (DENV) infection still has many aspects to be investigated. So, we evaluated the CS contribution during *in vitro* infection of monocytes by DENV; the profile of complement receptors (CR) CR1, CR2, CR3, CR4, CD46, CD55 and CD59 expression on circulating monocytes and T cells from DENV-1, -2 or -4 infected patients by flow cytometry. We assessed the levels of SC5b-9 and cytokines in patients by ELISA. We evaluated the contribution of the CS activation on endothelial permeability and viability by using an *in vitro* model with endothelial cells by accessing the transendothelial electric resistance (TEER) and LDH release on culture supernatants. Finally, the interaction of DENV-2 and purified components was evaluated by electrophoresis of proteins. As principal findings, we observed decreased frequencies of CD14 monocytes expressing CR3, CR4 and CD59 in patients compared to healthy controls. Interestingly, the blockage of CR3 resulted in around 30% reduction of the DENV-2 infection in monocytes *in vitro*, without alteration on activation phenotype neither on caspase-1 activation, of these cells. However, with CR3-blocking we detected decreased production of TNF-alpha and IFN-alpha. Unaltered frequencies of T cells expressing CR3, CD46, CD55 and CD59 were found in DENV-4. Besides, T cells CR+ presented an activated profile, by the coexpression of CD29, CCR5 e CD107a. In DENV infection, regardless the viral serotype, we detected increased levels of circulating SC5b-9. However among the two groups of patients we saw controversial results. In the DENV-1/-2 infection higher levels of SC5b-9 were detected in patients with bleeding and vascular leakage, while in DENV-4 patients, the levels of SC5b-9 were directly correlated with the maintenance of the vascular integrity. Although, the SC5b-9 levels is associated to release of intracellular LDH. Finally, we saw that DENV-2 promotes C3 cleavage in the absence of factor D. Our data suggest that a decreased frequency of CR3-expressing monocytes in DENV-patients would aim to control the infection, since *in vitro*, we detected decreased infection when CR3 was blocked e also, DENV-2 seems to modulate the cleavage of C3. The increased frequency of T cells CR+ coexpressing activation molecules suggest that cells with activated profile, able to control the infection, would be protected of CS mediated lysis. We confirmed that CS is activated during Dengue, by the high levels of SC5b-9. However, the levels of SC5b-9 were associated with to severity in DENV-1/-2 patients, while in DENV-4 it was directly correlated with the maintenance of the vascular integrity. These data suggest that CS activation would be differentially related to the disease pathogenesis in accordance to the serotype of the infection.

# Lista de abreviaturas

---

ADE: aumento da infecção dependente de anticorpo (do inglês: “antibody-dependent enhancement”)

APC: célula apresentadora de antígeno (do inglês: “antigen-presenting cell”)

ATP: trifosfato de adenosina (do inglês: “adenosine-5'-triphosphate”)

ALT/TGP: alanina aminotransferase/transaminase glutâmico-pirúvica

AST/TGO: aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico-oxalacética

BSA: albumina sérica bovina

C1-INH: proteína inibidora do componente-1 do complemento (do inglês: “C1-inhibitor protein”)

C4BP: proteína ligadora de C4 (do inglês: “C4 binding protein”)

CCL2/MCP-1: ligante 2 de CC quimiocina/ proteína quimiotática de monócitos-1 (do inglês: “chemokine C-C motif ligand 2/ monocyte chemotactic protein 1”)

CCL3/MIP-1 $\alpha$ : ligante 3 de CC quimiocina/proteína 1alfa inflamatória de macrófagos (do inglês: “chemokine C-C motif ligand 3/ macrophage inflammatory protein-1 alpha”)

CCL4/MIP-1 $\beta$ : ligante 4 de CC quimiocina/proteína 1beta inflamatória de macrófagos (do inglês: “chemokine C-C motif ligand 4/ macrophage inflammatory protein-1 beta”)

CCL5/RANTES: ligante 5 de CC quimiocina/ regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais (do inglês: “chemokine C-C motif ligand 5/ regulated on activation, normal T expressed and secreted”)

CE: célula endotelial

CFHR1: proteína 1 relacionada ao fator H do complemento (do inglês: “complement factor H-related 1 protein”)

CI: complexo-imune

CLEC5A: do inglês “C-type lectin domain Family 5 member A”

CMV: citomegalovírus

CR: receptor de complemento

CXCL9: ligante 9 de quimiocina CXC (do inglês: “chemokine CXC motif ligand 9”)

CXCL10/IP-10: ligante 10 de quimiocina CXC (do inglês: “chemokine CXC motif ligand 10”)

D: domínios da proteína de envelope do vírus Dengue

DAF: Fator acelerador do decaimento (do inglês: “decay accelerating factor”)

DC: célula dendrítica (do inglês: “dendritic cell”)

DC-SIGN: ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de célula dendrítica (do inglês: DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin)

dsRNA ácido ribonucleico de dupla fita

DENV: vírus da Dengue

EBM-2: meio endotelial basal

EBV: vírus Epstein Barr

ELISA: ensaio imuno-enzimático

Fc: fragmento cristalizado

fB, D, I ou H: fator B, D, I ou H

FcyR: receptor do fragmento Fc da imunoglobulina gama

FD: febre do dengue

FD/SA: dengue com sinais de alarme

FHD: febre hemorrágica do dengue

FSC – Parâmetro de dispersão frontal – Tamanho (do inglês: “forward scatter cytometric”)

GPI: glicosil fosfatidilinositol

GRP78: proteína reguladora de glicose de 78kDa (do inglês: “glucose-regulated protein”)  
HBV: vírus da hepatite B  
HCV: vírus da hepatite C  
HHV-7: herpes vírus humano 7  
HIV: vírus da imunodeficiência humana  
HLA: Antígeno leucocitário humano (do inglês: “human leukocyte antigen”)  
HMEC-1: células endoteliais microvasculares (do inglês: “human microvascular endothelial cell-1”)  
HMVEC-d: célula endotelial microvascular dermal humana (do inglês: “human dermal microvascular endothelial cell”)  
Hsp70/90: proteínas do choque térmico família de chaperona 70 e 90 (do inglês: “heat shock proteins”)  
HUVEC: célula endotelial da veia umbilical humana (do inglês: “human umbilical vascular endothelial cell”)  
HTLV-1: leucemia/linfomavírus tipo-1  
HPMEC: células endoteliais microvasculares pulmonares (do inglês: “human pulmonary microvascular endothelial cell”)  
ICAM-1: molécula de adesão intracelular-1  
IFNAR: receptor de IFN alfa/beta  
IgG: imunoglobulina G  
IgM: imunoglobulina M  
IL-1 $\beta$ /beta: interleucina-1beta  
IL-2/-4/-6/-8/-10/-12/-18: interleucina-24/-6/-8/-10/-12/-18  
IFN-alfa/-beta/-gama: interferon-alfa/-beta/-gama  
IRF3: fator 3 regulador do interferon (do inglês: “interferon regulatory factor 3”)  
JAK: quinase de Janus  
JEV: vírus da encefalite japonesa  
L-SIGN: ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de fígado/linfonodo  
LDH: lactado desidrogenase  
LCMV: vírus coriomeningitis linfocítica (do inglês: “lymphocytic choriomeningitis virus”)  
LPS: lipopolissacarídeo  
MAC: complexo de ataque à membrana (do inglês: “membrane attack complex”)  
MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês: “mitogen-activated protein kinases”)  
MASP: lectina ligada a manose associada a serino-proteases (do inglês: “manose binding lectin associated serine proteases”)  
MBL: lectina ligada a manose (do inglês: “manose binding lectin” )  
MCP: proteína cofatora de membrana (do inglês: “membrane cofactor protein”)  
MDA5: fator de diferenciação do mieloma-5  
MHC: complexo maior de histocompatibilidade (do inglês: “major histocompatibility complex”)  
Mr: peso molecular relativo  
mTOR: do inglês: “mammalian target of rapamycin”  
mRNA: ácido ribonucléico mensageiro  
NF $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (do inglês: “nuclear factor kappa beta”)  
NK: Célula natural killer (do inglês: “natural killer”)  
NKT: Célula natural killer (do inglês: “natural killer T”)  
NS: proteína não estrutural do vírus Dengue  
NO - óxido nítrico  
OMS: organização mundial de saúde

PAF: fator de ativação plaquetária (do inglês: “platelet activating factor receptor”)  
PAMPs: padrão molecular associado a patógenos (do inglês: “pathogen associated molecular pattern”)  
PBS: tampão fosfato-salino  
PBMC: células mononucleares do sangue periférico (do inglês: “peripheral blood mononuclear cells”)  
PI-3K: fosfoinositol 3 quinase (do inglês: “Phosphoinositide-3 kinase”)  
PMN: células polimorfonucleares  
prM: proteína precursora de membrana do vírus Dengue  
Proteína C: proteína do capsídeo viral  
Proteína M: proteína de membrana  
Proteína E: proteína de envelope  
RGD: peptídeo contendo a sequência de aminoácidos: Arg-Gly-Asp  
RIG-I: gene induzido pelo ácido retinóico- I  
RNA: ácido ribonucleico  
RT-PCR: reação da transcriptase reversa  
SC: sistema complemento  
SCD: síndrome do choque por dengue  
SFB: soro fetal bovino  
SNC: sistema nervoso central  
SLE: lúpus eritematoso sistêmico  
STAT2: transdutor e ativador do sinal de transcrição (do inglês “signal transducer and activator of transcription” )  
STING: estimulador dos genes de interferon (do inglês: “stimulator of interferon genes”)  
TDR: programa especial para pesquisa e treinamento em doenças tropicais (do inglês: “special programme for research and training in tropical diseases”)  
TEER: medida da resistência elétrica transendotelial (do inglês: “trans endothelial electric resistance”)  
TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento  $\beta$  (do inglês: “transforming growth factor”)  
Th-1, -2: células T CD4+ auxiliares de perfil -1, -2 (do inglês: “t helper”)  
THP-1: linhagem celular monocítica de leucemia aguda  
TLRs : receptores do tipo Toll (do inglês: “toll like receptors”)  
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina  
TNF: fator de necrose tumoral (do inglês: “tumor necrosis factor ”)  
VCAM: proteína de adesão celular vascular-1 (do inglês: “vascular cell adhesion protein 1”)  
VEGF: fator de crescimento vascular endotelial (do inglês: “vascular endothelial growth factor”)  
WNV: vírus do Oeste do Nilo  
YFV: vírus da Febre Amarela (do inglês: “Yellow Fever virus”)

# Sumário

---

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Dengue.....	1
1.1.1. Epidemiologia.....	1
1.1.2. Estrutura, replicação e receptores celulares virais.....	2
1.1.3. Patogênese da Dengue.....	6
1.1.3.1. Principais Teorias associadas à gravidade.....	8
1.1.3.2. Mecanismos de desregulação da resposta imune durante infecção pelo DENV.....	10
1.1.3.3. Distúrbios no endotélio vascular.....	13
1.2. Sistema Complemento.....	16
1.2.1. Vias de ativação e Mecanismos de regulação.....	16
1.2.2. Receptores do sistema complemento na regulação da resposta imune.....	23
1.2.3. Sistema complemento e células endoteliais.....	26
1.2.4. Envolvimento do sistema complemento na infecção pelo vírus Dengue.....	27
1.3. Hipótese.....	29
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. População de estudo.....	31
3.2. Diagnóstico laboratorial e classificação clínica.....	31
3.3. Obtenção e preservação de soro, plasma e células mononucleares do sangue periférico (PBMC), plasma e soro de pacientes infectados pelo DENV e controles.....	32
3.4. Isolamento de monócitos primários.....	32
3.5. Manutenção da cultura de células C6/36.....	33
3.6. Crescimento e concentração do vírus DENV-2 (cepa 16681).....	33
3.7. Titulação viral por imunofluorescência indireta.....	34
3.8. Marcação extra- e intra-celular por citometria de fluxo.....	34

3.9. Avaliação dos níveis de SC5b-9 plasmáticos e séricos e de IFN-alfa e NS1 nos sobrenadantes das culturas de monócitos por ELISA.....	36
3.10. Bloqueio dos CR seguido da infecção pelo DENV-2 de monócitos.....	37
3.11. Ensaio de CBA para dosagem de citocinas nos sobrenadantes das culturas. ....	37
3.12. Avaliação dos níveis séricos de citocinas por Luminex.....	38
3.13. Eletroforese de proteínas utilizando-se gel SDS-Poliacrilamida.....	38
3.14. Coloração com Coomassie blue. ....	39
3.15. Transferência de proteína para a membrana de PDVF (Fluoreto de polivinilideno). ....	39
3.16. Western blot. ....	39
3.17. Padronização do ensaio de ativação do sistema complemento <i>in vitro</i> utilizando a proteína p24 do HIV como alvo. ....	40
3.18. Cultivo e manutenção das culturas de células endoteliais microvasculares da derme humana (HMVEC-d).....	41
3.19. Ensaio de permeabilidade transendotelial através da medida da resistência elétrica transendotelial (TEER). ....	42
3.20. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de detecção da LDH (lactato desidrogenase)..	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Investigação do perfil de expressão de receptores do complemento (CR) CR1(CD35), CR2(CD21), CR3(CD11b) CR4(CD11c) e CD59 em monócitos de pacientes infectados pelo DENV e do envolvimento dos CR na regulação da infecção pelo DENV-2 <i>in vitro</i> utilizando monócitos primários de doadores.....	44
4.1.1. Caracterização clínica e laboratorial da população de estudo. ....	44
4.1.2. Diminuição da frequência de monócitos expressando CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e CD59 em pacientes infectados pelo DENV. ....	47
4.1.3. Elevados níveis plasmáticos do produto de ativação do sistema complemento SC5b-9 nas formas mais graves da doença. ....	49
4.1.4. A infecção pelo DENV-2 de monócitos humanos primários <i>in vitro</i> não altera o perfil de expressão dos receptores do SC nestas células-alvo.....	50
4.1.5. O bloqueio do CR3 (CD11b) antes da infecção pelo DENV-2 em monócitos <i>in vitro</i> diminui a taxa de infecção pelo DENV nestas células-alvo.....	53
4.1.6. O bloqueio do CR3 (CD11b) antes da infecção pelo DENV-2 em monócitos <i>in vitro</i> não altera o perfil de ativação destas células-alvo.....	55

4.1.7. O bloqueio de CR3 (CD11b) antes da infecção pelo DENV-2 em monócitos <i>in vitro</i> não altera a ativação da caspase-1, porém diminui a produção das citocinas TNF-alfa e IFN-alfa.....	56
4.2. Caracterização do perfil de ativação de linfócitos T de pacientes infectados pelo DENV co-expressando CR associados à ativação ou a regulação do SC (CR3 (CD11b), CD46, CD55 e CD59) e impacto da ativação do SC na alteração da permeabilidade endotelial em modelo <i>in vitro</i> .....	59
4.2.1. Caracterização clínica e laboratorial da população de estudo. ....	59
4.2.2. Elevados níveis séricos do produto de ativação do Sistema Complemento SC5b-9 na Dengue.....	61
4.2.3. Inalterada frequência de linfócitos T expressando CR3 (CD11b), CD46, CD55 e CD59, e aumento da frequência de linfócitos T coexpressando CR e marcadores de ativação em pacientes infectados pelo DENV. ....	63
4.2.4. Níveis séricos de SC5b-9 e frequência de linfócitos T expressando os CR correlacionados com citocinas séricas em pacientes.....	68
4.2.5 Correlação entre ativação do sistema complemento, através da medida do SC5b-9, e alteração da permeabilidade vascular. ....	69
4.3. Clivagem de C3 na presença do DENV-2 e de componentes da via alternativa do sistema complemento.....	71
5. DISCUSSÃO .....	79
6. CONCLUSÃO.....	94
7. BIBLIOGRAFIA .....	95
8. ANEXOS .....	114

# Lista de tabelas

---

Tabela 3. 3: Anticorpos utilizados para citometria de fluxo. ....	36
Tabela 3.1: Kits de ELISA para dosagem de fatores solúveis no plasma de pacientes. ....	37
Tabela 3. 2: Anticorpos neutralizantes para os receptores de complemento. ....	37
Tabela 3.4: Preparação de gel SDS-poliacrilamida em diferentes percentuais. ....	39
Tabela 3. 5: Anticorpos usados para Western blot. ....	40
Tabela 4.1: Perfil demográfico, clínico e laboratorial dos pacientes. ....	46
Tabela 4.2: Níveis de SC5b-9 plasmáticos em pacientes associados ou não com manifestações hemorrágicas e sintomas de extravasamento vascular. ....	50
Tabela 4.3: Frequência de monócitos infectados ou não que expressam CR na infecção pelo DENV-2 <i>in vitro</i> . ....	51
Tabela 4.4: Frequência do antígeno viral do DENV-2 em monócitos que expressam CR. ....	52
Tabela 4.5. Comparação da expressão de moléculas de ativação em monócitos infectados ou não pelo DENV-2 <i>in vitro</i> . ....	55
Tabela 4.6: Efeito do bloqueio prévio de CR1 (CD35) e CR3 (CD11b) seguido da infecção pelo DENV-2 <i>in vitro</i> na coexpressão CR e moléculas de ativação em monócitos de doadores. ....	56
Tabela 4.7: Perfil demográfico clínico e laboratorial dos pacientes. ....	61
Tabela 4.8: Correlação entre níveis de SC5b-9 séricos e frequência de linfócitos T expressando os CR com citocinas em pacientes. ....	68



# Lista de figuras

---

Figura 1.1: Estrutura do DENV e proteínas estruturais: .....	3
Figura 1. 2: Ciclo de vida do DENV. ....	5
Figura 1. 3: Nova classificação da clínica para os casos de dengue segundo o programa TDR/2009.....	7
Figura 1. 4: Mecanismos relacionados à imunopatogênese da Dengue. ....	13
Figura 1. 5. Visão geral das vias de ativação do sistema complemento: Ativação do SC pelas vias clássica, da lectina e alternativa. ....	18
Figura 1. 6. Ativação e degradação de C3. ....	21
Figura 1.7. Perfil eletroforético dos fragmentos de C3. A direita é observado o controle de peso.....	22
Figura 3. 1: Padronização do ensaio de ativação do sistema complemento <i>in vitro</i> .....	41
Figura 4.1: Frequência de monócitos expressando receptores de complemento em pacientes infectados pelo DENV e controles saudáveis por citometria de fluxo.....	48
Figura 4.2: Níveis plasmáticos do produto de ativação do sistema complemento SC5b-9. ....	49
Figura 4.3. Expressão de CR nos monócitos infectados ou não pelo DENV-2 <i>in vitro</i> . ....	51
Figura 4.4. Infecção pelo DENV em monócitos que expressam CR.. ....	52
Figura 4.5: Efeito do bloqueio dos CRs na infecção pelo DENV-2 em monócitos <i>in vitro</i> . ....	54
Figura 4.6: Efeito do bloqueio dos CR na infecção pelo DENV-2 <i>in vitro</i> na ativação da caspase-1.....	57
Figura 4.7: Efeito do bloqueio dos CRs em em monócitos infectados pelo DENV-2 <i>in vitro</i> na produção de TNF-alfa e IFN-alfa. ....	58
Figura 4.8. Quantificação sérica do produto de ativação SC5b-9 do sistema complemento.....	62
Figura 4.9: Frequência de linfócitos T expressando CR3 (CD11b), CD46, CD55 e CD59 em pacientes infectados pelo DENV-4. ....	65
Figura 4.10: Frequência de linfócitos T expressando marcadores de ativação CD29, CCR5 e CD107a em pacientes infectados pelo DENV-4 .....	65
Figura 4.11: Frequência de linfócitos T coexpressando os marcadores de ativação e CR em pacientes infectados pelo DENV-4. ....	67

Figura 4.12: Medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) em HMVEC na presença de soro de pacientes: .....	70
Figura 4.14: Padronização da reação de ativação da via alternativa do SC na fase fluída com geração de C3b.....	73
Figura 4.15: Padronização da reação de ativação da via alternativa do SC na fase fluída com geração de iC3b.....	75
Figura 4.16 Padronização da reação de ativação da via alternativa do SC na fase fluída com geração de C3b e iC3b.....	77

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Dengue

---

O vírus Dengue (DENV) é membro da família *Flaviviridae*, pertencente ao gênero *Flavivirus*. Este gênero compreende vírus causadores de importantes arboviroses mundiais, como o vírus da Febre Amarela, da Encefalite Japonesa e do Oeste do Nilo. Devido à dependência da presença de hospedeiros, vetores e do ecossistema, em geral a distribuição geográfica desses vírus não é uniforme. Entretanto, a emergência de infecções por estes vírus em áreas anteriormente não afetadas é facilitada pelas mudanças climáticas, urbanização, viagens internacionais e adaptação dos flavivirus a novas espécies de vetores (1). Dengue é uma doença de grande incidência mundial, com grande impacto na saúde pública, causando aproximadamente 50 a 100 milhões de infecções e mais de 20 mil mortes, anualmente. Acredita-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas endêmicas nas regiões subtropicais e tropicais do planeta, particularmente na África e América do Sul, onde há cocirculação do vírus da Febre Amarela (2) e no Sudeste Asiático, onde há cocirculação do vírus da Encefalite Japonesa (3).

### 1.1.1. Epidemiologia

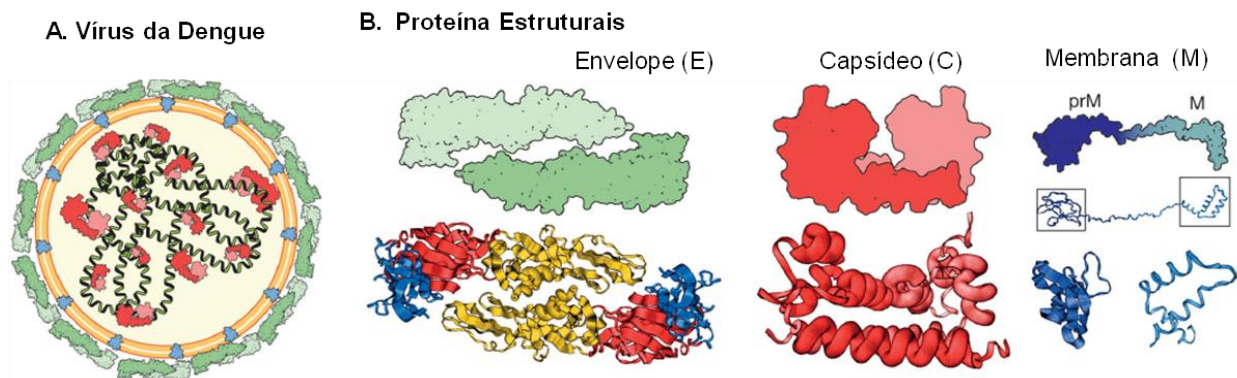
Os primeiros casos de Dengue diagnosticados laboratorialmente no Brasil ocorreram na década de 80, com introdução do sorotipo 1 do DENV (DENV-1) na região Norte do país (4), o qual espalhou-se rapidamente por diversos estados brasileiros (5-6). Posteriormente, no ano de 1990 foi detectado o DENV-2 circulando simultaneamente com o DENV-1, nesta epidemia surgiram os primeiros relatos de febre hemorrágica do dengue (FHD) (7). No ano de 2001, ocorreu a entrada do DENV-3 e a cocirculação dos três sorotipos DENV-1, -2 e -3, resultando em um grande número de casos de febre do dengue (FD) e FHD (8-9). O DENV-4 detectado pela primeira vez em 1981, após um longo período sem circular, voltou a ser isolado em 2010 no estado de Roraima na região Norte do país (10). Estudo recente apontou a predominância da circulação de DENV-2 em 2010, DENV-1 em 2011 e DENV-4 em 2012 no Rio de Janeiro (11). O panorama epidemiológico no Brasil é caracterizado por um quadro de endemia com epidemias periódicas e circulação autóctone dos quatro

sorotipos. Dentre os quais, DENV-2 e -3 vêm sendo associado a maior incidência de casos graves, enquanto DENV-1 e 4 estariam envolvidos com casos mais brandos da doença (11-12). A emergência e reemergência dos diferentes sorotipos afetam a epidemiologia da doença, especialmente quando há cocirculação.

### **1.1.2. Estrutura, replicação e receptores celulares virais**

O DENV circula na forma de quatro sorotipos antigenicamente distintos, identificados pela numeração de 1 a 4. O material genético do vírus compreende uma fita única de RNA, de 11Kb senso positivo, capaz de codificar três proteínas estruturais (capsídeo-C, membrana-M e envelope-E) e sete proteínas não estruturais (NS, NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B e 5). A partícula viral possui diâmetro de 50nm e é envolvida por uma bicamada lipídica associada às proteínas E e M. A proteína M é sintetizada como proteína precursora prM, a qual está presente nas partículas imaturas do DENV. No interior da bicamada lipídica encontra-se o RNA viral complexado à proteína C. (figura 1.1) (13-14).

A proteína E possui 54KDa e encontra-se ancorada ao envelope do vírus através de duas hélices transmembranares antiparalelas ligadas a porção terminal da proteína C. A proteína E está envolvida diretamente nos processos de infecção, mediando adsorção viral, endocitose e fusão por ação dos seus três domínios (D) DI, DII e DIII (figura 1.1B). O DI conecta DII e DIII que através de alças flexíveis, participam das mudanças conformacionais da proteína E direcionando o processo de fusão viral. O DII contém o peptídeo de fusão e o DIII é responsável pela ligação do vírus aos receptores celulares e pelo direcionamento das partículas virais aos compartimentos endossomais. A proteína E contém resíduos glicosilados de asparagina (N67 e N153) responsáveis por mediar a interação com fatores de adesão na superfície celular (15).



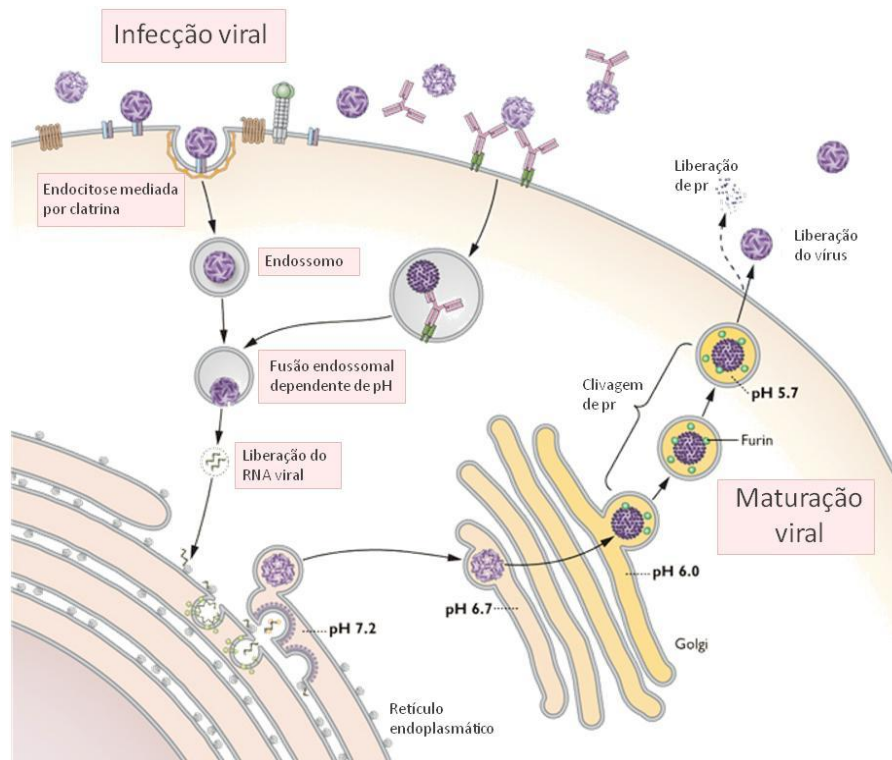
**Figura 1.1: Estrutura do DENV e proteínas estruturais:** (A) Representação esquemática da estrutura do DENV, composto por: 1- envelope lipídico (laranja); 2- homodímeros da proteína de Envelope (em verde); 3- proteínas de Membrana (azul); 4- ssRNA associado a proteína de Capsídeo (vermelho). (B) Representação esquemática da estrutura das proteínas estruturais. Na proteína do Envelope: domínios DI (vermelho), DII (amarelo) e DIII (azul), Capsídeo (C) e precursora de Membrana (prM) e (M). Adaptado de (13)

Durante a infecção, a proteína E medeia processos de ligação do vírus aos receptores da célula alvo, como também a fusão entre as membranas virais e do hospedeiro durante a internalização do vírus por endocitose mediada por receptor. Esse processo é disparado pela diminuição do pH endossomal, no qual resíduos de histidina sensíveis ao pH localizados na região N-terminal da proteína M, são protonados permitindo a separação das proteínas E e M e exposição do peptídeo de fusão do DII à membrana endossomal (16), resultando na liberação do RNA viral no citoplasma. Por ser uma fita simples de RNA positivo, a tradução proteica é iniciada imediatamente, produzindo uma poliproteína que será clivada tanto por proteases do hospedeiro, quanto virais (NS2B-NS3). Inicialmente, ocorre a clivagem das prM, E, NS1 e NS4B e em seguida da proteína C e das outras proteínas NS. Após a síntese das proteínas E e prM, elas se inserem na membrana do retículo endoplasmático, enquanto o RNA associa-se com a proteína C formando o nucleocapsídeo no lado citosólico do retículo endoplasmático. Em seguida, o nucleocapsídeo une-se a prM e E dando origem aos virions imaturos (17). Durante o processo de maturação viral, o ambiente ácido da rede trans-Golgi induz mudanças conformacionais na prM expondo os sítios de clivagem entre proteína M e o peptídeo pr (18). A prevenção da fusão viral durante a via de secreção na rede trans-Golgi é conferida pela propriedade da pr permanecer ligada a superfície do virion em ambiente ácido (19) e pela interação prM e o DII que forma um escudo, protegendo contra alterações conformacionais na proteína E (15). A prM é clivada em M pela protease do hospedeiro furina, dando origem aos virions maduros que serão transportados em vesículas secretórias para superfície celular e liberados por exocitose (17) (figura 1.2). Curiosamente, partículas virais imaturas são também liberadas durante este processo, essas partículas não são infecciosas, porém

ativam a resposta imune resultando na produção de anticorpos anti-prM que são detectados no soro de pacientes (20-21).

A glicoproteína NS1, de aproximadamente 45KDa, desempenha um papel importante como cofator na replicação viral (22), contudo sua função precisa ainda não foi elucidada. Sabe-se que durante a infecção viral a NS1 é translocada pela via do retículo endoplasmático utilizando a sequência de sinal localizada na região C-terminal da proteína E. No lúmen do retículo endoplasmático, NS1 colocaliza com o RNA de dupla fita (22) ancorando o complexo proteico replicativo na membrana desta organela (23). A proteína NS1 pode ser endereçada a para a via secretora e permanecer ancorada à membrana plasmática da célula infectada (mNS1), ou secretada para o meio extracelular na forma de hexâmeros (sNS1) (24-25). As formas sNS1 e mNS1 são altamente imunogênicas induzindo resposta humoral, além de estar associada na patogênese da doença (26-28). De forma interessante, recentemente autores sugerem que o papel da NS1 como uma endotoxina viral, uma vez que a incubação com a proteína NS1 purificada levou a ativação de macrófagos murinos e células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) via o receptor do tipo Toll-4 (TLR-4), induzindo a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, este efeito foi inibido pelo uso de antagonista do TLR-4 ou bloqueio com anticorpo monoclonal anti-TLR4 (29). Outro estudo demonstrou ainda, que durante a infecção *in vitro* pelo DENV a adição da proteína NS1 aumenta a produção de IL-6 e TNF-alfa por PBMCs e que, o bloqueio dos TLR2 e TLR6, com anticorpos neutralizantes, resultou na diminuição da produção destas citocinas, sugerindo que a NS1 teria um papel também na ativação dos TLR2 e TLR6 na infecção pelo DENV(30). Pouco é descrito sobre a atividade das proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A e NS4B. Aparentemente, a proteína NS4A funciona como âncora da replicase viral à membrana celular. Enquanto, a proteína NS4B auxilia na replicação viral em associação à NS3 (31). Além disso, essas proteínas também atuam na inibição da resposta dos interferon- $\alpha/\beta$  em indivíduos infectados (32-33). A NS3 é uma proteína de aproximadamente 70 kDa, bastante conservada entre os flavivírus, que participa da replicação viral atuando como helicase de RNA. E também como protease, junto com NS2B, participando da clivagem da poliproteína viral (32, 34). A proteína NS5 apresenta atividades enzimáticas essenciais para replicação do vírus, como de metiltransferase responsável pela metilação da extremidade 5' do RNA viral. A região C terminal da NS5 é uma RNA polimerase, que

atua na síntese do RNA intermediário que serve de molde para transcrição da fita positiva de RNA (32).



**Figura 1. 2: Ciclo de vida do DENV.** O DENV interage com receptores presentes na superfície da célula alvo. Além disso, complexos imunes formados pela interação vírus-anticorpo pode se ligar aos receptores Fc presentes na célula-alvo. Uma vez ligado ao receptor viral na célula-alvo, o DENV é internalizado por endocitose mediada por clatrina e é direcionado aos compartimentos endossomais, onde ocorre fusão viral de maneira dependente de pH. A fita simples de RNA positivo é então liberada no citoplasma, onde ocorre a replicação direcionada pelas proteínas não estruturais (NS) do vírus. A montagem da partícula viral ocorre no retículo endoplasmático, inicialmente na forma imatura contendo as proteína pré-membrana (prM) e E. A prM é clivada em M pela protease do hospedeiro furina e as partículas virais são liberadas no espaço extracelular por exocitose. Adaptado de (35)

Os estágios iniciais da infecção pelo DENV são dependentes das interações das proteínas da superfície viral e componentes da membrana plasmática da célula-alvo, interagem de maneira inespecífica, concentrando o vírus no local, facilitando sua ligação com o receptor capaz de mediar a endocitose das partículas virais (36). Neste contexto, a etapa de glicosilação das proteínas virais, durante o trânsito pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi, permite que a proteína seja montada de maneira

adequada conferindo-lhe funcionalidade (37-38). A glicosilação do DII da proteína E é crítica para a interação do DENV com o domínio que reconhece carboidratos da molécula de DC-SIGN (do inglês: “C-type lectin dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3- grabbing non-integrin”), facilitando a infecção de células dendríticas (39-40). Entretanto, foi demonstrado que a internalização do DENV parece não necessitar de sinais provenientes do DC-SIGN, uma vez que a mutação na molécula de DC-SIGN, que a torna incapaz de promover endocitose, não inibiu a infecção pelo DENV em comparação a células expressando DC-SIGN funcional, sendo assim, os autores sugerem que o DC-SIGN seria um fator de fixação do vírus à célula (41). Outros receptores descritos como alvos para a infecção pelo DENV incluem as proteínas HSP90, HSP70 (do inglês “Heat shock proteins”), GRP78 (do inglês “Glucose-regulated protein”) e heparan-sulfato em hepatócitos (42-45), receptor de manose (CD205) (46) em monócitos e macrófagos. O envolvimento de diferentes receptores neste processo aumenta a variedade de células susceptíveis à infecção, acometendo diversos órgãos e tecidos. O antígeno viral já foi detectado no fígado, pulmão, linfonodos, coração e cérebro (47-49). Além disso, células fagocíticas mononucleares como monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs, do inglês: “dendritic cells”) (50-52). Células epiteliais, endoteliais e hepatócitos (53-54) também suportam a infecção e replicação do DENV (55).

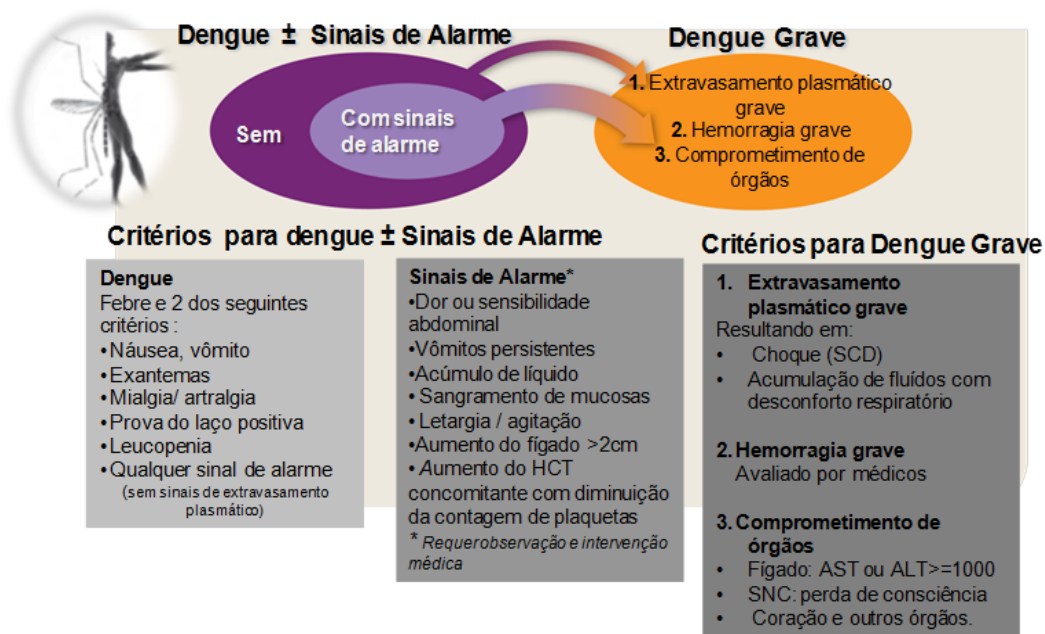
### **1.1.3. Patogênese da Dengue**

A infecção pelo DENV ocorre através da picada de mosquitos vetores, principalmente o *Aedes aegypti*. Todos os quatro sorotipos do vírus são capazes de causar um amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde uma doença de curso febril aguda, a febre do dengue (FD), até uma série de distúrbios hemodinâmicos caracterizados por manifestações hemorrágicas graves, extravasamento plasmático e comprometimento de órgãos, que podem evoluir para o choque e óbito (56). Na classificação clássica da doença de 1997, recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a Dengue era dividida em dengue clássica ou FD, caracterizada por uma doença de curso benigno, de sintomatologia indiferenciada como febre de 2 a 7 dias, dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia e artralgia (57). Ainda nesta classificação, os pacientes agrupados em febre hemorrágica do dengue (FHD), apresentavam com manifestações hemorrágicas, trombocitopenia acentuada (contagem de plaquetas inferior a  $100000/\text{mm}^3$ ), evidências de aumento na permeabilidade vascular, como hemoconcentração (aumento do hematócrito em pelo menos 20%) e extravasamento



de líquidos para a cavidade abdominal e pleural. Nesta classificação, à FHD eram atribuídos ainda quatro graus de gravidade, dentre os quais os graus I e II incluíam casos sem sinais de falência circulatória, enquanto os graus III e IV agrupavam casos com choque. Por fim, a síndrome do choque por Dengue SCD englobava pacientes apresentando choque hipovolêmico, pulso fino, hipotensão, extremidades frias e pele úmida e ainda com risco de óbito eminente (58).

Contudo, devido a rigidez e dificuldade na aplicação dos critérios propostos no atendimento primário aos pacientes pela classificação tradicional, a OMS propôs uma nova classificação para os casos de Dengue. A classificação atual de 2009 agrupa os pacientes pela presença, ou não, de sinais de alarme e casos mais graves (59), visando melhorar a triagem, oferecer tratamento rápido e mais eficaz aos pacientes. Os critérios adotados pela nova classificação são exemplificados na figura 1.4 (60) e foram os utilizados no nosso estudo.



**Figura 1. 3: Atual classificação da clínica para os casos de Dengue segundo o programa TDR/2009** (do inglês: “special programe for research and training in tropical diseases”). Classificação das formas clínicas da Dengue e sinais e sintomas clínicos associados (59).

### **1.1.3.1. Principais Teorias associadas à gravidade**

A grande variedade de manifestações clínicas observadas durante a infecção pelo DENV sugere a existência de múltiplos fatores, contribuindo sinergicamente para a gravidade da doença, os quais estão relacionados tanto ao vírus quanto ao hospedeiro. Dentre os quais podemos citar: infecções primárias por um sorotipo e sequenciais por outro sorotipo determinado, neste caso foi relatado que a doença prévia por DENV-1 ou DENV-3 seguida de infecção pelo DENV-2 estaria associada ao desenvolvimento de infecções secundárias mais graves (61-63). Em relação aos fatores virais, a virulência da cepa viral infectante, como observado entre os diferentes genótipos do DENV-2, já foi associada a maior ou menor gravidade da doença. O genótipo asiático é frequentemente associado aos casos de FHD, diferente do observado para o genótipo americano, raramente associado com a gravidade (64-65). Um estudo retrospectivo demonstrou que na coorte de pacientes analisada as infecções DENV-2 eram predominantemente secundárias em comparação a infecção por outros sorotipos. Além disso, pacientes infectados pelo DENV-2 apresentaram maior incidência de extravasamento plasmático em comparação aos demais sorotipos. Já as infecções por DENV-1 resultaram, frequentemente, em uma doença de gravidade intermediária, sem extravasamento plasmático. Por fim as infecções pelo DENV-4 apresentavam-se como uma doença de curso brando (66). Foi reportado, ainda, correlação direta entre a replicação viral e os níveis séricos de NS1, estando ambos associados com a gravidade da doença (67).

No que diz respeito ao hospedeiro, fatores como idade, (68-69), estado nutricional (70), genética, como polimorfismos em receptores celulares, genes de citocinas e moléculas do HLA, estão envolvidos no desfecho clínico da doença. Neste sentido, estudo demonstrou que mutação no alelo do gene do receptor de vitamina D estaria associada com resistência a Dengue grave. No mesmo trabalho foi observado que mutações no receptor FcγRII estaria associado proteção contra FHD (71). Uma mutação funcional na região promotora do DC-SIGN, molécula envolvida na infecção de DCs pelo DENV, foi associada a Dengue branda, FD (72). O gene do HLA (do inglês: "human leukocyte antigen") que codifica moléculas do MHC (do inglês: "major histocompatibility complex") de classe I e II tem sido descrito como marcador de susceptibilidade e resistência às formas graves da Dengue em diversos países, inclusive no Brasil. Onde foi demonstrado associação entre o desenvolvimento de FHD e HLA-A\*01 e a resistência a FHD com o alelo HLA-A\*31 em pacientes do Rio de

Janeiro (73). Em uma coorte de Recife, o HLA-B\*44 foi associado ao maior risco de FHD na infecção pelo DENV-3 e o HLA-B\*07A a resistência à infecção secundária pelo DENV-3, sugerindo que este alelo poderia estar envolvido em uma resposta de células T de reação cruzada protetora na Dengue (74). Polimorfismos genéticos podem modular a produção de citocinas que por sua vez, influenciam no desfecho clínico da doença. Neste sentido foi descrito que polimorfismo na IL-10, IL-6, TGFbeta-1, TNF-alfa e IFN-gama estariam envolvidos na maior gravidade da doença, revisado por (75).

Somado aos fatores acima, a infecção secundária por um sorotipo heterólogo é apontada como um importante fator de risco para o desenvolvimento das formas graves (76-77), uma das primeiras teorias para explicar essa hipótese foi baseada na resposta humoral. Durante a infecção pelo DENV, a resposta humoral é direcionada principalmente contra as proteínas E, prM e NS1, em menor magnitude para as NS3 e NS5 (78-79). Anticorpos produzidos durante a infecção conferem imunidade duradora contra reinfecções pelo mesmo sorotipo. No contexto de uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo, a imunidade é de curta duração, os anticorpos são não-neutralizantes ou subneutralizantes e reagem de forma cruzada com o vírus, sem neutralizá-lo, formando complexos imune (CI), vírus-anticorpo. Esses CI podem ser internalizados por células que expressam receptores para a porção Fc de anticorpos (FcγR), como macrófagos, monócitos e células dendríticas (80). Os vírus são então liberados nos compartimentos ácidos intracelulares pela via endocítica, similar ao que ocorre na entrada de partículas virais na endocitose mediada por receptor (figura 1.2) (81). Este fenômeno ficou conhecido como facilitação da infecção dependente de anticorpo, ou ADE (ADE do inglês: “Antibody dependent enhancement”), resultando tanto no aumento do número de células infectadas, quanto na quantidade de vírus produzido, que por sua vez influenciaria na gravidade da doença.

Durante infecções secundárias foi observada ainda expansão preferencial de células T de memória para epitopos heterólogos, sensibilizadas durante uma infecção prévia, em detrimento as células T naive específicas para o sorotipo da infecção atual. As células de memória de reatividade-cruzada apresentam afinidade baixa para o sorotipo infectante, porém alta afinidade para o sorotipo da infecção anterior, comprometendo a eliminação viral. Este perfil de resposta de células T de reatividade-cruzada deu origem à teoria do pecado antigênico original (82). Posteriormente, foi demonstrado que estas células de reatividade cruzada apresentariam um perfil pró-inflamatório preferencialmente produtor de citocinas como TNF-alfa e IFN-gama e

exibindo degranulação subótima (com expressão de CD107a diminuída) (83). Prejuízos na eliminação viral prolongaria a ativação das células T CD8 de reatividade-cruzada e a liberação de citocinas que contribuiriam para o extravasamento plasmático.

### **1.1.3.2. Mecanismos de desregulação da resposta imune durante infecção pelo DENV.**

Como mencionado anteriormente, a infecção pelo DENV é complexa e envolve uma variedade de fatores, levando a pontos críticos nos quais destacam-se as manifestações hemorrágicas e o extravasamento plasmático, em geral 4 a 7 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (57). Neste período, a carga viral normalmente já está controlada pela resposta imune anti-viral (84), sugerindo que as complicações clínicas da Dengue estariam intimamente relacionadas à uma desregulação da resposta imunológica do hospedeiro e em menor grau, a presença do vírus.

Durante as fases iniciais da infecção, componentes da resposta imune inata, como DCs e células NK (do inglês: “Natural Killer”), são ativados pelo reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) através dos receptores de reconhecimento de padrões, como TLRs (receptores do tipo Toll), RIG-I (gene induzido pelo ácido retinóico- I) e MDA5 (fator de diferenciação do mieloma-5), promovendo a lise células infectadas e produção citocinas pró-inflamatórias e antivirais (85). Dentre os TLR, já foi demonstrado em modelos *in vitro* que os TLR-7 e TLR-3 são requeridos para o reconhecimento do DENV e produção de IFNs do tipo I, citocina envolvida na inibição da replicação viral por DCs e monócitos (86-88). Em pacientes, uma maior frequência de monócitos expressando TLR-2 e TLR-4 foi observada na infecção aguda pelo DENV nos casos brandos, comparado aos graves (51). O reconhecimento do via TLRs, leva a ativação de MAPK (do inglês “mitogen-activated protein kinases”), NF-κB (do inglês “nuclear factor kappa B”) e IRF3 (do inglês “interferon regulatory factor 3”) que por sua vez induzem a produção de citocinas, como IL-6, IL-12 e IFN-alfa (89). Além disso, o silenciamento dos genes de RIG-1 e MDA5 aumentou à susceptibilidade de células HUH-7 a infecção pelo DENV-1 e induziu a apoptose nestas células (88). Em células endoteliais microvasculares cerebrais (HBMECs) foi demonstrada que a infecção pelo DENV levou ao aumento do RIG-1 e a consequente maior expressão do mRNA, bem como da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8 e RANTES e IFN-beta. Além disso, foi detectado aumento da expressão da molécula de adesão ICAM-1 nas células endoteliais infectadas pelo DENV, mas não nas células no qual o RIG foi depletado. De forma interessante, a depleção de RIG não

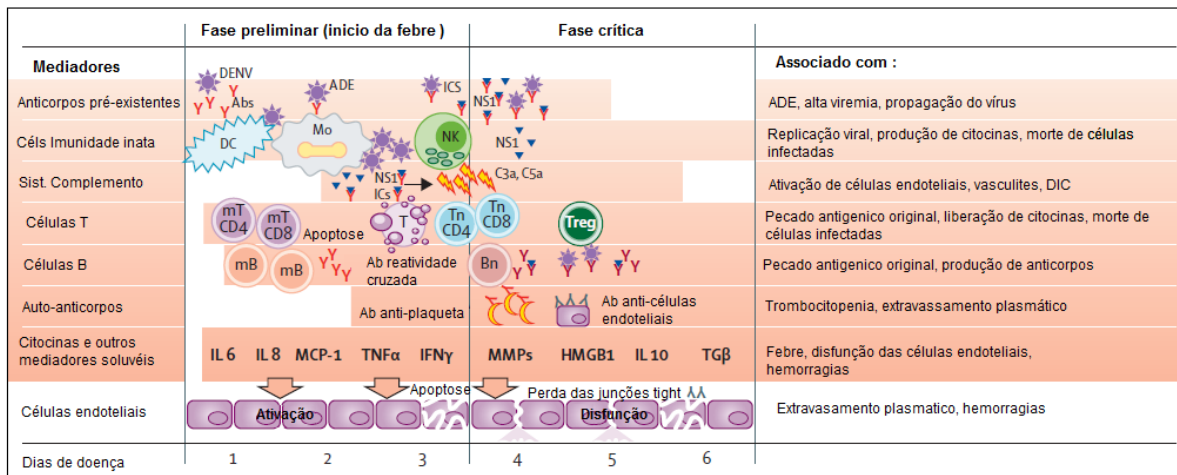
afetou a replicação viral. Esses dados sugerem que na infecção pelo DENV o RIG-1 contribuiria para a liberação de citocinas e expressão de moléculas de adesão associadas envolvidas na resposta inflamatória e recrutamento de células imunes (90).

Monócitos circulantes são divididos em duas principais subpopulações, os clássicos e os não-clássicos os quais diferem fenotípica- e funcionalmente. Enquanto os monócitos clássicos expressam fortemente a molécula CD14 e não expressam CD16, os monócitos não clássicos expressam estas moléculas de forma variada. Os (i) CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> são responsáveis pela produção de altas quantidades de citocinas pró-inflamatórias, e os (ii) CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> são responsáveis pela produção de IL-10, apresentando um perfil anti-inflamatório (91). Na Dengue foi demonstrado maior frequência de monócitos CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> em pacientes brandos comparados aos graves. Além disso, correlação inversa entre CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> e TNF-alfa, IFN-gama e IL-18 plasmáticos, sugere que estas células exerceriam um papel no controle da resposta inflamatória. Uma vez que, esta subpopulação de monócitos representa uma importante fonte de IL-10, citocina encontrada em altos níveis no plasma de pacientes de fase aguda, os autores sugerem um possível papel imunoregulador destas células na Dengue (51).

A importância dos IFNs do tipo I alfa/beta na infecção pelo DENV é destacada por mecanismos de escape desenvolvidos pelo vírus. As proteínas virais NS5 e NS2B3 promovem a degradação da STAT2 (do inglês “signal transducer and activator of transcription”) e STING (do inglês: “stimulator of interferon genes”), respectivamente, inibindo tanto a produção do IFN do tipo I quanto sua sinalização. Além disso, tem-se uma redução da expressão de genes induzidos pelo IFN e por consequência, prejuízo no estabelecimento do estado antiviral, favorecendo a disseminação da infecção (92-96). Já foi demonstrado que a produção exacerbada de mediadores solúveis como citocinas (TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-alfa), quimiocinas (CCL5, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11) por células alvo da infecção pelo DENV contribuem para a gravidade da doença (97-101). O estabelecimento da resposta imune durante a infecção pelo DENV com produção de mediadores inflamatórios é fundamental para a ativação de mecanismos envolvidos no controle da infecção. Contudo, uma produção exacerbada desses mediadores contribuiria para a alteração da transiente da permeabilidade plasmática resultando nas formas graves da Dengue (102).

A resposta humoral desenvolvida contra o DENV é complexa e apresenta reatividade-cruzada contra os diferentes sorotipos (103). Os anticorpos são direcionados principalmente contra os diferentes domínios (D) da proteína E do vírus. Anticorpos direcionados a epítomos do DI/II são predominantemente de reatividade cruzada e não neutralizantes. Enquanto os anticorpos contra o DIII são predominantemente neutralizantes (79). Anticorpos direcionados contra a proteína prM, apresentam reatividade-cruzada, contribuindo para neutralização deficiente e consequentemente, são capazes de induzir o ADE (104). Anticorpos contra a proteína NS1 possuem alta reatividade cruzada e baixa capacidade de neutralização. Além disso, estudos sugerem que anticorpos anti-NS1 reagem de maneira cruzada com plaquetas e proteínas relacionadas à cascata de coagulação (plasminogênio e trombina), e com células endoteliais (105-108), sugerindo que anticorpos anti-NS1 contribuiriam para a coagulopatia e extravasamento vascular.

Durante a infecção aguda pelo DENV, a resposta de células T é direcionada predominantemente contra as proteínas NS3, NS4B e NS5 (109-111). Destas a NS3 é a mais imunodominante e a maioria dos epítomos identificados para as células T CD4 e CD8 são direcionados contra esta proteína (109-110). Foi demonstrado ainda que, células T CD4 reconhecem regiões da NS1, E e C (112). A resposta de células T na infecção aguda pelo DENV possui alta reatividade cruzada (113-114). Algumas das citocinas encontradas em quantidades elevadas no soro de pacientes graves (115-117) são liberadas por estas células (110, 118-119). De fato, a teoria do pecado antigênico original, descrita anteriormente, sugere que ativação de células T CD8 de reatividade-cruzada produziriam citocinas envolvidas no extravasamento plasmático (82). Entretanto, a infecção secundária não está necessariamente relacionada ao papel patogênico dos linfócitos T, mas a um conjunto que envolve a presença de anticorpos facilitadores da infecção associado a um HLA relacionado à susceptibilidade e a falta de uma resposta multifuncional de linfócitos T (111). Além disso, autores encontraram evidências do aumento de ativação de linfócitos T CD8 específicas ou não ao peptídeo *NS3*<sub>133-142</sub>, somente após a resolução de viremia ou hemoconcentração em crianças com FHD, sugerindo que essas células não estariam envolvidas nos estágios iniciais do extravasamento plasmático (120).



**Figura 1. 4: Mecanismos relacionados à imunopatogênese da Dengue.** Uma variedade de fatores parece atuar em conjunto para o desenvolvimento da Dengue. Como anticorpos pré-existent capazes de mediar ADE, facilitando a infecção de células alvo, como monócitos e DCs, ativação do SC que em conjunto com mediadores solúveis e anticorpos produzidos por linfócitos T e B contribuirão para a patogênese da alteração da permeabilidade vascular. A ativação exacerbada do SC está associada com a gravidade da doença. Níveis elevados de mediadores solúveis agem sobre o endotélio promovendo alterações integridade da monocamada e consequentemente extravasamento plasmático. Legenda: Ab: anticorpo; ICs: complexos imunes; DC: células dendríticas; Mo: monócitos/macrófagos; mT: células T de memória; Tn: células T naive; Treg: células T regulatórias; mB: células B de memória; Bn, células B naive; DIC, coagulação intravascular disseminada. Adaptado de (121)

### 1.1.3.3. Distúrbios no endotélio vascular

Células endoteliais (CEs) formam uma barreira contínua no interior dos vasos sanguíneos regulando a passagem de solutos, gases e fluídos mantendo a homeostase através de uma complexa interação entre receptores de superfície e o glicocálix endotelial. Interações entre o glicocálix, integrinas ( $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ) presentes na superfície celular, moléculas de adesão (ICAM, e VCAM) e junções aderentes interendoteliais (VE-caderina) formam uma rede de sensores na superfície das CEs responsáveis por manter a função de barreira (122-123). As CEs também estão envolvidas na resposta imune e na inflamação, desempenhando um papel importante na regulação da migração de leucócitos, angiogênese, produção de citocinas, síntese de proteases e matriz extracelular e regulação da permeabilidade vascular (124). Durante processos inflamatórios, como aqueles desencadeados por infecções, concentrações aumentadas de citocinas, quimiocinas, fatores de coagulação, fatores de crescimento e óxido nítrico podem interagir com receptores nas CEs, alterando a integridade da barreira (122, 125-126). Na Dengue, o aumento da permeabilidade vascular com perda de conteúdo plasmático para as cavidades pleural e abdominal, ocorre a nível microvascular e é um dos pontos críticos no desfecho clínico do paciente. Acredita-se que o extravasamento vascular seja o resultado tanto da ativação

das CEs, quanto do dano celular, induzindo perda na função de barreira endotelial. O efeito direto do vírus e de mediadores solúveis como, citocinas, quimiocinas e produtos de ativação do sistema complemento vem sendo investigado (127).

A proteína E já foi detectada no endotélio sinusoidal do fígado e no endotélio pulmonar de autópsias e biópsias de pacientes (54). Ainda, estudos também já demonstraram presença de antígenos virais em células endoteliais provenientes do cérebro (128), baço (129) e coração (130). Estudo recente de 4 casos fatais em decorrência da Dengue, confirmou que o DENV tem um amplo tropismo para vários tecidos e ainda, demonstraram replicação viral em hepatócitos, pneumócitos do tipo II, fibras cardíacas, assim como em monócitos/macrófagos circulantes e residentes e em células endoteliais (49). Por outro lado, um artigo recente não detectou antígenos do DENV em células endoteliais provenientes de 13 casos fatais por FHD/SCD (53).

Ainda, estudos *in vitro* têm demonstrado que CE são permissíveis à infecção pelo DENV (131), e esta infecção induz a secreção de mediadores inflamatórios, como as citocinas IL-1beta, IL-6, IL-8, IFN-gama e TNF-alfa (132-133) e as quimiocinas CXCL9, CXCL10, CCL5 e componentes do sistema complemento, como o fator B (134), moléculas envolvidas na ativação celular, quimiotaxia e inflamação. Já foi também demonstrado que CEs infectadas *in vitro* pelo DENV secretam moléculas como VEGF (do inglês “vascular endothelial growth factor”), angiopoetina-2 e metaloproteínases, como a MMP-2 (135-137). Nosso grupo demonstrou que a infecção induz alteração na permeabilidade da monocamada das células endoteliais HMEC (célula endotelial microvascular humana) (138). Outro estudo observou desorganização de actina, mobilização da proteína de junção ocludina para o citoplasma e produção de IL-8 nas CEs infectadas *in vitro* pelo DENV (139). Uma vez que o endotélio está intimamente envolvido com a manutenção da homeostase, foi demonstrado que a infecção das CEs pelo DENV alterou o sistema de coagulação, levando ao aumento de moléculas anticoagulantes, como a trombosmodulina e ativador do plasminogênio tecidual (140-141). O aumento da expressão de moléculas de adesão, como as selectinas E e P nas CEs, favorece a adesão e ativação plaquetária (142), uma vez que plaquetas ativadas são removidas da circulação, esses fatores contribuiriam à trombocitopenia e coagulopatias observadas na Dengue, (143).

Células-alvo da infecção pelo DENV, como monócitos/macrófagos e DCs, secretam fatores solúveis em resposta a infecção que poderiam afetar a integridade do



endotélio. De fato, o sobrenadante de células-alvo infectadas contém uma variedade de citocinas, como TNF-alfa, IL-1beta, IL-8, MCP-1, indutoras da alteração da permeabilidade das CEs (101, 144-145). O MCP-1 secretado por monócitos infectados *in vitro*, parece estar envolvido na alteração de permeabilidade de CEs, observado pela reorganização da junção celular ZO-1 (do inglês “zona occludens-1”) (146) e ainda, elevados níveis de MCP-1 foram detectados em pacientes com FHD comparado aos FD (146). Vem sendo descrito o envolvimento da proteína viral NS1 no dano vascular. Inicialmente, foi demonstrado a capacidade da NS1 se ligar às CEs, independente de infecção através da interação com heparan-sulfato e chondroitin-sulfato E (147). A incubação de CEs com anticorpos anti-NS1 levou a ativação do sistema complemento na superfície destas células, observada pela deposição de C3dg e C5b-9 (27). Em modelo *in vivo* foi demonstrado que a NS1 recombinante dos quatro sorotipos induziu aumento da permeabilidade vascular e produção das citocinas IL-6 e TNF-alfa. Esses efeitos foram bloqueados pelo tratamento com anticorpos monoclonais ou soro imune anti-NS1. Além disso, incubação da NS1 promoveu disfunção de barreira, de maneira dose dependente, e aumento da permeabilidade em células endoteliais microvasculares pulmonares (HPMEC) *in vitro*, avaliado através da medida da resistência elétrica transendotelial (TEER). Esses resultados sugerem que a NS1 atuaria diretamente sobre CEs promovendo o aumento da permeabilidade vascular (148).

## 1.2. Sistema Complemento

---

O sistema complemento (SC) compreende uma rede cerca de 30 proteínas encontradas tanto na forma solúvel quanto associada à membrana. Muitas destas são encontradas como zimogênios, ou seja, precursores inativos requerendo clivagem proteolítica para exercerem suas atividades. Uma vez clivadas, essas proteínas dão início a uma reação em cascata, resultando na ativação e ou amplificação das vias do SC. Tradicionalmente, o SC é descrito pelo seu papel na imunidade inata contra patógenos, participando da opsonização, lise mediada pelo complexo de ataque à membrana (MAC), quimiotaxia e ativação de leucócitos. Sua importância na proteção contra infecções pode ser destacada, dentre outros, pelo fato de que microrganismos desenvolveram diversos mecanismos na tentativa de subverter a ativação do SC e assim, estabelecer a infecção. Recentemente, o SC tem sido reconhecido por mediar importantes eventos durante todo o curso da resposta imune adaptativa (149).

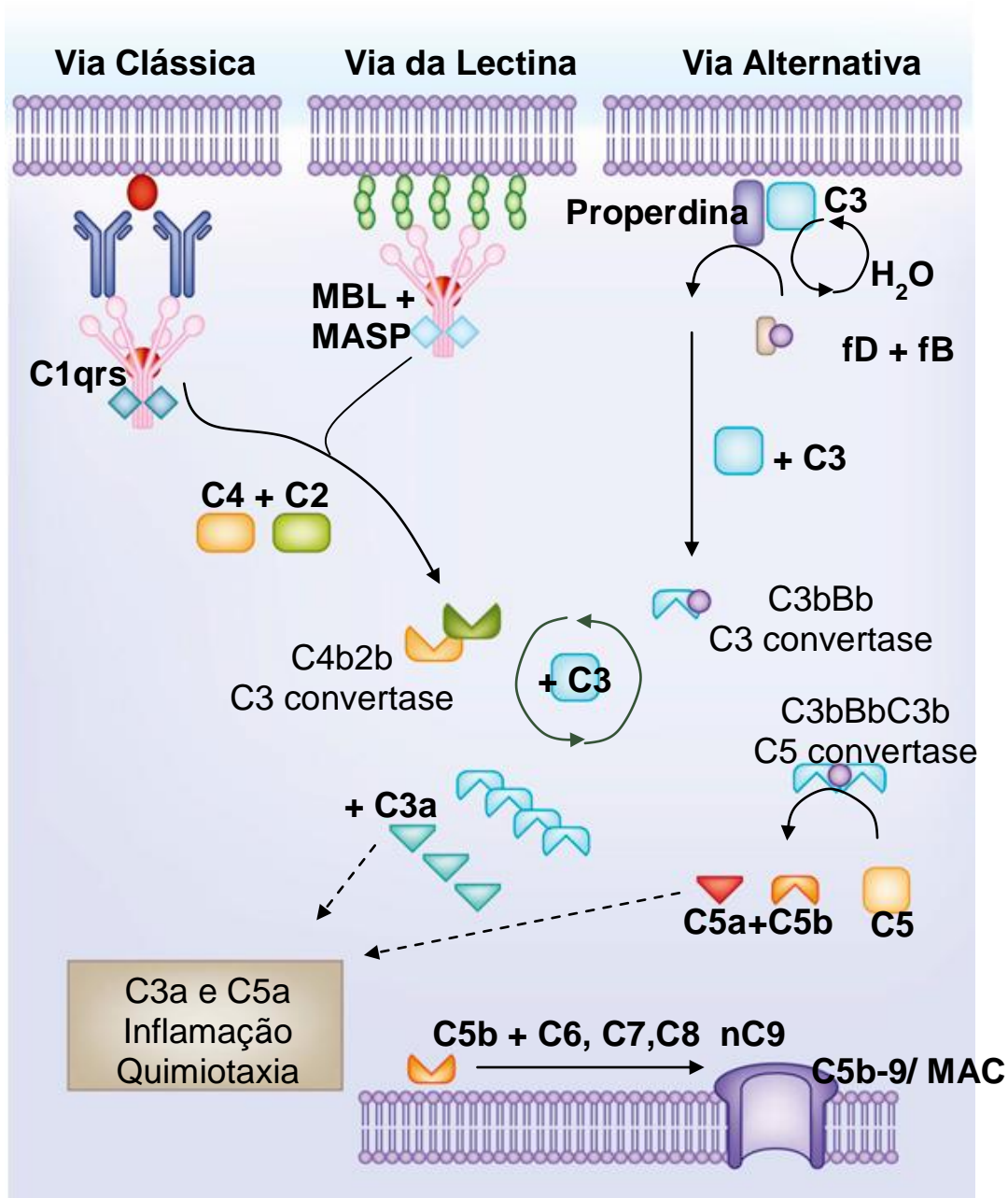
### 1.2.1. Vias de ativação e Mecanismos de regulação

Embora a ativação do SC seja comumente descrita como uma sequência linear de eventos divididos em três vias: clássica, alternativa e da lectina, a ativação pode ocorrer através de componentes da cascata de coagulação e fibrinólise. Uma vez que estas cascatas são compostas por uma série de serino-proteases que apresentam características estruturais comuns e sítios catalíticos altamente conservados (150). A via clássica é frequentemente descrita como “dependente de anticorpo” e, de fato, o reconhecimento de complexos imunes (CI) formados entre patógenos e as imunoglobulinas (Ig), IgM e IgG, por C1q, compreende um potente ativador da via clássica. Entretanto, a ativação desta via pode ocorrer independente de anticorpos, pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, células apoptóticas e proteína C reativa (151). Como parte do complexo C1 (C1q-r-s), a proteína C1q é capaz de reconhecer CI através de sua interação com a fração Fc de anticorpos. A configuração hexamérica dos CI de IgG, resulta numa maior avidéz entre os domínios globulares de C1q e a fração Fc, otimizando a ativação da via clássica (152). Na presença de  $Ca^{2+}$ , a ligação C1q-CI promove alterações conformacionais em C1q, resultando na ativação das proteases C1r e C1s (153). A alteração conformacional em C1s promove a clivagem de C4 gerando C4a solúvel e C4b, que se liga covalentemente à membrana. Em seguida, C2 é recrutado e clivado por C1s,

dando início a formação da C3 convertase da via clássica (C4b2b) capaz de promover a clivagem de C3 com geração da anafilatoxina C3a e de C3b.

Na via da lectina, hexâmeros de MBLs (do inglês: “mannose-binding lectins”) se ligam predominantemente a motivos de carboidratos bacterianos, como a manose. A MBL possui estrutura semelhante a C1q e se liga as proteínas homólogas a C1r e C1s, denominadas MASPs (do inglês: “MBL-associated serine proteases), dentre as quais apenas a MASP-2 é capaz de clivar C4 e em seguida C2, gerando a C3 convertase (C4b2b) (154).

Finalmente, na via alternativa o SC é ativado continuamente de maneira espontânea. O mecanismo envolve a associação de C3 com uma molécula de água (H<sub>2</sub>O), recrutando o fator (f) B e o fD. O fD cliva enzimaticamente o fB gerando Bb. A associação entre C3b e Bb forma a C3 convertase da via alternativa (C3bBb). A C3 convertase é estabilizada pela proteína plasmática properdina. Além de estabilizar a C3 convertase da via alternativa, a properdina é capaz de se ligar diretamente a microrganismos, células em apoptose e em necrose direcionando a formação da C3 convertase nas membranas dessas células, induzindo fagocitose ou lise mediada pelo complemento (155). A via alternativa também funciona como um mecanismo de amplificação do SC, uma vez que as C3 convertases repetidamente clivam moléculas de C3 gerando C3b livre para interagir com fB, gerando assim, mais C3 convertases e conseqüentemente, amplificando a clivagem de C3. Apesar do nome, a via alternativa é responsável por cerca de 80-90% da ativação total do SC, independente da via que desencadeou a ativação do sistema (156). Deste modo, a clivagem de C3 é o ponto central no qual as três vias convergem e a cascata do complemento é amplificada (figura 1.5). Independente da via de ativação, a geração de C3b permitirá a montagem da C5 convertase (C4b2bC3b e C3bBbC3b) responsável pela clivagem de C5 com geração da anafilatoxina C5a e de C5b. A molécula C5b irá ligar-se sequencialmente as moléculas de C6, C7 e C8 e polímeros de 10 a 16 moléculas de C9, formando o C5b-9 ou complexo de ataque à membrana (MAC). A polimerização de C9 forma poros os quais, uma vez inseridos na membrana da célula-alvo, promovem influxo de Ca<sup>2+</sup>, perda de moléculas de ATP e do potencial de membrana mitocondrial, promovendo um desequilíbrio hidro-eletrolítico causando a morte celular (157-159).

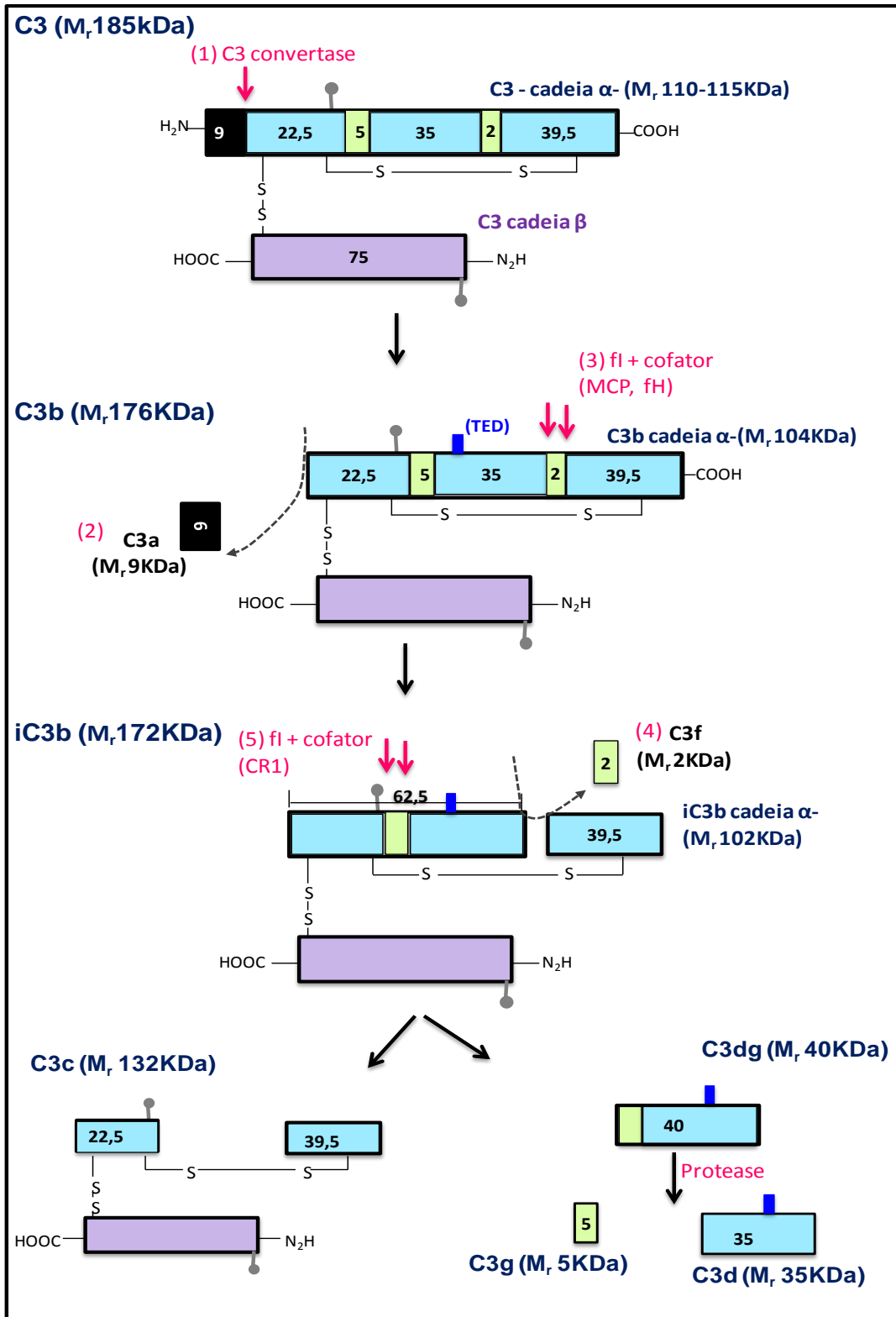


**Figura 1. 5. Visão geral das vias de ativação do sistema complemento:** Ativação do SC pelas vias clássica, da lectina e alternativa. A via clássica é ativada pelo reconhecimento de complexos imunes antígeno-anticorpo pela molécula de C1q que através das proteases C1s e C1r irá clivar os componentes C4 e C2 formando a C3 convertase (C4bC2b). A via da lectina é ativada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, resultando na clivagem de C4 e C2 de forma similar a via clássica. Na via alternativa C3 é constantemente hidrolisado a níveis baixos. Somado ao C3b proveniente das outras vias, a via alternativa amplifica a ativação do complemento pela formação da sua C3 convertase (C3bBb) que é estabilizada pela properdina, aumentando a clivagem de C3. A C3 convertase (C3bBb) pode se associar a um C3b adicional originando a C5 convertase, permitindo a clivagem de C5 em C5a e C5b. Por fim, C5b recruta C6, C7, C8 e C9 montando o complexo de ataque à membrana (MAC) ou C5b-9. As anafilatoxinas C3a e C5a liberadas durante a ativação do SC e medeiam efeitos na reposta inflamatória promovendo a quimiotaxia de leucócitos para os sítios de ativação do SC. Adaptado de (160).

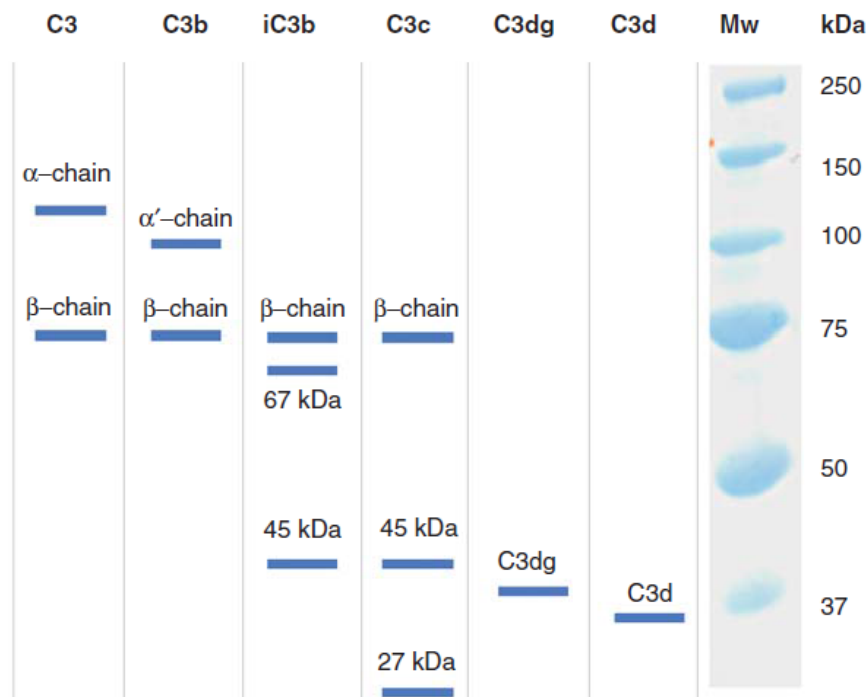
A fim de evitar o dano tecidual, ativação do SC é altamente regulada em diferentes etapas, por uma série de proteínas solúveis e associadas à membrana, amplamente distribuídas. Assim, a regulação da ativação da via clássica pode ser controlada pelo inibidor de C1 (C1INH). C1INH forma um complexo com C1r e C1s dissociando-os de C1 e liberando C1q. Acredita-se que a ligação de C1INH a C1r e C1s também promova a estabilização do complexo C1q retardando sua ativação (161-162). A inibição da via da lectina é influenciada pelas proteínas MASP-3, MAp44 e MAp19 que possuem uma sequência homóloga a MASP-1 e -2 competindo com essas últimas (163-164). Entretanto, as MASP-3, MAp44 e MAp19 são incapazes de clivar C2 e C4. A ativação da via da lectina também é controlada pela ação da C1INH inibindo as MASP-1 e -2 (165).

O principal ponto de regulação da via alternativa envolve o componente central do complemento, o C3. C3 é a proteína mais abundante no soro humano (1,2mg/mL) e é composta por duas cadeias alfa (massa molecular relativa-  $M_r$  110-115KDa) e beta ( $M_r$  75 KDa) conectadas por uma ligação dissulfeto e associadas por forças não covalentes (figura 1.5) (166). A clivagem proteolítica de C3 por qualquer uma das três vias resulta na geração de C3a ( $M_r$  9KDa) e em C3b ( $M_r$  176 KDa). A molécula de C3b apresenta duas cadeias, a cadeia alfa ( $M_r$  101KDa) e a beta ( $M_r$  75 KDa). Diferente de C3, C3b apresenta vários sítios de ligação para componentes do complemento como, C5, properdina (P), os fatores (f) H, B e I, os receptores de complemento 1 CR1(CD35) e CD46 (MCP, do inglês: “membrane cofactor protein”) (167). Na ausência de reguladores do complemento, superfícies contendo -OH ou -NH<sub>2</sub> representam alvos para a ativação e deposição de fragmentos do C3b através de ligações covalentes. Dependendo da natureza da membrana alvo, a ligação nos diferentes sítios de C3b pode resultar em: (i) amplificação da cascata do complemento pela interação com fB e P na presença de fD; (ii) iniciação do MAC ou (iii) inativação pelo fI na presença de cofatores. A atividade de protease do fI leva a geração dos produtos de degradação de C3b, iC3b o qual é incapaz de se ligar ao fB e formar a C3 convertase (168). O fI é uma serino protease encontrada no plasma responsável por clivar C3b na presença de diferentes cofatores, como fH, CD46 (MCP), o CR1(CD35) ou C4BP. Enquanto o CD46 (MCP), CD55 (DAF, do inglês: “decay accelerating factor”) e o CR1(CD35) atuam juntamente com fI mediando a proteólise de C4b e C3b, o fH induz apenas a degradação de C3b (169).

A clivagem de C3b ocorre em duas regiões da cadeia alfa gerando os fragmentos iC3b ( $M_r$  172KDa) e C3f ( $M_r$  2KDa). Em seguida um novo fl juntamente com CR1(CD35) (170) cliva novamente a cadeia alfa em outra região gerando os fragmentos C3c e C3dg (171) (figura 1.6). O padrão eletroforético dos diferentes fragmentos de C3 é demonstrado na figura 1.7. O C4b pode ser inativado pela ação da C4BP (do inglês: "C4 binding protein"), que também funciona como cofator para o fl (172). A atuação de outras proteínas como, a trombomodulina e o fator de Von Willebrand quanto sua capacidade de acelerar a clivagem de C3 mediada pelo fl e fH foi demonstrado (173-174).



**Figura 1. 6. Ativação e degradação de C3.** Os sítios de clivagem são identificados pelas setas. O peso molecular relativo (M<sub>r</sub>) é calculado com base na sequência de aminoácidos. (1) Pela ação da C3 convertase há (2) liberação de C3a e geração de C3b. (3) O regulador fi na presença de cofatores inativa C3b dando origem ao iC3b com a (4) liberação do fragmento C3f. Uma nova clivagem (5) mediada pelo fi e cofatores dá origem as moléculas de C2c e C3dg. Por ação de proteases, o C3dg é clivado dando origem ao C3g e C3d. Adaptado de (166).



**Figura 1.7. Perfil eletroforético dos fragmentos de C3.** A direita é observado o controle de peso molecular. Adaptado de (175).

Um importante ponto da regulação do sistema complemento é a inativação das C3 convertases provenientes das diferentes vias de ativação, mantendo sob controle à amplificação da cascata. Para isto, uma variedade de reguladores existe na forma solúvel ou associada à membrana, muitos deles desempenham funções similares. Os fl e fH atuam na fase fluída, enquanto o CD46(MCP), CD55(DAF), CD59 e o CR1(CD35) atuam associados à membrana. O fH compete pela ligação com C3b, atuando como cofator para o fl na inativação de C3b e induzindo a dissociação da C3 convertase, desta forma, regulando a via alternativa (176). O CR1(CD35) dissocia as C3 e C5 convertases, e pela ação do sítio de ligação para C4b e C3b, CR1(CD35) acelera o decaimento da C3 convertase das vias clássica (C2bC4b) e alternativa, respectivamente (177-178). A C4BP previne a formação das C3 e C5 convertases da via clássica (179). O CD55(DAF) acelera o decaimento das C3 e C5 convertases das vias clássica e alternativa. A inibição da C3 convertase da via alternativa (C3bBb) ocorre pela interação de alta afinidade com Bb, o que não ocorre com a molécula intacta de fB. Além disso, o CD55(DAF) se liga ao C3b da convertase, contribuindo para acelerar o decaimento da sua atividade (180-181).

Reguladores solúveis também exercem ação nos estágios finais da ativação do complemento impedindo a formação do MAC e dano celular, como observado para as



proteínas CFHR1 (proteína 1 relacionada ao fator H do complemento), clusterina e vitronectina ou proteína S. O CFHR1 bloqueia a formação da C5 convertase, interferindo na deposição de C5b na superfície da membrana alvo e conseqüentemente inibe a formação do MAC (182). A clusterina também inibe a montagem do SC5b-9, através da interação com os componentes C7, C8 e C9, impedindo a polimerização de C9 na membrana (183). De forma similar, a proteína S inibe a polimerização de C9 através da ligação ao complexo C5b-7, apesar disso C8 e C9 ainda são capazes de se combinar a este complexo, formando o SC5b-9 circulante (184). Por fim, o regulador associado à membrana CD59, expresso na maioria dos tipos celulares, bloqueia a interação da cadeia alfa de C8 com a molécula de C9, impedindo a formação do poro (185). Além disso, o MAC lítico pode ser removido em minutos após sua deposição da membrana celular por exocitose ou internalização seguida de degradação no interior da célula (186-187).

### **1.2.2. Receptores do sistema complemento na regulação da resposta imune**

A ativação da cascata do SC promove a geração de fragmentos ativos, como anafilatoxinas (C3a e C5a), opsoninas (C3b, iC3b, C3d) os quais exercem suas funções através da interação com receptores de complemento associados à membrana celular (157). As anafilatoxinas C3a e C5a são peptídeos pró-inflamatórios (9-14 KDa) liberados na fase fluida após a clivagem enzimática de C3 e C5 durante ativação do SC. E através da interação com seus receptores celulares C3aR e C5aR, as anafilatoxinas medeiam importantes efeitos na ativação de leucócitos, induzindo liberação de histamina, formação de radicais de oxigênio, fagocitose e quimiotaxia contribuindo para a resposta inflamatória (188). O SC está envolvido na eliminação de células apoptóticas, complexos imunes e opsonização de patógenos direcionando-os para fagocitose. Células em processo de morte sofrem alterações moleculares e estruturais, além da diminuição na expressão de reguladores do complemento como CD46, facilitando a opsonização com C1q e iC3b e a eliminação por fagócitos via C1qR e CR3(CD11b), sem causar inflamação (149). A fagocitose de células apoptóticas marcadas com C1q suprime a inflamação pela indução de citocinas imunoregulatórias (IL-10, IL-27, IL-33) e inibição da ativação do inflamossoma (189). Ao mesmo tempo, a opsonização pela via iC3b leva a diminuição da produção da citocina pró-inflamatória IL-12 e da via oxidativa induzida por macrófagos (190-191).

CR1(CD35) é expresso em uma variedade de células como monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, eritrócitos, linfócitos B e T. Nos eritrócitos o CR1(CD35) está envolvido na eliminação de CI transportando-os para o fígado e baço, onde serão eliminados pelos macrófagos (192-193). O CR1(CD35) pode ser encontrado na forma solúvel, o sCR1 liberado na circulação pela clivagem da sua forma associada à membrana (194). O CR2(CD21) é expresso predominantemente em linfócitos B e em menor grau nos linfócitos T. Nos linfócitos B, o CR2(CD21) interage com antígenos opsonizados com C3d e através do complexo formado com CD19 e CD81, diminui o limiar de ativação dos linfócitos B (195-196). Os receptores CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18) são expressos em células fagocíticas, células NK e linfócitos T. Ambos os receptores são membros da família das integrinas formando um complexo heterodímero transmembranar, composto por uma cadeia alfa e uma cadeia beta comum (CD18). Devido à interação com diferentes ligantes, esses receptores medeiam uma variedade de funções como fagocitose, adesão celular, migração leucocitária e além de atuarem como molécula de coestimulação (197). Comparado ao CR4 (CD11c/CD18), o CR3 (CD11b/CD18) é o receptor dominante da fagocitose de fragmentos de C3 opsonizados na superfície de patógenos e de CI (198-199). Apesar de ambos os receptores se ligarem ao iC3b, o CR3 (CD11b/CD18) reconhece C3d, enquanto o CR4 se liga ao C3c (200-201). A consequência principal da fagocitose é a eliminação de patógenos no endossomo por ação de espécies reativas do oxigênio, enzimas lisossomais e proteases (202). Contudo, foi demonstrado que microrganismos, como o HIV, aproveitam-se da opsonização via fragmentos de C3 para facilitar a infecção de monócitos *in vitro* mediado por CR1(CD35) e CR3(CD11b/CD18), aumentando a infecção viral (203).

Estudos recentes têm demonstrado que o SC, classicamente relacionado à resposta imune inata, é responsável também por orquestrar importantes eventos na resposta imune adaptativa. Durante uma infecção, o SC pode afetar diretamente a ativação de células T ou indiretamente através da modulação das células apresentadoras de antígeno (APCs) (204). Neste contexto, foi demonstrado que o bloqueio de CR1(CD35) nos linfócitos T humanos, inibe sua proliferação e expressão do RNA de citocinas IL-2 e IFN-gama (205). Outro dado interessante é sobre o regulador CD46(MCP) (206) que pode atuar como molécula de coestimulação, induzindo proliferação celular (207), síntese de IL-10 e granzima B (208-209) ou ainda, direcionando a diferenciação de células T helper do tipo 1 (Th1) (210). Pacientes

deficientes de CD46(MCP) apresentam falhas na produção de IFN-gama e na indução da resposta Th1, contudo a resposta do tipo Th2 permanece inalterada (211). Na presença de IL-2, CD46(MCP) medeia a diferenciação de linfócitos T CD4 humanos para o fenótipo regulatório, diminuindo a produção de IL-2 e aumentando de IL-10 (208). O CD55(DAF) além de controlar a ativação do SC, desempenha funções no estabelecimento da resposta imune adaptativa. CD55 interage com EGF-TM7 (do inglês “epidermal growth factor-seven-span transmembrane”) envolvido na ativação de leucócitos (212). Em linfócitos T CD4+ coestímulo do CD55 com seu ligante EGF-TM7 e CD3 ou anticorpos monoclonais anti-CD55 aumentou a proliferação, expressão de marcadores de ativação (CD69 e CD25) e secreção de citocinas como IL-10 e GM-CSF (213). O CD59 também participa da regulação de linfócitos T. A supressão gênica do CD59, comparado às células expressando níveis normais de CD59, levou a maior proliferação celular e produção de IL-2 e IFN-gama por linfócitos T CD4 e T CD8, respectivamente (214). O tratamento com anticorpos monoclonais anti-CD59 na presença de moléculas de coestimulação, promove aumento de  $Ca^{+2}$ , produção de IL-2 e proliferação de linfócitos T (185). Em conjunto, esses trabalhos indicam o envolvimento direto do SC na modulação da imunidade celular desde a fase efetora até contração. O SC também pode influenciar indiretamente a ativação de células T através de APCs nos linfonodos e órgãos linfóides secundários. Nesse sentido, a interação de anafilatoxinas C3a e C5a com seus receptores C3aR e C5aR expressos na superfície de células T e APCs, podem regular o processamento antigênico, expressão de moléculas de coestímulo, a expansão e diferenciação dos linfócitos T (204, 215).

O SC atua também em diferentes processos fisiológicos, devido sua capacidade de ser ativado inclusive nos compartimentos intracelulares. Foi demonstrado que linfócitos T CD4 em repouso contém estoque de C3 e da protease catepsina-L nos compartimentos endossomais e lisossomais. A catepsina-L cliva continuamente C3 em C3a e C3b. Através, por exemplo, da interação do C3a intracelular com C3aR nas células em repouso, ocorre ativação basal do mTOR (do inglês: “mammalian target of rapamycin”), envolvido na ativação e sobrevivência celular. Na detecção de “sinais” de ativação da resposta imune como pela ativação via TCR, este sistema intracelular de ativação do complemento e receptor é direcionado para a membrana celular, promovendo ativação de células Th1 por sinais via C3aR e CD46(MCP) (216-217). A ativação intracelular de C3 não é limitada aos linfócitos T sendo observada também em

monócitos, neutrófilos, linfócitos T CD8, além de células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. (216).

### **1.2.3. Sistema complemento e células endoteliais**

Relembrando, o endotélio desempenha um papel importante na regulação da homeostase vascular. Fisiologicamente, células endoteliais promovem modulação do tônus além de regular a permeabilidade de constituintes plasmáticos, agregação plaquetária, adesão de leucócitos e trombose. Diferentes estímulos podem afetar esses mecanismos homeostáticos levando a ativação e disfunção endotelial (218). O endotélio é um alvo potencial para os produtos biologicamente ativos do SC, liberados na circulação e nos fluídos extravasculares. Provavelmente devido a isto, células endoteliais expressam constitutivamente os reguladores do complemento CD55, CD46 e CD59 (219), protegendo-as contra o dano causado pela constante atividade da via alternativa e deposição de C3b. Foi demonstrado ainda que o C5a e C5b-9 induzem a expressão de genes de moléculas de adesão (P- e E-Selectina ICAM-1, VCAM-1) (220-222) e citocinas (IL6, IL-8, MCP-1/CCL2) (221-223) em CEs. Exposição do endotélio ao C5b-9 resulta em secreção do fator de Von Willebrand (221, 224) e na ativação e agregação plaquetária (225). Os níveis do complexo SC5b-9, montado na fase fluída e regulado pela proteína-S, está associado a ativação do SC (226). Quantidades elevadas de SC5b-9 já foram detectadas no plasma de pacientes com choque séptico (227) e no fluído pleural de pacientes com FHD e SCD (27). Embora não promova lise, o SC5b-9 ativa células endoteliais, induzindo expressão de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1), e de fator tecidual (228). Tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, foi demonstrado que o SC5b-9 induz alteração na permeabilidade celular (229) e migração transendotelial de células polimorfonucleares (230). Muitos desses efeitos biológicos são mediados pela interação da proteína S, do complexo SC5b-9, ao receptor de vitronectina, através da sequência RGD (Arg-Gly-Asp), expresso nas células endoteliais (231). Além disso, anticorpos e complexos imunes depositados na superfície das células endoteliais podem induzir a ativação do complemento, pela via clássica levando ao dano celular (232-233).

De forma interessante, durante estímulo por mediadores inflamatórios como o IFN-gama, células endoteliais aumentam a produção de reguladores solúveis do complemento como o fH e fI (234-235). Entretanto, o endotélio é capaz de produzir fatores associados à ativação do complemento como properdina (236), C3 e fB (237-

238) nos sítios inflamatórios, facilitando a clivagem e liberação das anafilatoxinas contribuindo para indução da permeabilidade vascular e a resposta pró-inflamatória.

#### **1.2.4. Envolvimento do sistema complemento na infecção pelo vírus Dengue**

O sistema complemento desempenha papel importante no controle de infecções virais, mediando lise de vírus e células infectadas, direcionando partículas virais para a fagocitose e interferindo na modulação das respostas imune inata e adaptativa. Na infecção pelo DENV o SC parece mediar tanto a proteção quanto a patogênese da doença. Por exemplo, a presença de complemento influencia a funcionalidade de anticorpos heterólogos sub- ou não- neutralizantes, isto porque a adição de soro contendo produtos ativos C1q e C3, reduziu a atividade ADE e portanto, diminuiu a infecção *in vitro* pelo DENV na linhagem monocítica U937 (239). Outro estudo mostrou que a proteína C1q é capaz de se ligar com proteínas recombinantes do envelope, predominantemente nos domínios DI/II do DENV, mas também na partícula viral inteira. Esta interação resultou em menor infecção da linhagem monocítica THP-1 pelo DENV e menores níveis de transcrição das moléculas CD14, CD86 e DC-SIGN, sugerindo que além de regular a infecção, a interação C1q-DENV também interfere na resposta imune contra o DENV (240). Foi demonstrado ainda que a MBL (do inglês “Manose binding lectin”) se liga a proteína de envelope do DENV *in vitro*. Paralelamente, os autores observaram que camundongos deficientes de MBL apresentaram um comprometimento na eliminação viral comparado a animais selvagens (241). Pacientes brasileiros com a FD apresentam maiores níveis séricos de MBL comparado aos pacientes com FHD (242). Interessante, foi observado que soros de indivíduos com níveis elevados de MBL promoveram maior neutralização *in vitro* do DENV comparado aos soros de indivíduos com polimorfismo na MBL (243). Por outro lado, o polimorfismo no gene da MBL foi associado à proteção contra a trombocitopenia na Dengue (244). Assim, a MBL poderia exercer tanto um papel no controle da infecção viral, quanto na patogênese através do consumo de plaquetas.

Nos pacientes com as formas mais graves foi observado declínio dos níveis de C3, C4 e fB em comparação a indivíduos com a FD, e aumento nos níveis produtos da ativação do complemento como C1q, C3a, C5a e SC5b-9 (27, 245-246). Comparado aos casos brandos da infecção pelo DENV, nos pacientes graves foram encontrados níveis séricos elevados de fD, responsável por clivar a C3 convertase, enquanto os níveis da proteína reguladora fH estavam diminuídos, favorecendo a ativação do

complemento (247). Alterações genéticas no FH, que favorecem a maior produção do regulador, foram associadas à proteção contra a Dengue grave (248).

A proteína viral NS1 modula a ativação SC. Como demonstrado em estudo *in vitro*, a mistura do sobrenadante de células infectadas DENV, contendo NS1, à uma amostra de soro normal humano induziu a ativação e consumo do complemento de maneira dose dependente em comparação a adição do sobrenadante de culturas não infectadas. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado a correlação direta entre elevados níveis plasmáticos de NS1 e de SC5b-9 com a gravidade da Dengue (27). Foi observado a interação entre NS1 e clusterina, proteína que promove inibição o C5b-9 solúvel, sugerindo comprometimento na regulação do MAC (249). Além disso, a presença de anticorpos anti-DENV levou a formação do complexo não lítico SC5b-9. Os autores sugerem que a liberação de quimiocinas, ativação do SC e apoptose de CEs atuam em conjunto no desenvolvimento do dano vascular em pacientes com FHD e SCD (250).

O desenvolvimento de mecanismos de escape do SC foi detectado no DENV, sugerindo a importância do complemento no controle da infecção. Neste sentido, foi visto que proteína viral NS1 solúvel forma um complexo com C4 e com a protease C1s. Esse complexo NS1-C4-C1s resulta na clivagem de C4 em C4b e formação da C4b-NS1 na fase fluída. Além disso, NS1 interage com a proteína reguladora C4BP, promovendo a inativação de C4b. Ambos os mecanismos inativam C4b conseqüentemente, regulam a atividade da C3 convertase (C4bC2a) da via clássica e da lectina (251-252).

Dados obtidos durante minha dissertação de mestrado demonstraram que comparado a controles saudáveis e indivíduos com Dengue grave os Linfócitos T CD4 de pacientes DF apresentaram diminuição na expressão de CR2(CD21). Além disso, diminuição na frequência de linfócitos T CD4 expressando CR1(CD35) foi observada nos pacientes com Dengue, independente da forma clínica da doença em comparação aos controles saudáveis (dados não publicados).

Esses trabalhos demonstram claramente o envolvimento do sistema complemento na infecção pelo DENV seja no controle do vírus, seja na modulação da resposta imune anti-viral, contudo os mecanismos relacionados a proteção *versus* patogênese ainda precisam ser esclarecidos.

### 1.3. Hipótese

---

O SC é um componente fundamental do sistema imune, capaz de promover uma ponte entre as respostas imune inata e adaptativa. Em uma infecção viral, por exemplo, a deposição dos seus fragmentos ativos na superfície do vírus, facilita o reconhecimento e conseqüentemente, eliminação viral, tanto via fagocitose mediada por receptores do complemento (CR) como pela lise direta através do MAC. Por outro lado, alguns vírus utilizam os CR como rota de entrada nas células do hospedeiro, seja pela ligação direta (Epstein-Barr, Mealesvírus, Herpesvírus) ou aproveitando-se da opsonização por fragmentos de C3 (HIV) (253). Por fim, o papel do SC na eliminação dos vírus é reforçado pelo fato de que muitos destes microrganismos desenvolveram estratégias para escapar da ativação do complemento.

No entanto, a ativação local do SC pode causar dano às células do hospedeiro. Assim, a presença de reguladores solúveis ou associados à membrana do SC é fundamental para garantir a integridade e funcionalidade celular, particularmente das células imunes não infectadas importantíssimas no controle da infecção. Na Dengue, trabalhos têm demonstrado a participação do SC no controle viral, contudo também vem sendo demonstrando que uma ativação desregulada deste sistema contribui para a gravidade da doença (254).

Nossa hipótese é de que na Dengue ocorra uma alteração da frequência de células imunes circulantes, alvos ou não da infecção, expressando receptores de ativação e regulação do SC. Em células alvo, um desequilíbrio com aumento de células expressando receptores de ativação e diminuição daquelas expressando receptores reguladores, contribuiria positivamente à resolução da infecção e conseqüentemente, ao desfecho clínico brando da Dengue. Por outra lado, nos linfócitos T a presença de reguladores do complemento poderia estar associada a proteção contra a citólise de células envolvidas no combate a infecção. Em relação aos componentes solúveis, no caso de haver um desequilíbrio entre níveis elevados dos ativadores em relação aos reguladores, isto influenciaria de forma negativa à integridade de celular e particularmente, nas células endoteliais, levaria a uma maior permeabilidade e menor viabilidade, portanto, contribuindo para um desfecho clínico mais grave da doença.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

---

Estudar o envolvimento do SC na infecção *in vitro* de monócitos pelo DENV, avaliar o perfil de expressão dos CR nos monócitos e linfócitos T circulantes durante a infecção natural em pacientes e por fim, na alteração da permeabilidade utilizando modelo *in vitro* de células endoteliais.

### 2.2. Objetivos Específicos

---

- i. Investigar o perfil de expressão de receptores de complemento: CR1(CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e CD59 em monócitos CD14+ de pacientes e controles saudáveis;
- ii. Avaliar a infecção *in vitro* de monócitos de doadores pelo DENV-2, bem como a capacidade de ativação e funcionalidade desses monócitos com o bloqueio dos receptores de complemento CR1(CD35), CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e CD18 sozinhos ou combinados;
- iii. Avaliar os níveis do complexo SC5b-9 circulante em pacientes e controles, associando-os aos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes;
- iv. Caracterizar fenotipicamente os linfócitos T de pacientes infectados pelo DENV quanto a expressão dos receptores de complemento CR3 (CD11b), CD46, CD55 e CD59 e coexpressão de marcadores de ativação e funcionalidade celular;
- v. Dosar os níveis séricos de citocinas inflamatórias e reguladoras correlacionando-as aos níveis de SC5b-9;
- vi. Investigar a contribuição da ativação do SC na alteração da permeabilidade e viabilidade de células endoteliais frente à amostras séricas de pacientes;
- vii. Investigar a interação e opsonização do DENV-2 com fragmentos de C3 *in vitro*



## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3.1. População de estudo

Em 2010 e 2013, a equipe do LIV participou ativamente de dois trabalhos de campo, coletando amostras de sangue de pacientes com suspeita de Dengue. Os pacientes foram atendidos no Hospital-Dia Professora Esterina Corsini da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), coordenado pelo Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha em Campo Grande-MS e no Hospital dos Plantadores de Cana no Centro de Referência em Dengue, coordenado pelo Dr. Luís José de Souza em Campos dos Goytacazes-RJ. Neste estudo, incluímos 66 amostras da epidemia de 2010, e 35 de 2013. Todos os pacientes tiveram diagnóstico laboratorial confirmado para a Dengue. O sangue dos pacientes foi coletado entre 1º e o 18º dia após o aparecimento do(s) primeiro(s) sinal(s) ou sintoma(s). Foram ainda incluídos neste estudo cerca de 20 indivíduos sadios sem episódios de febre ou outras doenças nos três últimos meses anteriores a coleta, para formar o grupo controle. Os pacientes e controles concordaram em participar do estudo através da assinatura do termo de consentimento e livre esclarecido. Esse projeto é parte de um projeto aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa 37230.000.009-08 IPEC/FIOCRUZ, 0029.0314.011-09 SMS/RJ e mais recentemente, pelo Sistema Plataforma Brasil número CAAE 13318113.7.3001.0021.

### 3.2. Diagnóstico laboratorial e classificação clínica.

A confirmação dos casos de Dengue foi feita pela equipe do laboratório de Flavivirus/IOC, chefiado pela Dra Rita Nogueira, através da pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-DENV por ELISA de captura (PANBIO), detecção da proteína viral NS1 (BioRad). Os sorotipos foram determinados por isolamento viral em células C6/36 de mosquito *Aedes albopictus* seguido de imunofluorescência e/ou detecção do RNA viral por RT-PCR. Infecções primária ou secundária pelo DENV foram definidas segundo os títulos de IgG específica com base nos seguintes critérios: Infecção primária foi definida pelos níveis de IgM anti-Dengue  $>1,0$ , ou IgG anti-Dengue negativa ou pela razão  $IgG/IgM < 0,5$ . A infecção secundária foi definida pela IgG anti-Dengue  $>1,0$ , razão  $IgG/IgM > 1,0$  ou níveis  $IgM < 1,0$ . Após confirmação de diagnóstico, a classificação quanto à gravidade clínica dos casos de Dengue foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial de Saúde (TDR/OMS) adotada

em 2009 (59). Desta forma, os pacientes foram agrupados em três grupos: baseado nos sinais e sintomas clínicos: Dengue sem sinais de alarme (FD), Dengue com sinais de alarme (FD/SA) e Dengue grave (Grave).

### **3.3. Obtenção e preservação de soro, plasma e células mononucleares do sangue periférico (PBMC), plasma e soro de pacientes infectados pelo DENV e controles.**

Em tubo seco, foram coletados cerca de 5mL de sangue para obtenção de soro que, após retração do coágulo, foi centrifugado à 1000g por 10min a temperatura ambiente (TA). O soro foi preservado a -80°C até o momento do uso. Plasma e PBMCs (do inglês: “peripheral blood mononuclear cells”) foram obtidos após coleta de cerca de 20mL do sangue venoso em tubos contendo o anticoagulante ACD (citrato de sódio 22 g/L, ácido cítrico 8 g/L e dextrose 24,5 g/L). As PBMCs foram obtidas pela adição de sangue periférico sobre volume do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque™ (Proporção 2:1) (GE-Healthcare), seguido de centrifugação a 400g por 30min a TA. O anel de PBMCs foi recuperado, lavado duas vezes em meio RPMI 1640 com centrifugação a 400g por 10min a TA. Contagem e a viabilidade das PBMCs foram avaliadas utilizando o corante de exclusão azul de trypan e câmara de Neubauer. A concentração final da suspensão de PBMCs foi ajustada a  $10^6$  a  $10^7$  células por mL, as células foram criopreservadas em solução de congelamento (10% de DMSO e 90% de SFB), estocadas por 24 horas a -70°C, seguido de armazenamento em nitrogênio líquido até sua utilização. O plasma foi separado, aliquotado e armazenado a -80° C.

### **3.4. Isolamento de monócitos primários.**

Monócitos de doadores de sangue saudáveis com sorologia negativa para sífilis, doença de Chagas, hepatites virais, HIV-1 e 2 e HTLV-1 e 2 foram isolados da fase leucocitária de bolsas de sangue “Buffy Coat” provenientes do banco de sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF). As PBMCs foram obtidas como já descrito anteriormente. Para o isolamento de monócitos, as PBMCs foram lavadas duas vezes em utilizando o tampão de isolamento de monócitos (HBSS 1x contendo 5%SFB, 1mM EDTA, 1g/L de glicose). Por fim, foram ajustadas  $10^8$  PBMCs/mL.

Foi realizada seleção negativa de monócitos utilizando kit DynaBeads (LifeTechnologies, catálogo 11350D). A suspensão de  $10^8$  PBMCs foi transferida para tubos de 15mL, onde as células foram incubadas por 20min a 4°C com 100µL do

coquetel de anticorpos conjugados a biotina, contra os antígenos humanos (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CDw123 e CD235a) e 100µL de solução de bloqueio (composta por agregado de gama globulina em 0,9% de NaCl) para o bloqueio dos receptores Fc nos monócitos. Após incubação, as células foram lavadas com 4mL de tampão de isolamento e centrifugadas a 350g, 8min a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com 500µL das micropartículas magnéticas (1,0µm de diâmetro) cobertas com estreptoavidina por 15min a 4°C. Após esta etapa, o volume foi ajustado para 4mL de tampão de isolamento e a suspensão celular foi submetida ao magneto de separação durante 2min cada, por 2 vezes. O sobrenadante contendo os monócitos foi centrifugado a 350g, 8 min a 4°C e o pellet de células selecionadas negativamente foram suspensas em RPMI suplementado com 20mM HEPES, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomina, 2mM de L-glutamina e 10% de SFB. O grau de pureza da separação foi de 95% de monócitos foram isolados da população de PBMCs confirmado pela detecção de CD14 pela técnica de citometria de fluxo.

### **3.5. Manutenção da cultura de células C6/36.**

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

### **3.6. Crescimento e concentração do vírus DENV-2 (cepa 16681).**

Para infecção, obtenção de massa viral e purificação do DENV sorotipo 2 (DENV-2), genótipo asiático, cepa 16681, células C6/36 foram expostas ao inóculo de 1,5mL do DENV-2 ( $1,37 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL) por 90min para a adsorção viral. O inóculo viral foi removido e as células mantidas a 28°C em 30mL de DMEN contendo 2% de SFB. Após sete dias, os sobrenadante das culturas infectadas foram clarificados por centrifugação a 1000g por 5 min, em seguida foram ultracentrifugados por 30000 rpm (100000g) por 1h. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” contendo vírus foi suspenso em 1,5mL de meio de RPMI, contendo 10% de SFB, em seguida filtrados em membrana de 0,22µm. Alíquotas do vírus foram estocadas a -70°C até sua utilização.

### **3.7. Titulação viral por imunofluorescência indireta.**

A titulação viral foi feita infectando cerca de  $5 \times 10^5$  células C6/36 com 100 $\mu$ L da massa viral obtida anteriormente em diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-11}$ . Após adsorção do inóculo por 90 minutos a 28°C, o inóculo viral foi substituído por 200 $\mu$ L de DMEM com 5% de SFB, seguido por 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 20min a 4°C para realização da marcação do DENV por imunofluorescência indireta. Inicialmente, foi feita incubação 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, foi adicionado 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 por 30min a 37°C em câmara úmida. Após duas lavagens com PBS por 10min, 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<sup>®</sup>. Todas as lavagens foram feitas a TA. O cálculo do título viral foi baseado na fórmula de Reed & Muench. O título viral obtido foi de  $3 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL (do inglês: *50% tissue culture infective dose*).

### **3.8. Marcação extra- e intra-celular por citometria de fluxo.**

As PBMCs de pacientes e controles saudáveis foram descongeladas por 2 min em banho-maria a 37°C e lavadas com 10 mL de PBS pH 7,4 com centrifugação a 400g por 7min a 4°C. Os monócitos previamente infectados pelo DENV-2, foram removidos mecanicamente das placas de cultura por meio de raspagem suave com ponteira de plástico em gelo. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400g por 10min 4°C. A marcação extracelular por citometria de fluxo inicia com bloqueio dos receptores Fc através da incubação com solução de bloqueio (1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub> e 5% plasma humano inativado em PBS pH 7,4) por 30 minutos a 4°C. Após incubação, a solução de bloqueio foi removida por centrifugação a 400g por 7min e sobre o precipitado de células, foram incubadas com 20 $\mu$ L da combinação dos anticorpos monoclonais diluídos em solução de lavagem (BSA 1%, NaN<sub>3</sub> 0,1%, PBS pH 7,4) seguido por incubação por 30min a 4°C. Ao final deste período foram realizadas duas lavagens com solução de lavagem, seguida de centrifugação a 400g por 7min. As PBMCs foram então fixadas com 150 $\mu$ L de solução de paraformaldeído a 2%, por

20min a TA. Após centrifugação, as células foram suspensas em 300µL de PBS e armazenadas na geladeira a 4°C até aquisição.

Para marcação intracelular, foi realizado todo procedimento até a fixação com PFA. Após os 20 min de fixação, o PFA foi removido por centrifugação e as células foram permeabilizadas com solução de lavagem PBS, 1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub> contendo 0,015% de saponina por 10min a 4°C, seguida de centrifugação. No caso da marcação intracelular pelo DENV, as células foram incubadas com anti-DENV complex (Millipore) previamente conjugado ao fluorocromo Alexa-Fluor 647 por 60min 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 ou pelo Kit do Zenon (Life Technologies, catálogo Z25108), obedecendo às recomendações dos fabricantes.

Após incubação com o anticorpo anti-DENV, foram feitas duas lavagens, a primeira com solução de lavagem contendo saponina e a segunda, solução de lavagem sem saponina. Por fim, as células foram novamente fixadas em PFA 2% por 20 min a TA. O PFA foi removido por centrifugação, as células foram suspensas em 300µL PBS e armazenadas a 4°C até a aquisição.

Para marcação de caspase 1, monócitos foram incubados com FAM FLICA Caspase-1 (AbD Serotec, catálogo ICT097) por 1h a 4°C em PBS. As células foram lavadas com tampão e solução de fixação fornecidos pelo kit de acordo com instruções do fabricante. As células foram adquiridas imediatamente utilizando o citômetro C6 Accuri.

A aquisição das demais células foi feita no CyAn (Dako Cytomation) ou no FACS Aria (BD), ambos da Plataforma de Citometria de Fluxo-FIOCRUZ. As análises foram feitas utilizando o programa FlowJo versão 7.6.1.

**Tabela 3. 1: Anticorpos utilizados para citometria de fluxo.**

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Empresa</b>	<b>Clone</b>
(CR1) CD35-FITC	1:100	Biologend	E11
(CR1) CD35-PE	1:100	Serotec	E11
(CR2) CD21- APC	1:100	ebioscience	HB5
(CR3) CD11b-PECy7	1:100	Biologend	ICRF44
(CR4) CD11c-PE	1:50	loTest	BU15
(CR4) CD11c-PECy7	1:100	Biologend	3.9
Antígenos do complexo DENV	1:100	Millipore	D3-2H2-9-21
Anti-mouse- Alexa Flour 488	1:100	Molecular Probes	Policlonal
CCR5-PE	1:10	R&D Systems	CTC5
CD107a-APCCy7	1:50	Biologend	H4A3
CD11b-PECy7	1:100	Biologend	ICRF44
CD11c-PE	1:50	loTest	BU15
CD14-PECy5	1:50	SouthernBiotech	61D3
CD19-PerCp	1:100	Biologend	HIB19
CD29-Alexa Fluor 647	1:100	Biologend	TS2/16
CD3-Pacific Blue	1:200	Biologend	HIT3a
CD40-APCCy7	1:10	Biologend	5C3
CD40-APCCy7	1:50	Biologend	5C3
CD46-FITC	1:100	Biologend	MEN-258
CD4-Alexa Fluor 700	1:100	R&D Systems	#11830
CD4-PerCp	1:100	Biologend	OKT4
CD55-PECy7	1:100	Biologend	JS11
CD59-FITC	1:100	Biologend	MEN43
CD64-PE	1:50	Biologend	10.1
CD86-APC	1:25	Biologend	IT2.2
CD8-Alexa Fluor 700	1:100	Biologend	SK1
CD8-PerCP	1:100	Biologend	HIT8a
HLA-DR-PerCP	1:10	R&D	L20
IgG1k-Alexa Fluor 647	1:100	BD Biosciences	MOPC-21
IgG1k-FITC	1:100	SouthernBiotech	15H6
IgG1-PE	1:50	loTest	15H16

### **3.9. Avaliação dos níveis de SC5b-9 plasmáticos e séricos e de IFN-alfa e NS1 nos sobrenadantes das culturas de monócitos por ELISA.**

As avaliações dos níveis séricos do SC5b-9 (Quidel, catálogo A020) de pacientes e controles saudáveis foram realizadas através do ensaio de ELISA, seguindo protocolos fornecidos pelos fabricantes. As amostras de soro foram diluídas conforme informado na tabela 3.1.

As avaliações dos níveis de IFN-alfa (PBL Interferon Source Piscataway) e NS1 (BioRad) nos sobrenadantes das culturas de monócitos seguiram igualmente o protocolo fornecido pelos fabricantes.

**Tabela 3.2: Kits de ELISA para dosagem de fatores solúveis no plasma de pacientes.**

	Curva padrão	Fabricante	Catálogo	Diluição da amostra
SC5b-9	170-10ng/mL	Quidel	A020	1:10 (plasma) e 1:100 (soro)
IFN-alfa	1,95-125 pg/mL	PBL- Interferon Source Piscataway	41115-2	Concentrada
NS1	--	Bio-Rad	72830	Concentrada

### 3.10. Bloqueio dos CR seguido da infecção pelo DENV-2 de monócitos.

Cerca de  $2 \times 10^5$ /200uL monócitos humanos isolados como no protocolo descrito acima (item 3.4), foram distribuídos em placas de 96 poços e mantidos em cultura a 37°C, 80% de umidade e 5% CO<sub>2</sub> *overnight*. Em seguida, foram adicionados 10µg/mL dos anticorpos monoclonais neutralizantes anti-CR1(CD35), anti-CR3(CD11b), anti-CR4(CD11c) associados ou não ao anti-CD18, por 60min a 37°C, 80% de umidade e 5%CO<sub>2</sub>. O anticorpo anti-IgG foi utilizado em todas as culturas como controle. Após o bloqueio dos receptores do sistema complemento, o meio das células foi removido e os monócitos infectados com 50µL da suspensão do DENV-2 diluído 1:10 em meio RPMI sem SFB. Após adsorção do DENV-2 por 120min a 37°C, 80% de umidade e 5% CO<sub>2</sub>, o inóculo viral foi removido e então foi adicionado meio RPMI suplementado. Após 48 horas de infecção, os monócitos foram recuperados para imunofenotipagem e detecção do antígeno viral intracelular. Os sobrenadantes foram recolhidos e preservados a -20°C para dosagem de citocinas e da proteína viral solúvel NS1.

**Tabela 3. 3: Anticorpos neutralizantes para os receptores de complemento.**

Anticorpo	Concentração	Empresa	Clone
anti-CR1(CD35)	10µg/mL	Beckman Coulter	J3D3
anti-CR3 (CD11b)	10µg/mL	Biolegend	ICRF44
anti-CR4(CD11c)	10µg/mL	Biolegend	3.9
anti-CD18	10µg/mL	Biolegend	TS1/18
anti-IgG	10µg/mL	Biolegend	MOPC-21

### 3.11. Ensaio de CBA para dosagem de citocinas nos sobrenadantes das culturas.

Os níveis de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-alfa e IFN-gama no sobrenadante das culturas de monócitos foram detectados usando o kit de CBA (do inglês: *cytokine*

*cytometric bead array*) (BD Biosciences Pharmingen, catálogo 560484) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Aquisição das amostras foi feita utilizando o FACS Calibur (BD Bioscience). A curva padrão para cada citocina foi de 20pg/mL até 5000pg/mL.

### **3.12. Avaliação dos níveis séricos de citocinas por Luminex.**

A avaliação dos níveis séricos das citocinas TNF-alfa, IL-1beta, IFN-gama, IL-8 e IL-10 de pacientes e controles foi realizada através do imunoensaio LUMINEX seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (R&D Systems). Resumidamente, foi preparada uma solução contendo mistura das micropartículas de diferentes tamanhos, cada uma recoberta com o anticorpo específico para a citocina de interesse. Cerca de 25µL dessa solução foi incubada com 100µL de soro (diluído 1:2) ou da curva padrão por 3 horas a TA. Após lavagens, foi adicionado 50µL/poço da solução contendo a mistura de anticorpos específicos para cada citocina conjugados a biotina, seguido de incubação por 1 hora a TA. Após lavagens, foi adicionado 50µL/poço da Streptoavidina conjugada com PE e incubados por 30min a TA. Após incubação seguida de 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 Luminex do PDTIS/FIOCRUZ.

### **3.13. Eletroforese de proteínas utilizando-se gel SDS-Poliacrilamida.**

Para a eletroforese de proteínas foram preparados géis de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) com diferentes concentrações, para isto foi feita a adição sequencial dos reagentes de acordo com a tabela 3.4. A solução SDS-PAGE foi colocada entre duas placas de vidro e incubada por 30min a TA (temperatura ambiente) para polimerização do gel. Em seguida, foi preparado o *stacking* gel pela adição sequencial dos componentes, de acordo com a tabela 3.4, em seguida o gel foi polimerizado por 30 min a TA. Após essa etapa as placas de vidro contendo o gel foram colocadas na cuba de eletroforese imersas em tampão de corrida (0,003% Tris, 0,0188% glicina, 0,1% SDS diluídos em dH<sub>2</sub>O). Uma quantidade entre de 0,5µg da proteína alvo previamente desnaturada, com betamercaptoetanol por 5 min a 95°C, foi aplicada em cada poço, e a corrida realizada aplicando-se uma corrente constante de 30A e 300 volts por 45 minutos a TA. Foi utilizado o controle de peso molecular. Após a corrida as proteínas



foram coradas pelo Coomassie blue diretamente no gel ou transferidas para uma membrana de PDVF (Immobilon-P) para a realização do ensaio de Western blot.

**Tabela 3.4: Preparação de gel SDS-poliacrilamida em diferentes percentuais.**

Componentes (volumes em mL)	Gel de resolução Vf=5mL			Stacking Gel Vf=2mL
	8%	10%	12%	5%
Água destilada	2,3	1,9	1,6	1,4
30% acrilamida	1,3	1,7	2,0	0,33
1,5M Tris (pH8,8)	1,3	1,3	1,3	0,25
10% SDS	0,05	0,05	0,05	0,02
10% persulfato de amônio	0,05	0,05	0,05	0,02
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	0,003	0,002	0,002	0,002

### 3.14. Coloração com Coomassie blue.

Após a eletroforese em gel SDS-PAGE as proteínas foram coradas pelo Coomassie blue, através da imersão do gel no corante por 15min a TA. Em seguida o corante foi removido e o gel foi descorado pela adição de solução álcool-ácido (25%metanol e 0,7% ácido acético em água) por 20 minutos a TA. O processo de descoramento foi repetido e o gel foi incubado na solução álcool-ácido overnight a TA. Após este processo a solução era novamente substituída e o gel foi fotografado pelo aparelho Gel Multi Doc-It Imaging System 2UV transiluminator.

### 3.15. Transferência de proteína para a membrana de PDVF (Fluoreto de polivinilideno).

Para a transferência, as membranas de PDVF foram hidratadas por 15 segundos com metanol e incubadas com dH<sub>2</sub>O por 5 min. O sistema de transferência foi imerso em tampão contendo 0,003%Tris, 0,0144% de glicina, 20%. Para a transferência, foi aplicado uma corrente constante de 40A e 300 volts, overnight a 4°C. Após este processo, a membrana PDVF contendo as proteínas transferidas do gel SDS-PAGE estava pronta para o ensaio de Western blot.

### 3.16. Western blot.

As membranas de PDVF contendo as proteínas transferidas foram bloqueadas com 5% leite (BioRad, catálogo 1706404), diluído em 0,1% Tween-20 em PBS por 1h a TA. Após três lavagens com solução de lavagem (0,1% Tween-20 em PBS) cada uma

por 10min a TA, a membrana foi incubada com o anticorpo primário overnight a 4°C. Em seguida, foram realizadas três lavagens e a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a HRP por 1h a TA. Após três lavagens, as membranas foram reveladas com kit de quimioluminescência para Western blot (GE Healthcare) por 5min a TA. Após a incubação, a membrana foi rapidamente imersa em solução de lavagem e quando seca, foi feita a exposição da membrana ao filme por diferentes tempos, entre 1-15 minutos de acordo com a proteína a ser revelada.

**Tabela 3. 5: Anticorpos usados para Western blot.**

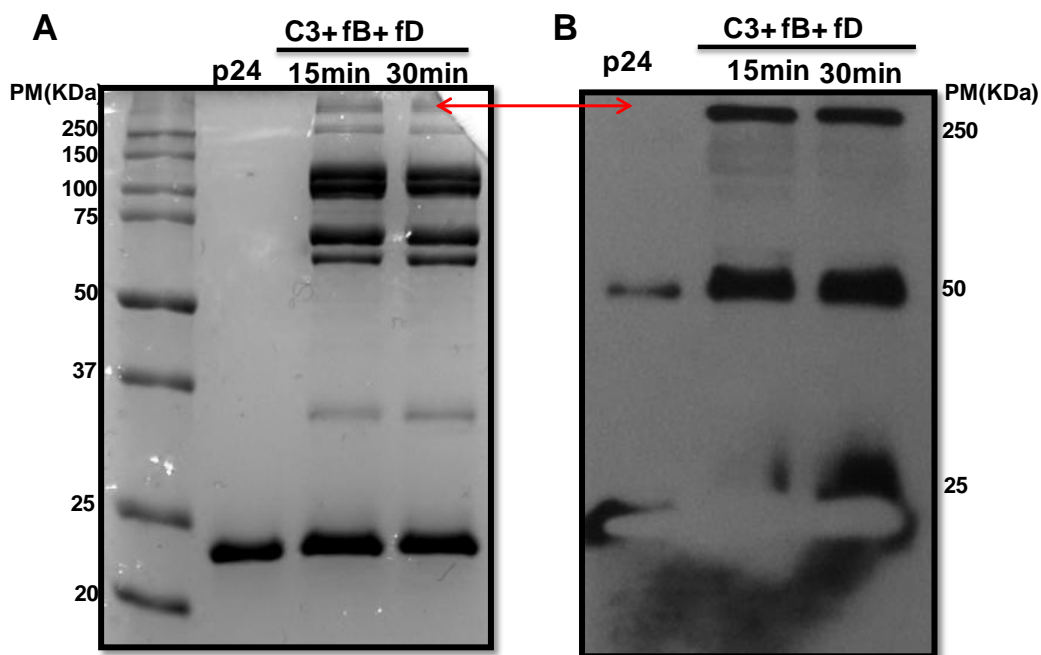
Anticorpo	Diluição	Marca	Clone
Mouse anti-GAG M1	1:10.000	Abcam	policlonal
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:20.000	Millipore	policlonal
anti-DENV	1:200	Santa Cruz	9F10

### **3.17. Padronização do ensaio de ativação do sistema complemento *in vitro* utilizando a proteína p24 do HIV como alvo.**

Os ensaios de ativação do SC *in vitro* foram realizados segundo a metodologia de Ramadass M e colaboradores (255). A proteína p24 de 24kDa (do HIV) foi a proteína inicialmente escolhida, por ser rotineiramente produzida no laboratório e portanto, disponível para uso. O ensaio começa pela adição de 20µg de p24 em tubo do tipo eppendorf de 0,5mL, seguido de 800µg/mL de C3 purificado (Quidel, catálogo A401), 200µg/mL de fator B purificado (Quidel, catálogo A408) e 1ug/mL de fator D (Quidel, catálogo A409) e 0,5mM de Mg<sup>2+</sup> para um volume final de reação de aproximadamente 50µL. As concentrações de todas as proteínas do SC foram estabelecidas segundo as concentrações fisiológicas. A reação foi incubada a 37°C por 15 ou 30min. Como controles negativos da ativação do SC, foi adicionado EDTA 10mM, EDTA 20mM ou a reação sem adição do fator D. Por outro lado, para aumentar a ativação do SC foi adicionado à reação 15ug/mL de properdina (Quidel, catálogo A412). A reação foi parada pela adição do tampão de proteínas (Amresco, catálogo M266) contendo beta mercaptoetanol (1:20), seguida de desnaturação a 95°C por 5-10min. Para a reação com o DENV-2 a quantificação das proteínas totais presente nas alíquotas do vírus foi realizada por NanoDrop.

Segundo dados observados por Ramadass e colaboradores a opsonização pelo fragmento C3b é confirmada pelo aparecimento de uma banda de alto peso molecular contendo a proteína alvo da opsonização. Os ensaios padronizados com a proteína

p24 revelaram o aparecimento de uma banda de alto peso molecular, acima de 250KDa, após a reação de ativação do complemento após 15 ou 30min como demonstrado na figura 3.2A. A presença de p24 acima da banda de 250KDa foi confirmada por Western Blot figura 3.2B. Uma vez que o observado na figura 3.1 corroborou para os achados da literatura o ensaio foi aplicado ao DENV-2. Para a reação de ativação do complemento as proteínas do complemento foram usadas nas concentrações fisiológicas.



**Figura 3. 1: Padronização do ensaio de ativação do sistema complemento *in vitro*.**

A reação de ativação do sistema complemento *in vitro* foi realizada pela adição dos seguintes componentes purificados da via alternativa do sistema complemento C3 (800µg/mL), fB (200µg/mL), fD (1µg/mL), Mg<sup>2+</sup> 0,5mM e 20µg de p24 foi submetida a opsonização. A reação foi incubada por 15 ou 30min a 37° C e para parar a reação foi adicionado o tampão de proteínas contendo beta mercaptoetanol seguido de aquecimento a 95°C por 5min. Em seguida as reações foram aplicadas em um gel de 12% SDS-poliacrilamida juntamente com um controle de peso molecular. A corrida das proteínas no gel foi realizada aplicando uma corrente constante de 30A e 300 volts por 45min. Em seguida um dos géis contendo as reações foi (A) corado pelo Coomassie Blue ou (B) transferidos para membranas de PDVF seguido de marcação por western blot específico para a p24.

### 3.18. Cultivo e manutenção das culturas de células endoteliais microvasculares da derme humana (HMVEC-d).

As células endoteliais HMVEC-d (do inglês: “human microvascular endothelial cells-dermal”) (Lonza, catálogo CC-2543) e cultivadas numa densidade de 2,5x10<sup>4</sup> células/5cm<sup>2</sup> em meio específico EGM-2MV (do inglês “endothelial cell growth medium-

2”) contendo rhFGF-B (do inglês “human fibroblast growth factor-B”), rhEGF (do inglês “epidermal growth factor human”), R3-IGF-1 (do inglês “recomb. long R insulin-like growth factor-1”), rhVEGF (do inglês “endothelial growth factor vascular human”), hidrocortisona, ácido ascórbico, anfotericina B, gentamicina e 10% de SFB (LONZA ou Gibco). Ainda, foram adicionados ao meio de cultivo, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 2 mM L-glutamina. A substituição do meio foi realizada a cada dois dias e as passagens foram feitas no momento em que fosse observado 80% de confluência das monocamadas.

As passagens foram realizadas removendo-se o meio de cultura e adição sobre a monocamada de aproximadamente 3mL de D-PBS (Gibco) sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , a TA. Em seguida, 2mL de solução tripsina-EDTA 0,25% foi adicionado sobre a monocamada seguido de incubação a 37°C por 3-5min com visualização no microscópio invertido. Após o desprendimento das monocamadas, a tripsina foi neutralizada pela adição de 2mL de meio EGM-2MV contendo 10% de SFB a 4°C. As células em suspensão foram transferidas para um tubo cônico de 15mL e centrifugadas a 300g por 5min, TA. O *pellet* de células foi suspenso em EGM-2MV suplementado. A contagem e avaliação da viabilidade celular foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão azul de trypan. Para os experimentos as HMVECs foram utilizadas nas passagens de 6 a 8.

### **3.19. Ensaio de permeabilidade transendotelial através da medida da resistência elétrica transendotelial (TEER).**

Para os ensaios de permeabilidade transendotelial, foi utilizado o sistema de Transwell (Corning) no qual insertos de 0,33cm<sup>2</sup> de diâmetro e poros de 3µm, foram acoplados sobre os poços de placas de 24. Previamente, os insertos foram revestidos com 50µL de fibronectina a 1µg/mL por 30 min a 37°C. Baseado em trabalhos anteriores, foi estabelecido o modelo de plaqueamento das HMVEC em dois dias consecutivos (256), em que 10<sup>5</sup> HMVECs/200µL foram plaqueadas no dia 1 seguindo incubação a 37°C, 80% de umidade e 5% CO<sub>2</sub>. Ao poço inferior da placa foram adicionados 1000µL de meio EGM-2. No dia seguinte, o meio foi removido, e adicionado cuidadosamente 10<sup>5</sup> HMVECs/300µL nos insertos seguindo nova incubação até o dia seguinte quando foram realizados os experimentos. Após remoção do meio de cultura dos poços, 20% de soro de pacientes diluídos em meio EGM-2MV foram acrescentados sobre a monocamada de HMVEC com incubação por 30min. A

avaliação do TEER foi realizada pela câmara Endohm 6 (World Precision) e aparelho Millicell-ERS (Millipore). Um inserto controle, branco, foi exposto às mesmas condições acima, exceto a adição das células e o soro de pacientes. O valor de TEER é encontrado pela aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{TEER } (\Omega/\text{cm}^2) = (\text{valor detectado da amostra} - \text{Branco}) \times 0,33\text{cm}^2 \text{ (área do inserto)}.$$

### **3.20. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de detecção da LDH (lactato desidrogenase).**

Em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro recobertas previamente com 1µg/mL de fibronectina por 30 minutos a 37°C, foram cultivada 10<sup>5</sup> HMVECs/500µL por poço em meio EGM-2 suplementado, contendo 10% SFB, seguido de incubação por até 4 dias até formação de uma monocamada com de 80% confluência a 37°C, 80% de umidade e 5% CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio das culturas foi removido e as células incubadas ou não com 10µg/mL RGD (Sigma, catálogo A8052) por 30min a 37°C. Após incubação, sobre as células pré-tratadas ou não com RGD foi adicionado 20% de soro de pacientes infectados pelo DENV diluídos em meio EGM-2mV seguido por incubação de 30min a 37°C. Os soros foram então removidos e transferidos para uma placa de ELISA para o ensaio de LDH

O ensaio de citotoxicidade é baseado na liberação da enzima LDH intracelular por células não íntegras no sobrenadante da cultura. Para realização do ensaio, é necessário o controle positivo contendo 1% Triton X-100 no qual tem-se 100% de liberação de LDH, enquanto que para o controle negativo foram utilizadas células HMVEC sem qualquer tratamento, apenas meio de cultura. Desta forma, 100µL do sobrenadante é transferido para uma placa de ELISA e incubado com 100µL da mistura fornecida pelo Kit de citotoxicidade (Roche, catálogo 11644793001) para a reação durante 30min, a TA, protegido da luz. A absorbância foi medida a 492nm no aparelho SpectraMax Paradigm®.

## 4. RESULTADOS

---

### 4.1. Investigação do perfil de expressão de receptores do complemento (CR) CR1(CD35), CR2(CD21), CR3(CD11b) CR4(CD11c) e CD59 em monócitos de pacientes infectados pelo DENV e do envolvimento dos CR na regulação da infecção pelo DENV-2 *in vitro* utilizando monócitos primários isolados de doadores de sangue saudáveis.

---

Neste capítulo serão descritos os resultados referentes à seguinte publicação (Anexo 2):

*Down-regulation of complement receptors on the surface of host monocyte even as in vitro complement pathway blocking interferes in dengue infection. Marinho CF, Azeredo EL, Torrentes-Carvalho A, Marins-Dos-Santos A, Kubelka CF, de Souza LJ, Cunha RV, de-Oliveira-Pinto LM. PLoS One. 2014 Jul 25;9(7):e102014. doi: 10.1371/journal.pone.0102014.*

#### 4.1.1. Caracterização clínica e laboratorial da população de estudo.

Neste primeiro capítulo de resultados, utilizamos 66 amostras de sangue de pacientes coletadas entre o 1º e o 11º dias de doença, contados a partir do aparecimento do(s) primeiro(s) sinal(is) e/ou sintoma(s), e com diagnóstico laboratorial confirmado de infecção pelo Dengue. As amostras foram coletadas em 2010 em Campo Grande, no MS e Campos dos Goytacazes, no RJ. A classificação clínica obedeceu aos critérios estabelecidos pela OMS em 2009, no qual os pacientes foram incluídos nos grupos: febre do dengue FD (n=34), FD com sinais de alarme FD/SA (n=17) e Graves (n=15). O grupo controle foi composto por 10 indivíduos saudáveis, sem episódios de febre ou histórico de doenças nos últimos três meses. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais foram sumarizados na tabela 4.1. Como observado, controles e pacientes (independente da forma clínica), apresentaram perfil similar com relação a sexo, idade e dias de doença (no caso de pacientes). As técnicas de RT-PCR e isolamento viral confirmaram que as infecções foram pelos sorotipos DENV-1 e DENV-2. A maioria dos pacientes apresentou infecção secundária pelo DENV. Os sinais e sintomas clínicos mais frequentes foram febre, cefaleia, dor retro-

orbitária, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos e, em menor frequência, diarreia, desidratação, edema e dor abdominal. Os grupos FD/SA e Grave apresentaram hepatomegalia, adenomegalia, vômitos persistentes, irritabilidade e sonolência. Apenas nos casos graves foram observados extravasamento plasmático, hipotensão e manifestações hemorrágicas graves como gengivorragia, hematúria, epistaxe, metrorragia ou melena. A contagem de plaquetas foi significativamente menor nos pacientes em comparação aos controles saudáveis. Menor contagem de plaquetas também foi observada nos pacientes graves comparado aos FD/SA e FD, bem como nos pacientes FD/SA em comparação aos FD e controles. Pacientes graves apresentaram diminuição significativa no valor de hematócrito em comparação aos controles e FD. Pacientes graves apresentaram aumento significativo nos níveis das enzimas hepáticas AST e ALT em comparação aos FD, mas não aos FD/SA. A contagem de leucócitos foi significativamente menor nos pacientes em comparação aos controles saudáveis. Na tabela 4.1 foi observado que a frequência de monócitos tende a diminuir com o aumento da gravidade. Uma vez que os monócitos são os principais alvos de infecção pelo DENV, este estudo avaliou inicialmente a frequência de monócitos de pacientes infectados pelo DENV expressando os receptores do Sistema Complemento.

Tabela 4.1: Perfil demográfico, clínico e laboratorial dos pacientes.

Grupo	Controles <sup>n=10</sup>	FD <sup>n=34</sup>	FD/SA <sup>n=17</sup>	Grave <sup>n=15</sup>
Sexo (F/M)	8/2	17/17	10/7	7/8
Idade <sup>a</sup>	38,4 ± 16,5	39,8 ± 17,5	40,4 ± 17,1	40,4 ± 19,6
Dias de doença <sup>a, b</sup>	-	3,8 ± 2,2	3,9 ± 2,8	4,5 ± 2,2
DENV-1, n (%) <sup>c</sup>	-	3(8)	3(17)	0
DENV-2, n (%) <sup>c</sup>	-	13(38)	4(23)	4(26)
Extravasamento plasmático(%) <sup>d</sup>	-	0	0	53,3%
Sangramento (%) <sup>e</sup>	-	29%	53%	73,3%
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3 a</sup>	295,2 ± 38,7	138,9 ± 76,8*	73,9 ± 52,5 <sup>#, @</sup>	47,1 ± 61,3 <sup>%, \$, §</sup>
Hematócrito <sup>a</sup>	37,8 ± 1,3	40,2 ± 3,4	38,9 ± 5,1	36,6 ± 3,2 <sup>%, §</sup>
AST U/L <sup>a</sup>	-	77,6 ± 81,4	98,5 ± 93,3	179 ± 239 <sup>§</sup>
ALT U/L <sup>a</sup>	-	71,8 ± 76,6	83,3 ± 75	190 ± 286 <sup>§</sup>
Leucócitos/mm <sup>3 a</sup>	6100 ± 731	4047 ± 2573*	3402 ± 1426 <sup>#</sup>	4598 ± 2986 <sup>%</sup>
Monócitos/mm <sup>3 a</sup>	432,7 ± 99,8	454,9 ± 375,5	252,4 ± 156,0	241,4 ± 185,6

<sup>a</sup> Valores representados pela média ± desvio padrão;

<sup>b</sup> a partir do aparecimento dos primeiros sintomas;

<sup>c</sup> n (%) indica o número de pacientes e o percentual de positivos dentre o total;

<sup>d</sup> sinais extravasamento plasmático: derrames pleural ou pericárdico, ascite;

<sup>e</sup> mais observadas foram petéquias, gengivorragia, hematúria, epistaxe, metrorragia ou melena.

Os diferentes símbolos representam a diferença estatística entre: \*FD vs Controles. # Controles vs FD/SA € Controles vs Graves, @FD vs FD/SA; §FD vs Grave, \$ FD/SA vs Grave.

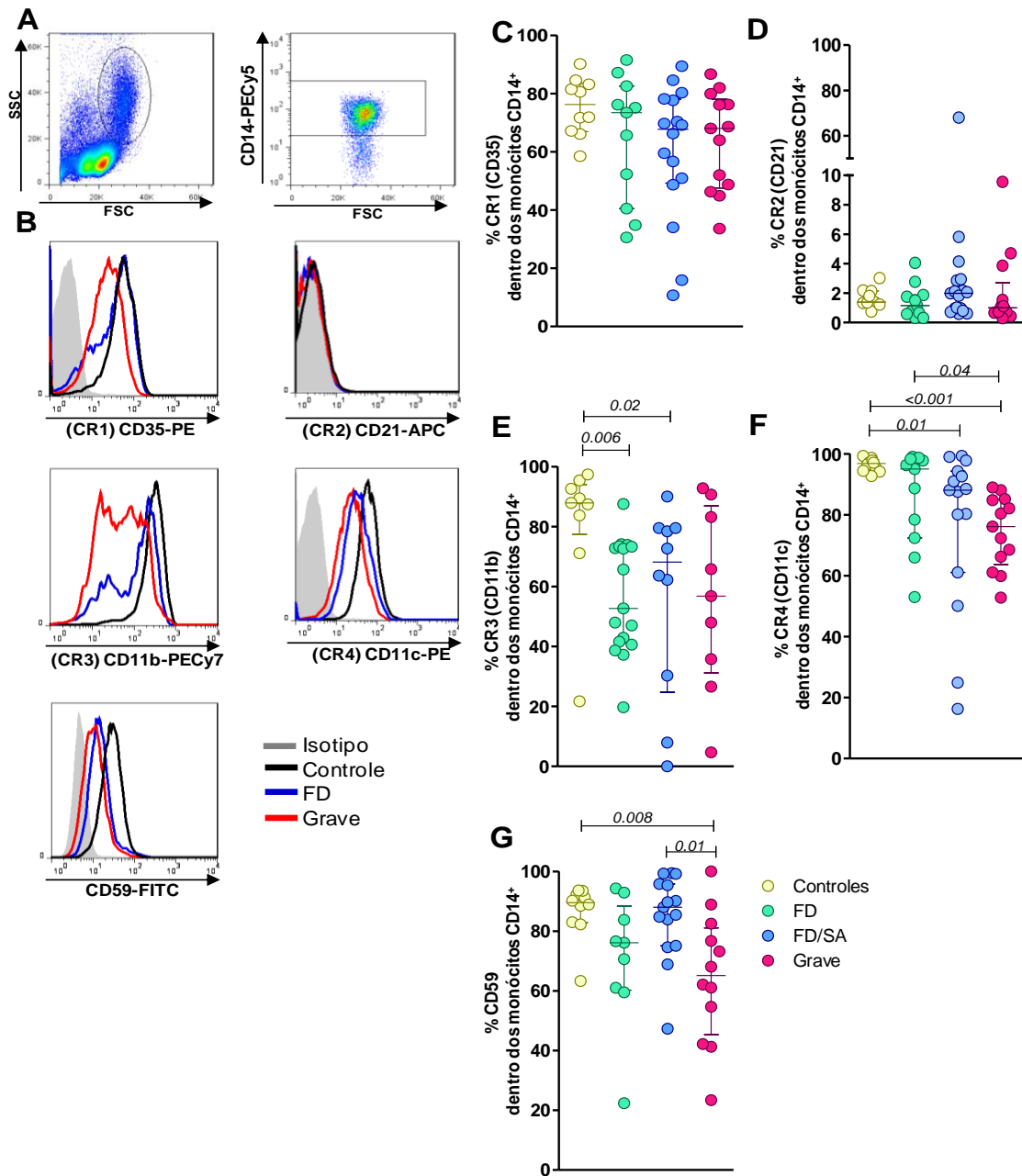
Teste estatístico: Mann-Whitney U, sendo que símbolos representam p<0,05.



#### **4.1.2. Diminuição da frequência de monócitos expressando CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e CD59 em pacientes infectados pelo DENV.**

A caracterização do perfil de expressão de receptores do sistema complemento (CR) nos monócitos de pacientes-DENV e controles foi realizada por citometria de Fluxo, a partir das PBMCs isoladas desses indivíduos. A população de monócitos foi inicialmente selecionada com base nas características morfológicas de tamanho FSC (do inglês: “forward scatter”) e granulosidade SSC (do inglês: “side scatter”) e fenotípicas (expressão da molécula CD14<sup>+</sup>), como exemplificado na figura 4.1A. Em seguida, dentro da região CD14<sup>+</sup>, foi avaliada a expressão dos CR após 48 horas de infecção (figura 4.1B).

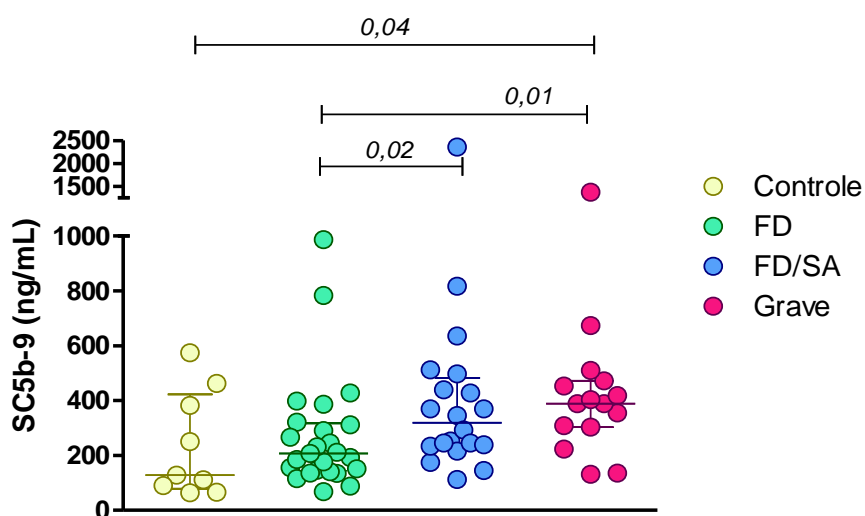
Dentre os CR avaliados, a frequência de monócitos expressando CR1 (CD35) ou CR2 (CD21) foi similar entre pacientes-DENV e controles (figura 4.1C-D). Entretanto, foi visto diminuição na frequência de monócitos expressando CR3 (CD11b) em pacientes FD e FD/SA comparado aos controles (figura 4.1E) e ainda, diminuição de monócitos expressando CR4 (CD11c) nos pacientes FD/SA e graves comparado aos controles e nos pacientes graves comparado aos FD (figura 4.1F). Por fim, uma menor frequência de monócitos expressando CD59 foi observada no grupo grave comparado aos controles e FD/SA (figura 4.1G). A diminuição da frequência de monócitos expressando CR em pacientes-DENV, independente da forma clínica da doença, não teve relação com os dias de doença (1-3, 4-6 e 7-11 dias, dados não demonstrados). Assim, na infecção natural pelo DENV há modulação da frequência de monócitos de pacientes expressando CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e CD59, sugerindo que estes receptores poderiam estar relacionados com a patogênese da doença.



**Figura 4.1: Frequência de monócitos expressando receptores de complemento em pacientes infectados pelo DENV e controles saudáveis por citometria de fluxo. (A)** Estratégia de seleção da população de monócitos nas PBMCs baseada primeiramente no tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e em seguida da expressão da molécula CD14. **(B)** Histogramas representativos da expressão de CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e CD59 dentro da população de monócitos CD14<sup>+</sup> nos seguintes indivíduos representativos: controle saudável (linha preta), paciente FD (linha azul), paciente grave (linha vermelha) e o isotipo controle (cinza). **(C-G)** Representação gráfica da frequência de monócitos CD14<sup>+</sup> expressando receptores de complemento em controles saudáveis (amarelo) e pacientes FD (verde), FD/SA (azul) e grave (rosa). Cada ponto do gráfico representa um indivíduo. Linhas horizontais representam as medianas de cada grupo e as verticais, a variação interquartil (25-75%). Para as análises estatísticas foi aplicado o teste Mann-Whitney no qual significância estatística entre os pares indicada pela barra horizontal superior contendo os valores de  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3. Elevados níveis plasmáticos do produto de ativação do sistema complemento SC5b-9 nas formas mais graves da doença.

Com base nos resultados anteriores, nós fomos confirmar se a infecção pelo DENV estaria influenciando a ativação do SC. O produto final da ativação do SC, o complexo SC5b-9 foi encontrado em níveis significativamente mais elevado no plasma de pacientes graves e FD/SA comparado aos pacientes FD. Além disso, pacientes graves apresentaram maiores quantidades de SC5b-9 do que os controles saudáveis. Não foi detectada relação entre os níveis plasmáticos de SC5b-9 e os dias de doença. Nos pacientes que apresentaram manifestações hemorrágicas e/ou extravasamento plasmático foram detectados níveis plasmáticos mais elevados de SC5b-9 comparados aos pacientes que não apresentaram esses sintomas (tabela 4.2). Em conjunto, esses resultados sugerem ativação do SC na Dengue.



**Figura 4.2: Níveis plasmáticos do produto de ativação do sistema complemento SC5b-9.** A dosagem do complexo SC5b-9 foi realizada no plasma de pacientes infectados em controles saudáveis por ELISA. Cada ponto representa um indivíduo. As análises estatísticas foram realizadas pela aplicação do teste Mann-Whitney. Linhas horizontais representam as medianas de cada grupo enquanto que as verticais representam a variação interquartil (25-75%). Para as análises estatísticas foi aplicado o teste Mann-Whitney U, a significância estatística entre os pares indicada pela barra horizontal superior contendo os valores de  $p < 0,05$ .

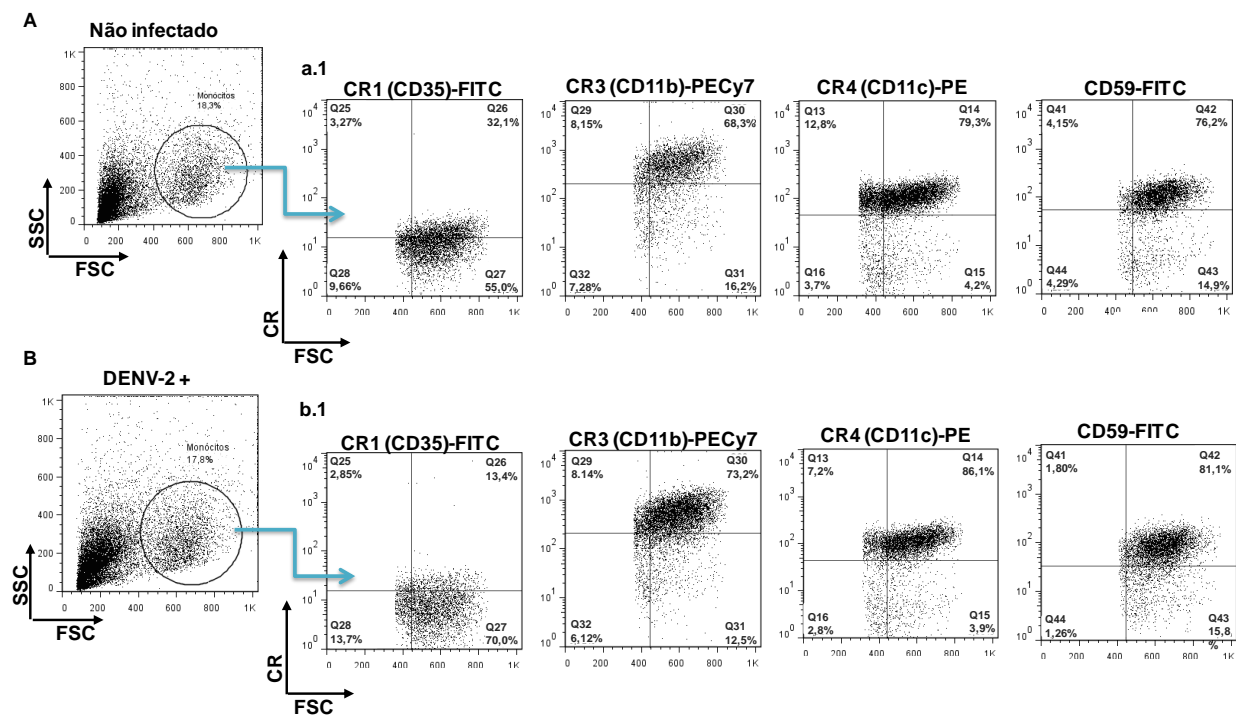
**Tabela 4.2: Níveis de SC5b-9 plasmáticos em pacientes associados ou não com manifestações hemorrágicas e sintomas de extravasamento vascular.**

Manifestações clínicas	SC5b-9 (ng/mL) <sup>a</sup>	p
<b>Sangramentos</b>		
Sim	328,6 (243,7-434,5) <sup>a</sup>	0,04
Não	199,8 (145,5- 412,2) <sup>a</sup>	
<b>Extravasamento plasmático</b>		
Sim	453,2 (354,7-673,9) <sup>a</sup>	0,02
Não	266,9 (174,3-403,3) <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>Valores representam a mediana e entre parênteses os valores mínimo e máximo encontrada para cada grupo. Comparação da mediana dos valores de SC5b-9 em pacientes que apresentaram ou não manifestações hemorrágicas (gingivorragia, hematúria, epistaxe, metrorragia ou melena) e Comparação da mediana dos valores de SC5b-9 em pacientes que apresentaram ou não sinais de extravasamento plasmático (derrames pleural ou pericárdico, ascite). A análise estatística foi feita utilizando o teste Mann-Whitney U.

#### **4.1.4. A infecção pelo DENV-2 de monócitos humanos primários *in vitro* não altera o perfil de expressão dos receptores do SC nestas células-alvo.**

Uma vez que resultados anteriores demonstraram diminuição da frequência de monócitos expressando CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e CD59 em pacientes infectados pelo DENV, ensaios *in vitro* foram realizados a fim de investigar o impacto dos receptores CR1(CD35), CR3 (CD11b) e do CR4 (CD11c) na ativação dos monócitos e na infecção viral. Para isto, monócitos isolados de doadores de sangue saudáveis foram infectados pelo DENV-2 *in vitro*. Como esperado, os primeiros ensaios confirmaram a infecção pelo DENV-2 nestas células. De forma interessante, após 48horas de infecção *in vitro*, a frequência de monócitos expressando CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) ou CD59 foi comparável entre monócitos infectados e não infectados. Nos monócitos infectados, observamos uma diminuição na frequência destas células expressando CR1(CD35), porém esta não foi estatisticamente significativa (tabela 4.3). Dot plots representativos da frequência dos monócitos infectados ou não, pelo DENV-2 *in vitro*, expressando os CR foram demonstrados na figura 4.3. Ao mesmo tempo, a frequência desses monócitos expressando CR *in vitro* foi similar à observada monócitos de pacientes infectados pelo DENV (dado não mostrado), com exceção do CR1 (CD35), cuja mediana de expressão *in vitro* foi de 12% (3,1-15,8) e na infecção natural 51,7%(41,1-70%).



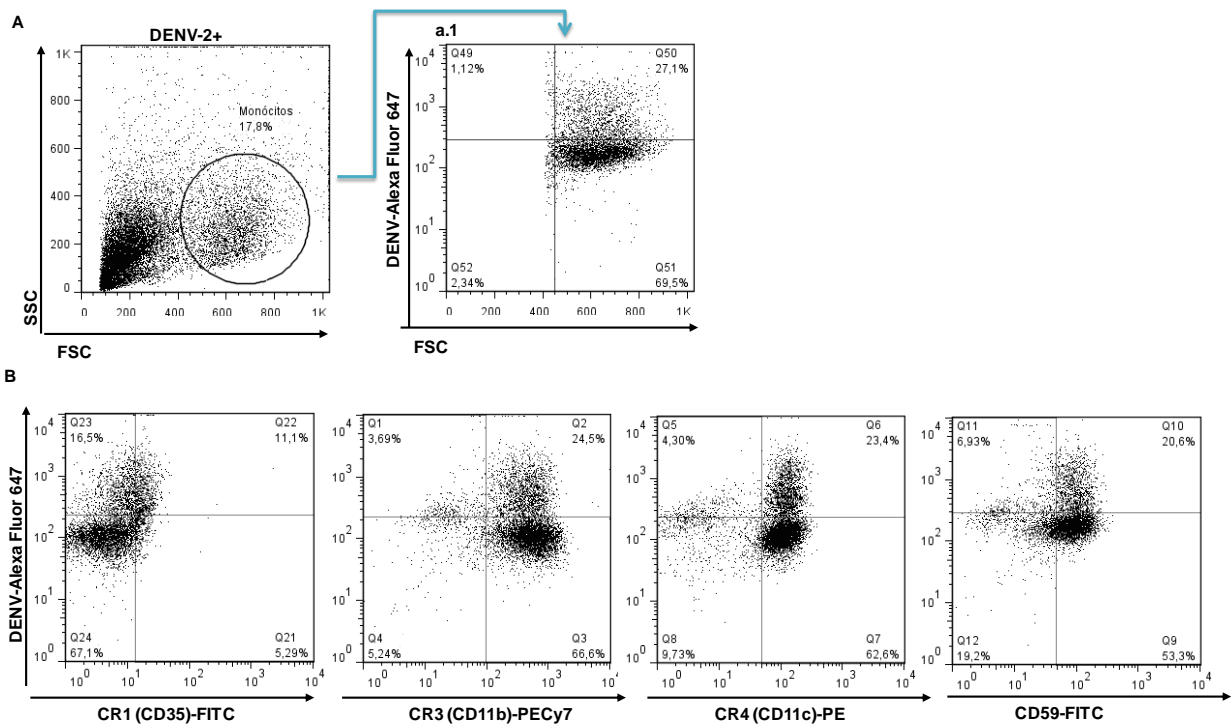
**Figura 4.3. Expressão de CR nos monócitos infectados ou não pelo DENV-2 *in vitro*.** Dot plots representativos do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de monócitos humanos, isolados por seleção negativa, **(A)** não infectados ou **(B)** infectados pelo DENV-2 *in vitro*. Ainda, os gráficos seguintes demonstram a expressão dos CRs [CR1(CD35), CR3(CD11c), CR4(CD11b) e CD59] no eixo y *versus* tamanho (FSC) no eixo x ,dentro da população de monócitos **(a.1)** infectada ou **(b.1)** não pelo DENV.

**Tabela 4.3: Frequência de monócitos infectados ou não que expressam CR na infecção pelo DENV-2 *in vitro*.**

	Infetados	Não infectados
<b>CR1 (CD35)<sup>a</sup></b>	12,1% (3,1 - 15,%)	29,1% (11,6 - 37,4%)
<b>CR3 (CD11b)<sup>a</sup></b>	69,6% (67,4 - 75%)	69,6% (67,9 - 76,5%)
<b>CR4 (CD11c)<sup>a</sup></b>	89,1% (78,9 - 93,5%)	89,1% (62 - 92,3%)
<b>CD59<sup>a</sup></b>	83% (74 - 89,2%)	83,8% (77,5 - 86,5%)

<sup>a</sup>Valores representam a mediana e entre parênteses os valores mínimo e máximo. A análise estatística foi feita utilizando o teste Mann-Whitney U.

Observando apenas a subpopulação de monócitos que foram infectados pelo DENV-2 *in vitro*, aqueles expressando CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e CD59 foram mais infectadas comparado aos monócitos que não expressavam esses CRs. Em contraste, monócitos expressando CR1 (CD35) (tabela 4.4) foram os menos infectados pelo DENV-2 comparados aqueles que expressavam este CR. A estratégia de gate para esta análise utilizando monócitos de um doador representativo é demonstrada na figura 4.4.



**Figura 4.4. Infecção pelo DENV em monócitos que expressam CR.** Dot plots representativos do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) da população de **(A)** monócitos humanos, isolados por seleção negativa, infectados pelo DENV-2. **(a.1)** Detecção do antígeno viral intracelular (anti-DENV-Alexa fluor 647) na população de monócitos selecionada em A. **(B)** Co-expressão do antígeno viral, no eixo y, e CRs [CR1(CD35), CR3 (CD11c), CR4(CD11b) e CD59] no eixo x, na população de monócitos selecionada em A.

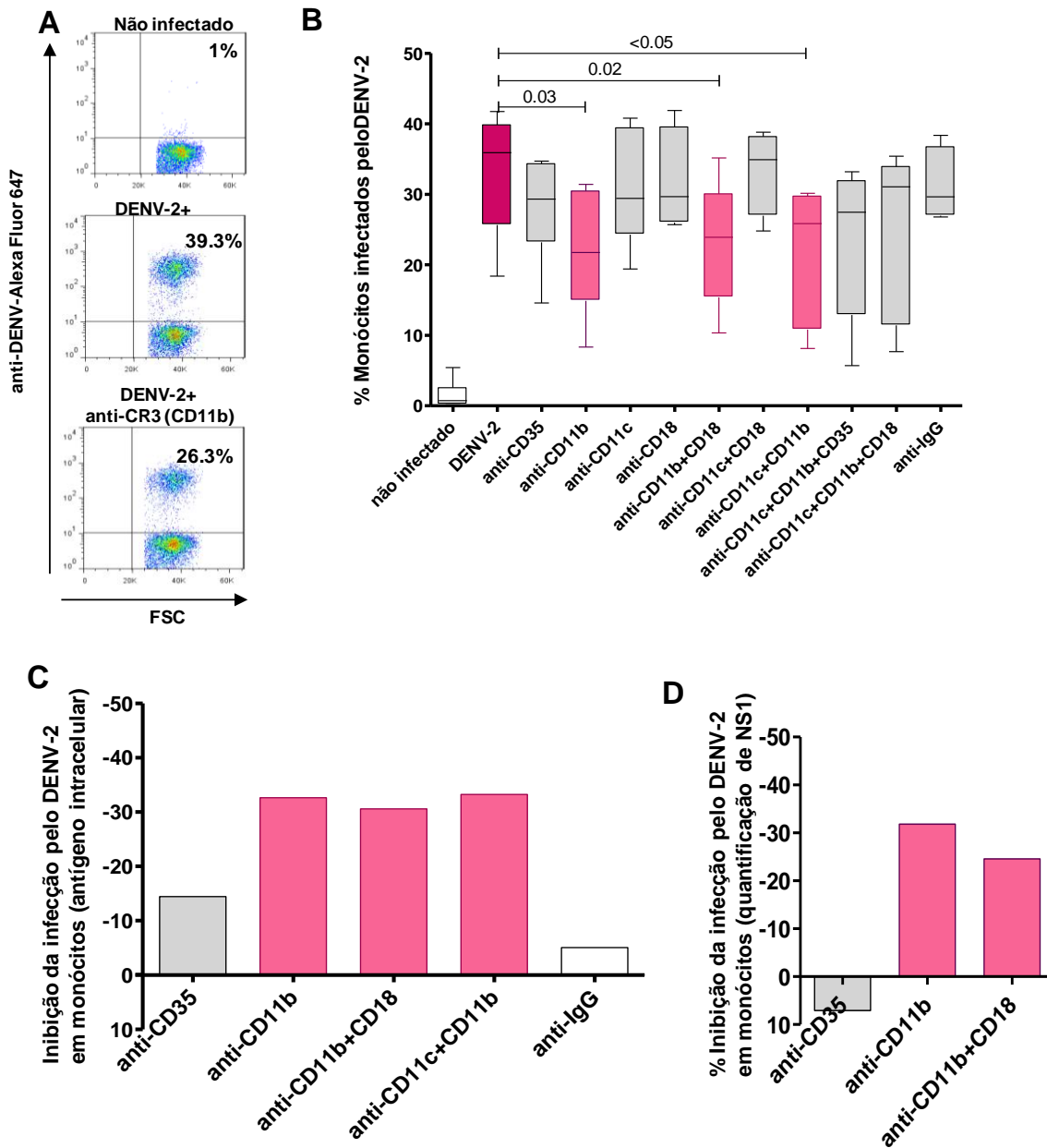
**Tabela 4.4: Frequência do antígeno viral do DENV-2 em monócitos que expressam CR.**

Expressão nos monócitos:	%monócitos infetados	<i>p</i>
<b>CR1 (CD35)<sup>a</sup></b>		
Positiva,	5,0 (1,3–6,3)	0,002
Negativa	29,4 (19,9–35,3)	
<b>CR3 (CD11b)<sup>a</sup></b>		
Positiva	20,0 (16,7–24,7)	0,01
Negativa	9,9 (2,2–14,3)	
<b>CR4 (CD11c)<sup>a</sup></b>		
Positiva	24,2 (14,8–33,6)	0,004
Negativa	3,7 (1,5–7,1)	
<b>CD59<sup>a</sup></b>		
Positiva	24,8 (19,8–37,5)	0,002
Negativa	3,5 (2,1–5,1)	

<sup>a</sup> Valores representam a mediana e entre parênteses os valores mínimo e máximo. A análise estatística foi feita utilizando o teste Mann-Whitney U.

#### **4.1.5. O bloqueio do CR3 (CD11b) antes da infecção pelo DENV-2 em monócitos *in vitro* diminui a taxa de infecção pelo DENV nestas células-alvo.**

Na tentativa de entender o quanto os CR estariam envolvidos na infecção e na ativação dos monócitos, fomos avaliar o pré-tratamento dos monócitos de doadores com anticorpos bloqueadores anti-CR1 (CD35), anti-CR3 (CD11b), anti-CR4 (CD11c), e anti-CD18 sozinhos ou combinados, seguido da infecção pelo DENV-2. Como demonstrado na figura 4.5B, anticorpos neutralizantes anti-CR1 (CD35), anti-CR4 (CD11c) ou anti-CD18 sozinhos não alteraram a taxa de infecção. No entanto, o bloqueio de CR3 (CD11b) sozinho resultou numa diminuição significativa da infecção [de 35,9% (25,7 - 38,9%) para 21,8%(14,9 - 30,5%),  $p=0,03$ ] e o bloqueio do CR3 (CD11b) associado ao bloqueio de CD18 ou CR4 (CD11c) reduziu a infecção para [23,9% (15,4 - 30,1%),  $p=0,02$ ] ou [ 21,1% (8,13- 30,1%)  $p=0,05$ ], respectivamente (figura 4.5B). Esses dados sugerem que o CR3 (CD11b) sozinho, associado a CD18 ou ao CR4 (CD11c) é capaz de modular negativamente a infecção pelo DENV-2 *in vitro*. Esse efeito foi confirmado através da quantificação da proteína viral NS1 no sobrenadante das culturas de monócitos nas diferentes condições, no qual foi confirmada a inibição da infecção *in vitro* com o uso do bloqueador anti-CR3 (CD11b) (figura 4.5C).



**Figura 4.5: Efeito do bloqueio dos CRs na infecção pelo DENV-2 em monócitos *in vitro*.** Detecção de antígenos virais intracelulares em monócitos, pré-tratados ou não com 10µg/mL de anticorpos neutralizantes anti-(CR1) CD35, CR3 (CD11b), CR4 (CD11c), CD18 ou IgG sozinhos ou combinados após 48 horas de infecção, foi realizada pela técnica de citometria de fluxo (A) Dot plots representativos da detecção de antígenos virais intracelulares dentro de monócitos não infectados, infectados pelo DENV-2 sem e com bloqueio prévio de CR3(CD11b). (B) Gráfico de barras demonstrando a frequência de monócitos infectados pelo DENV-2 nas diferentes condições de bloqueio em 9 doadores saudáveis em 5 experimentos independentes (C) Percentual de inibição da infecção de monócitos calculada pela seguinte fórmula:  $[(\% \text{ de infecção com bloqueio} / \% \text{ de infecção sem bloqueio}) \times 100] - 100$ . (D) Percentual de inibição da infecção de monócitos pela detecção de NS-1 no sobrenadante das culturas calculada pela seguinte fórmula:  $[(\text{DO NS1 com bloqueio} / \% \text{ DO NS1 sem bloqueio}) \times 100] - 100$ . Análises estatísticas foram realizadas pela aplicação do teste Mann-Whitney U. A significância estatística entre os pares é indicada pela barra horizontal superior contendo os valores de p.



#### 4.1.6. O bloqueio do CR3 (CD11b) antes da infecção pelo DENV-2 em monócitos *in vitro* não altera o perfil de ativação destas células-alvo.

Foi avaliado ainda se o bloqueio dos CRs também seria capaz de modular a expressão de marcadores de ativação dos monócitos infectados pelo DENV-2 *in vitro*. Inicialmente, foi observado que a infecção *in vitro* pelo DENV-2 não alterou de forma importante a frequência de monócitos expressando marcadores de ativação como o CD86 ou HLA-DR. Entretanto, a frequência de monócitos expressando CD40 foi significativamente menor nos monócitos não infectados comparado aos infectados (tabela 4.5). Apesar da mediana indicar diminuição da expressão de CD86 nos monócitos infectados *in vitro* essa diferença não foi significativa (tabela 4.5). Nós investigamos ainda, se o bloqueio dos CR seguido da infecção alteraria o fenótipo dos monócitos com relação a moléculas de ativação, como demonstrado na tabela 4.6 o fenótipo dos monócitos coexpressando CRs e CD86, HLA-DR ou CD40 foi similar. O bloqueio dos CR na ausência de infecção também não alterou o perfil de expressão de CR ou moléculas de ativação (dado não demonstrado).

**Tabela 4.5. Comparação da expressão de moléculas de ativação em monócitos infectados ou não pelo DENV-2 *in vitro*.**

	Infectados <sup>a</sup>	Não infectados <sup>a</sup>	<i>p</i>
<b>CD86</b>	38,6% (19,3 – 82,6%)	69,4% (45,4 – 80,1%)	<i>ns</i>
<b>HLA-DR</b>	84% (80,7 – 84,9%)	86,6% (76,2 – 92,3%)	<i>ns</i>
<b>CD40</b>	21,3% (11,9 – 27,2%)	39,9% (33,8 – 41,5%)	0,030

<sup>a</sup> Valores representam a mediana e entre parênteses os valores mínimo e máximo. A análise estatística foi feita utilizando o teste Mann-Whitney U.

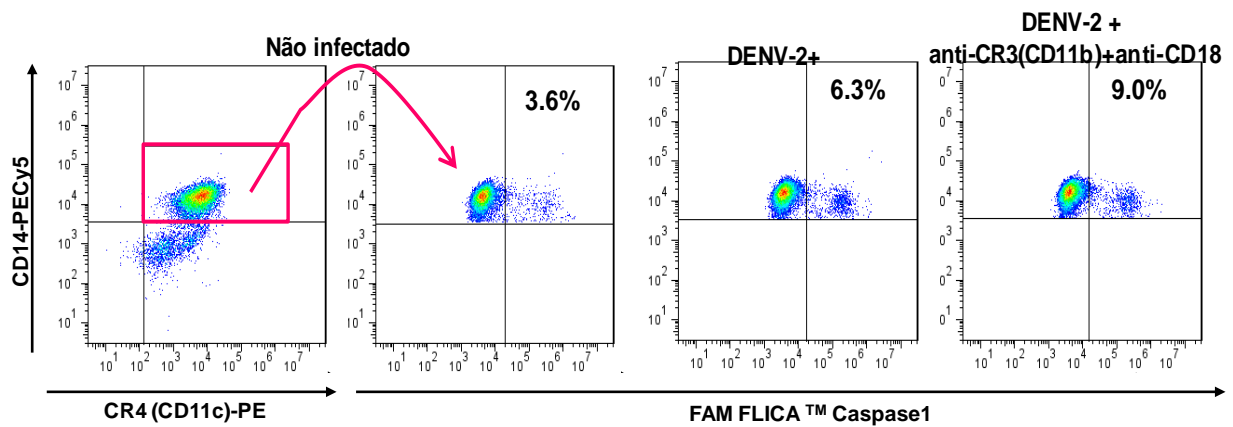
**Tabela 4.6: Efeito do bloqueio prévio de CR1 (CD35) e CR3 (CD11b) seguido da infecção pelo DENV-2 *in vitro* na coexpressão CR e moléculas de ativação em monócitos de doadores.**

Coexpressão	Sem bloqueio	Bloqueio com anti-CD35	Bloqueio com anti-CD11b
CR1(CD35) <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	3,2 (1,9–6,2)	2,0 (1,3–3,5)	6,3 (2,8–7,6)
CR3(CD11b) <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	19,6 (11,4–43,0)	26,8 (18,6–59,3)	23,6 (14,4–44,3)
CR4(CD11c) <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	13,2 (10,8–30,0)	13,4 (9,8–34,6)	13,9 (12,6–23,0)
CD59 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	85,7 (67,2–93,2)	89,2 (63,9–97,3)	89,9 (66,7–95,0)
CD59 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup>	5,0 (4,2–17,0)	5,3 (1,4–8,9)	4,4 (3,4–9,1)

<sup>a</sup> Valores representam a mediana e entre parênteses os valores mínimo e máximo. A análise estatística foi feita utilizando o teste Mann-Whitney U.

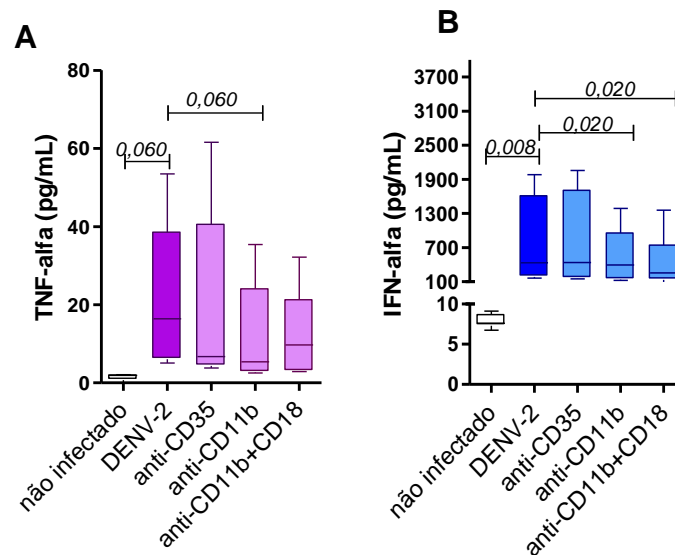
#### **4.1.7. O bloqueio de CR3 (CD11b) antes da infecção pelo DENV-2 em monócitos *in vitro* não altera a ativação da caspase-1, porém diminui a produção das citocinas TNF-alfa e IFN-alfa.**

Um das principais mecanismos da resposta imune inata contra infecções virais é o a liberação de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, a IL-1beta sintetizada em sua forma inativa e clivada pela caspase-1 ativa (257). De fato, foi demonstrado que monócitos infectados pelo DENV são capazes de ativar a caspase-1 levando a secreção de IL-1 beta contribuindo para a ativação de um perfil pró-inflamatório envolvido na patogênese da doença (258). Assim, foi avaliado se o bloqueio do CR afetaria ativação da caspase-1 na infecção pelo DENV-2 em monócitos *in vitro*. Foi observado níveis intracelulares aumentados de caspase-1 ativa em monócitos infectados comparados aos não infectados (6,1% [5,7–6,7%] vs. 3,6% [3,2–4,4%], respectivamente  $p < 0,001$ ). Entretanto, o bloqueio de CR3 (CD11b) sozinho (dado não demonstrado) [7,9% (6,3–8,9%)] ou associado (CD11b/CD18) [8,1% (2,8 –9,3%)] não alterou de forma significativa a ativação da caspase-1 (figura 4.6).



**Figura 4.6: Efeito do bloqueio dos CR na infecção pelo DENV-2 *in vitro* na ativação da caspase-1.** Seleção da região morfológica de 10000 monócitos baseada nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Em seguida, a marcação da caspase-1 ativada com o FAM FLICA caspase-1 na população de monócitos CD14<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> não infectados, infectados pelo DENV-2 com ou sem o bloqueio prévio do CR3 (CD11b). Para as análises foram feitos 3 experimentos independentes com 5 doadores. O valor em negrito do lado superior direito dos gráficos indica a frequência de caspase-1 ativa dentro da população de monócitos CD14<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>. Análises estatísticas foram realizadas pela aplicação do teste Mann-Whitney U.

Com o objetivo de investigar o perfil de produção de citocinas de monócitos infectados pelo DENV-2 frente ao bloqueio de CR, foi feita a dosagem das citocinas IL-2, IFN-gama, IL-4 e IL-5 no sobrenadante das culturas, estas não revelaram diferenças significativas entre as condições testadas (dado não mostrado). Entretanto, foram detectados níveis aumentados das citocinas TNF-alfa e IFN-alfa no sobrenadante de monócitos infectados comparado aos não infectados. De forma interessante, o bloqueio prévio de CR3(CD11b) sozinho ou associado ao CD18 seguida da infecção, reduziu a produção destas citocinas (figura 4.7A,B) o que pode ser devido a menor infecção pelo DENV nestas condições. Assim, nossos dados sugerem que o bloqueio do CR3(CD11b) diminui a infecção pelo DENV de maneira independente da ativação do inflamossoma sem alterar a ativação de monócitos ou produção de citocinas pró-inflamatórias e com atividade anti-viral. Assim, o mecanismo pelo qual o bloqueio de CR3(CD11b) inibe a infecção pelo DENV ainda precisa ser esclarecido.



**Figura 4.7: Efeito do bloqueio dos CRs em em monócitos infectados pelo DENV-2 *in vitro* na produção de TNF-alfa e IFN-alfa.** Gráficos representativos da produção de (A) TNF-alfa avaliada pelo ensaio de CBA (do inglês: *cytokine bead array*) e (B) IFN-alfa avaliada por ELISA no sobrenadante das culturas de monócitos. Análises estatísticas foram realizadas aplicando o teste Mann-Whitney. A significância estatística entre os pares é indicada pela barra horizontal superior contendo os valores de p.

## **4.2. Caracterização do perfil de ativação de linfócitos T de pacientes infectados pelo DENV co-expressando CR associados à ativação ou a regulação do SC (CR3 (CD11b), CD46, CD55 e CD59) e impacto da ativação do SC na alteração da permeabilidade endotelial em modelo *in vitro*.**

---

*Neste capítulo serão descritos os resultados referentes ao artigo em submissão:*

*Complement Receptors expression on T lymphocytes and SC5b-9 serum levels in Dengue patients: a relationship between T cell activation, cytokine secretion and endothelial cells permeability. Marinho CF, Cipitelli, MC, da Silva, JBC, Paiva, IA, Faria NC, Torrentes-Carvalho A, Souza LJ, Cunha RV, Kubelka CF, Azeredo EL, de-Oliveira-Pinto LM.*

Os resultados demonstrados anteriormente abordam uma modulação importante da frequência de monócitos, principais células-alvo da infecção pelo DENV, expressando os CR. Nesta segunda parte do trabalho, será feita a avaliação da frequência de linfócitos T de pacientes expressando os CR.

### **4.2.1. Caracterização clínica e laboratorial da população de estudo.**

Durante a epidemia de 2013 em Campo Grande-MS e Campos dos Goytacazes-RJ foram coletadas 267 amostras de casos suspeitos de Dengue. Para este estudo foram incluídos apenas 35 pacientes, com diagnóstico laboratorial confirmado, e que estavam entre o 1º e o 12º dias de doença contados a partir do aparecimento do (s) primeiro (s) sinal/sintoma (s). Os pacientes foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS em 2009, em FD (n=19), FD com sinais de alarme FD/SA (n=15) e Grave (n=1) formando o grupo FD/SA/Grave (n=16). O grupo controle foi composto por 12 indivíduos saudáveis sem episódios de febre ou histórico de doenças nos últimos três meses. Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais estão sumarizados na tabela 4.7. Entre os pacientes com diferentes formas clínicas e controles, observamos um perfil similar em relação ao sexo e idade. Além disso, não vimos diferença em relação aos dias de doença entre os pacientes com diferentes formas clínicas. O diagnóstico virológico foi confirmado em 63% dos pacientes, pela detecção da proteína viral NS1. Pela técnica de RT-PCR foi detectado o sorotipo 4 do DENV em 26% dos pacientes. O diagnóstico sorológico foi realizado pela pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-Dengue. As manifestações clínicas mais frequentes nos

casos de FD foram febre, dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, náusea e vômito. Manifestações hemorrágicas não foram comuns nestes pacientes, com exceção de petéquias. Dentre os sinais de alarme detectados no grupo FD/SA/Grave estavam dor abdominal grave, vômitos constantes, sangramentos como epistaxe, gengivorragia, metrorragia, hematúria e melena. Apenas 19% dos pacientes FD/SA/Grave apresentaram extravasamento vascular pleural, pericárdio ou ascite. No único caso grave de Dengue foi observado hipotensão. O aumento da gravidade da doença entre os grupos estudados pode ser observado pelo aumento das transaminases hepáticas (AST e ALT) e pela queda na contagem de plaquetas nos pacientes FD/SA/Grave em comparação aos FD. Pacientes apresentaram menores contagens de leucócitos e linfócitos comparados aos controles saudáveis. Não detectamos diferenças significativas na contagem de monócitos entre pacientes e controles. Menores frequências de células T CD4 e T CD8 foram observadas em FS/SA/Grave e FD, respectivamente em comparação aos controles saudáveis (tabela 4.7). Foi observada 52% e 56% de infecções secundárias nos pacientes FD e FD/SA/Grave, respectivamente, confirmada pela detecção de IgG anti-DENV.

**Tabela 4.7: Perfil demográfico clínico e laboratorial dos pacientes.**

	Controle <sup>n=12</sup>	FD <sup>n=19</sup>	FD/SA/Grave <sup>n=16</sup>
<b>Sexo (F/M)</b>	9/3	9/8	9/6
<b>Idade<sup>a</sup></b>	29,0 ± 6,0	40,0 ± 18,0	48 ± 21,0
<b>Dias de Doença<sup>a,b</sup></b>	-	4,4 ± 2,8	5,4 ± 2,7
<b>DENV- sorotipo 4, n (%)<sup>c</sup></b>	-	7 (37)	2(12)
<b>DENV NS1, n(%)<sup>c</sup></b>	-	13 (68)	9 (56)
<b>anti-DENV- IgM n(%)<sup>c</sup></b>	-	9 (47)	12 (75)
<b>anti-DENV- IgG, n(%)<sup>c</sup></b>	-	10 (52)	9 (56)
<b>Extravasamento plasmático (%)<sup>d</sup></b>	-	0	27%
<b>Sangramento (%)<sup>e</sup></b>	-	0	33%
<b>Plaquetasx10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup><sup>a</sup></b>	267,4 ± 39,4	161,8 ± 49***	88,7 ± 70,2 <sup>&amp;&amp;,###</sup>
<b>AST U/L<sup>a</sup></b>	17,0 ± 4,2	47,3 ± 31,6*	224 ± 351,2 <sup>&amp;,#</sup>
<b>ALT U/L<sup>a</sup></b>	19,5 ± 5,0	64,4 ± 43,7	238,6 ± 386,6 <sup>#</sup>
<b>Leucócitos /mm<sup>3</sup><sup>a</sup></b>	6525,0 ± 1064,0	4605,0 ± 2476,0*	3461,0 ± 1457,0 <sup>###</sup>
<b>Monócitos /mm<sup>3</sup><sup>a</sup></b>	431,6 ± 174,9	433,9 ± 279,6	299,8 ± 316,2
<b>Linfócitos /mm<sup>3</sup><sup>a</sup></b>	1975,0 ± 425,7	1491,0 ± 903,6*	1252,0 ± 453,0 <sup>##</sup>
<b>Linfócitos T CD4 %<sup>a</sup></b>	28,4 ± 6,5	23,1 ± 11,9	19,0 ± 9,5 <sup>#</sup>
<b>Linfócitos T CD8 %<sup>a</sup></b>	18,3 ± 5,2	11,0 ± 4,7 **	13,7 ± 8,6

<sup>a</sup> Valores representados pela média ± desvio padrão;

<sup>b</sup> a partir do aparecimento dos primeiros sintomas.

<sup>c</sup> n (%) indica o número de pacientes e o percentual de positivos dentre o total.

<sup>d</sup> sinais extravasamento plasmático derrame pleural, pericárdico ou ascite.

<sup>e</sup> os mais observados foram: petéquias, gengivorragia, hematúria, epistaxe, metrorragia ou, melena. Teste estatístico: Mann-Whitney U, onde um símbolo representa p<0,05; dois símbolos P<0,001 e três símbolos representam P<0,0001.

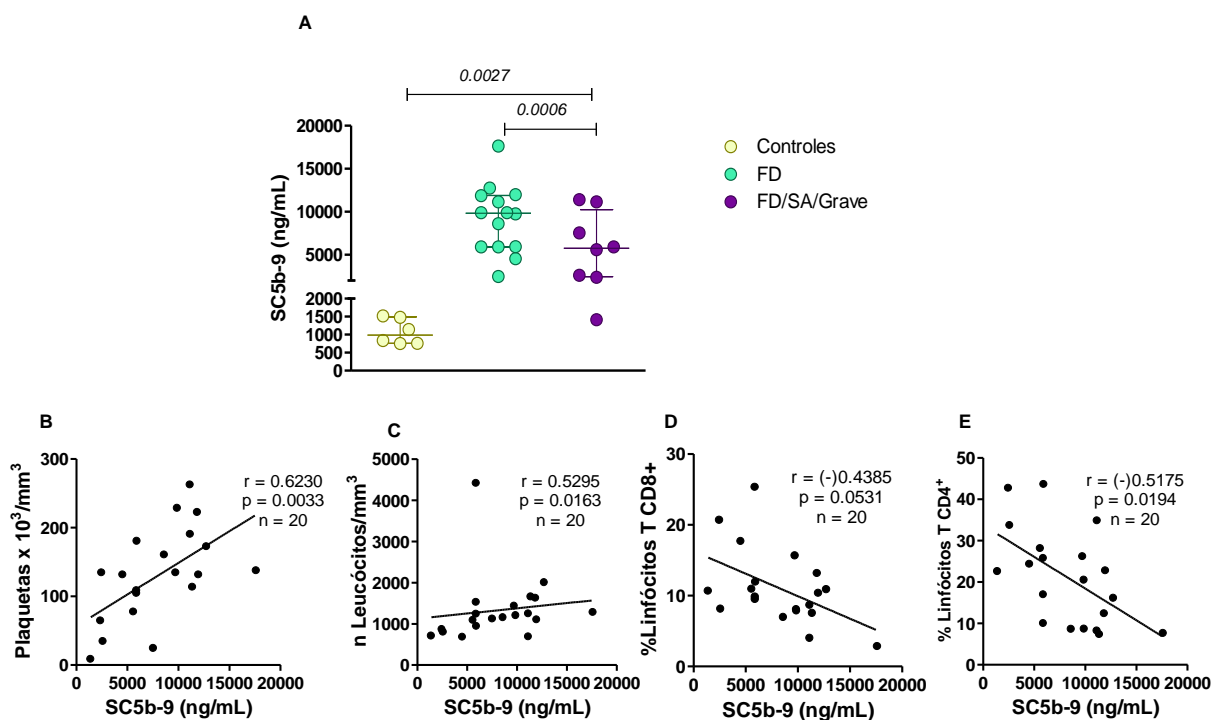
Os diferentes símbolos representam a diferença estatística entre: \* FD vs Controle, # FD/SA/Grave vs Controle e & FD/SA/Grave vs FD

#### **4.2.2. Elevados níveis séricos do produto de ativação do Sistema Complemento SC5b-9 na Dengue.**

A quantificação do SC5b-9 nestes pacientes foi realizada em amostras de soro (figura 4.8), diferente da quantificação realizada anteriormente em amostras de plasma (figura 4.2). De forma similar ao encontrado no plasma, pacientes infectados pelo DENV, independente da forma clínica, apresentaram maior quantidade de SC5b-9 no soro comparado aos controles saudáveis. No entanto, a dosagem plasmática dos

pacientes FD/SA e Graves da epidemia de 2010 pelos sorotipos DENV-2 e DENV-1 foi maior comparado ao grupo FD, entretanto não observamos diferenças entre pacientes FD e FD/SA/Grave oriundos da epidemia de 2013 pelo DENV-4.

Análises de correlação demonstraram associação direta dos níveis de SC5b-9 com a contagem de plaquetas ( $r = 0,623$ ;  $p = 0,003$ ) e com o número de leucócitos ( $r = 0,5295$ ;  $p = 0,0163$ ). Por outro lado, foi observada uma correlação inversa entre os níveis de SC5b-9 com a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ( $r = -0,5175$ ;  $p = 0,0194$ ) e T CD8<sup>+</sup> ( $r = -0,4385$ ;  $p = 0,0531$ ). Estas análises nos motivaram a investigar a expressão de CR associados à ativação ou regulação do SC estariam alteradas nos linfócitos T de pacientes.

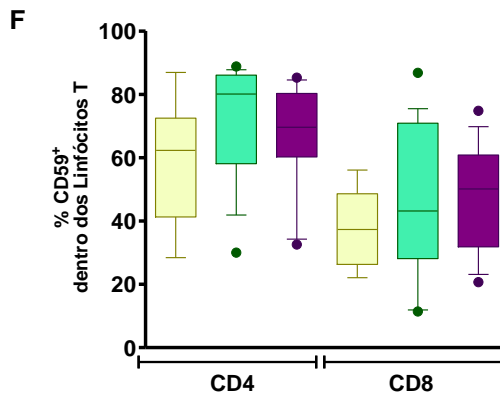
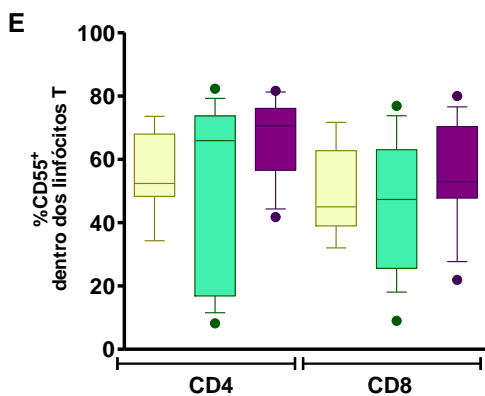
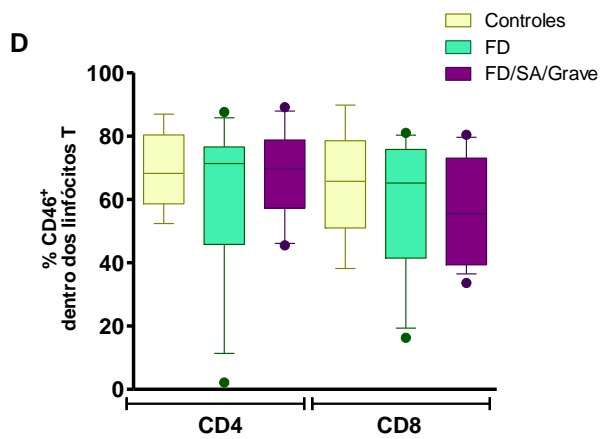
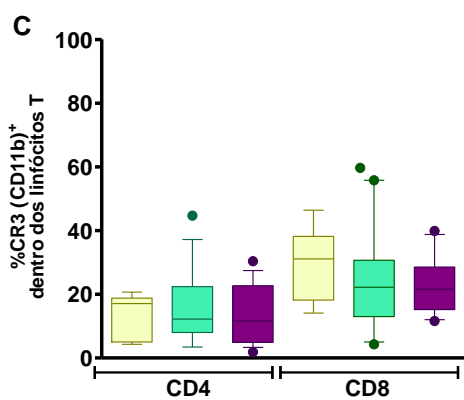
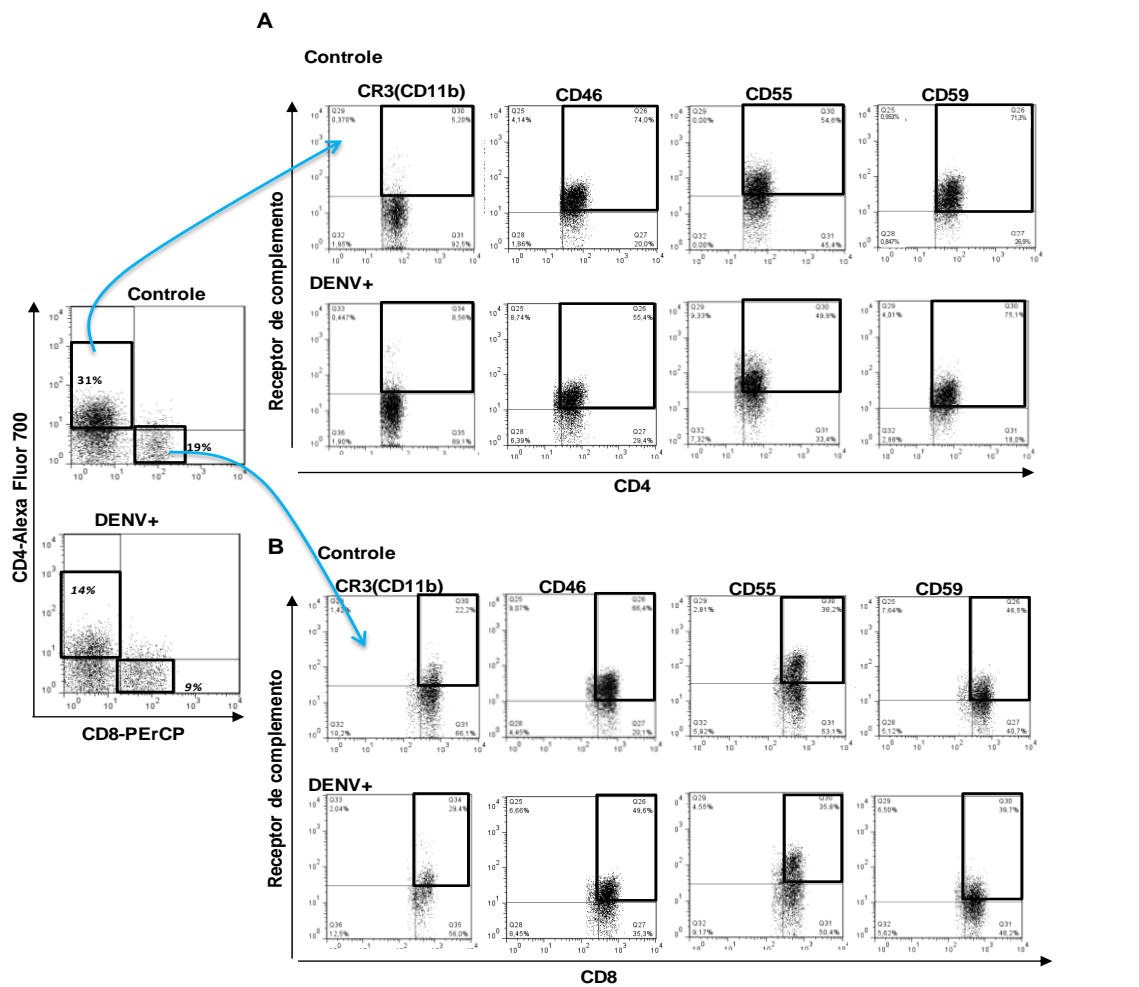


**Figura 4.8. Quantificação sérica do produto de ativação SC5b-9 do sistema complemento.** (A) A dosagem do complexo SC5b-9 foi realizada no soro de pacientes infectados pelo DENV4 e em controles saudáveis por ELISA. Cada ponto representa um indivíduo. As análises estatísticas foram realizadas pela aplicação do teste Mann-Whitney. Linhas horizontais representam as medianas de cada grupo enquanto que as verticais representam a variação interquartil (10-90%). A análise estatística foi feita utilizando o teste Mann-Whitney U. A estatística, entre os pares, quando houver, é indicada pela barra horizontal superior contendo os valores de p. Gráficos de correlações de Spearman entre os níveis de SC5b-9 e (B) plaquetas, (C) contagem de leucócitos, (D) linfócitos T CD8 e (E) linfócitos T CD4. Valores de r de Spearman, p e o número de pares comparados são indicados próximos os gráficos.

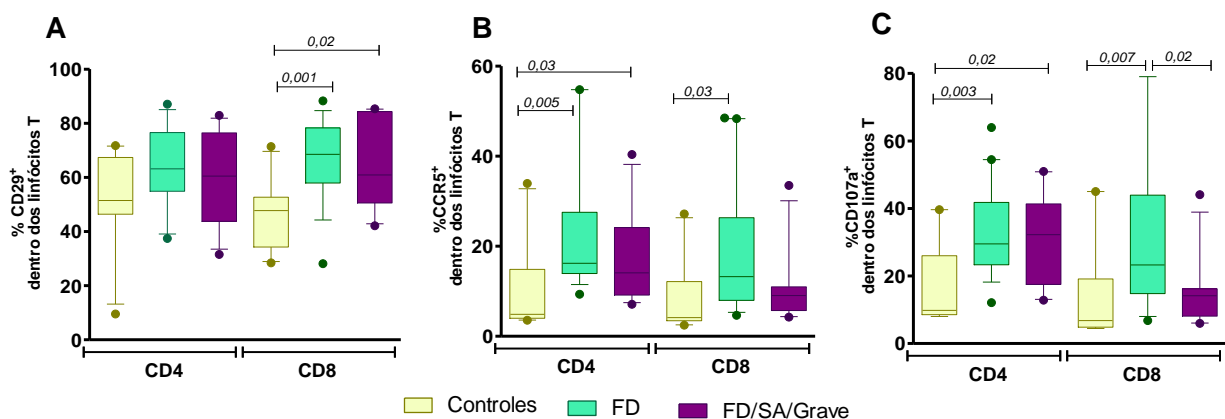


#### **4.2.3. Inalterada frequência de linfócitos T expressando CR3 (CD11b), CD46, CD55 e CD59, e aumento da frequência de linfócitos T coexpressando CR e marcadores de ativação em pacientes infectados pelo DENV.**

A avaliação da frequência de linfócitos T expressando de CR3(CD11b), CD46, CD55 e CD59 não revelou diferença significativa entre os grupos de pacientes com diferentes formas clínicas ou indivíduos saudáveis (figura 4.9C-F). Baseado em achados da literatura que demonstram o envolvimento de receptores de complemento na modulação da ativação de linfócitos T (259), foi investigado se estas células teriam um perfil efetor pela análise da coexpressão dos CR e marcadores de ativação, migração e citotoxicidade: CD29, CCR5 e CD107a. Inicialmente, a análise dos marcadores de ativação indicou aumento da frequência de linfócitos T CD8 expressando CD29 em pacientes comparado aos controles (figura 4.10A). Maior frequência de linfócitos T expressando CCR5 em pacientes FD e nas células TCD4 de FDSA/Grave quando comparados aos controles saudáveis (figura 4.10B). De forma similar aos achados de CCR5, as maiores frequências de linfócitos T expressando CD107a foram observadas nos linfócitos T de pacientes FD e nos linfócitos T CD4 de pacientes FDSA/Grave em relação aos controles. Além disso, foi notada menor frequência de linfócitos T CD8 expressando CD107a em pacientes FD/SA/Grave comparado aos pacientes FD (figura 4.10C).



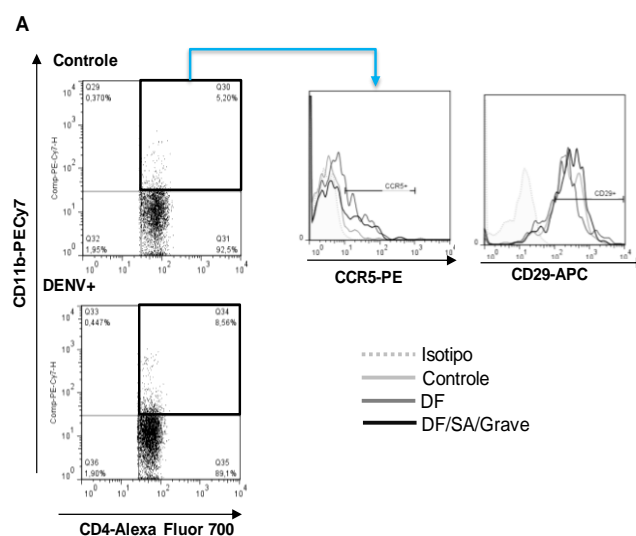
**Figura 4.9: Frequência de linfócitos T expressando CR3 (CD11b), CD46, CD55 e CD59 em pacientes infectados pelo DENV-4.** A expressão de receptores do complemento na superfície de linfócitos foi investigada pela técnica de citometria de fluxo em controles saudáveis e pacientes infectados pelo DENV-4. As subpopulações de linfócitos T foram divididas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4-Alexafluor700 e anti-CD8-PErCP. Dot plots representativos demonstram a expressão de receptores de complemento dentro dos linfócitos T CD4 (A) e T CD8 (B) em um indivíduo controle e um paciente infectado pelo DENV (DENV+). As regiões positivas para a expressão de receptores de complemento foram definidas de acordo com controles isotípicos (não demonstrado). (C-F) Representação gráfica da frequência da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando receptores de complemento em controles saudáveis (amarelo) e pacientes FD (verde), FD/SA/Grave (roxo). Para a análise estatística foi aplicado o teste Mann-Whitney U. Linhas horizontais representam as medianas de cada grupo enquanto que as verticais representam a variação interquartil (10-90%).

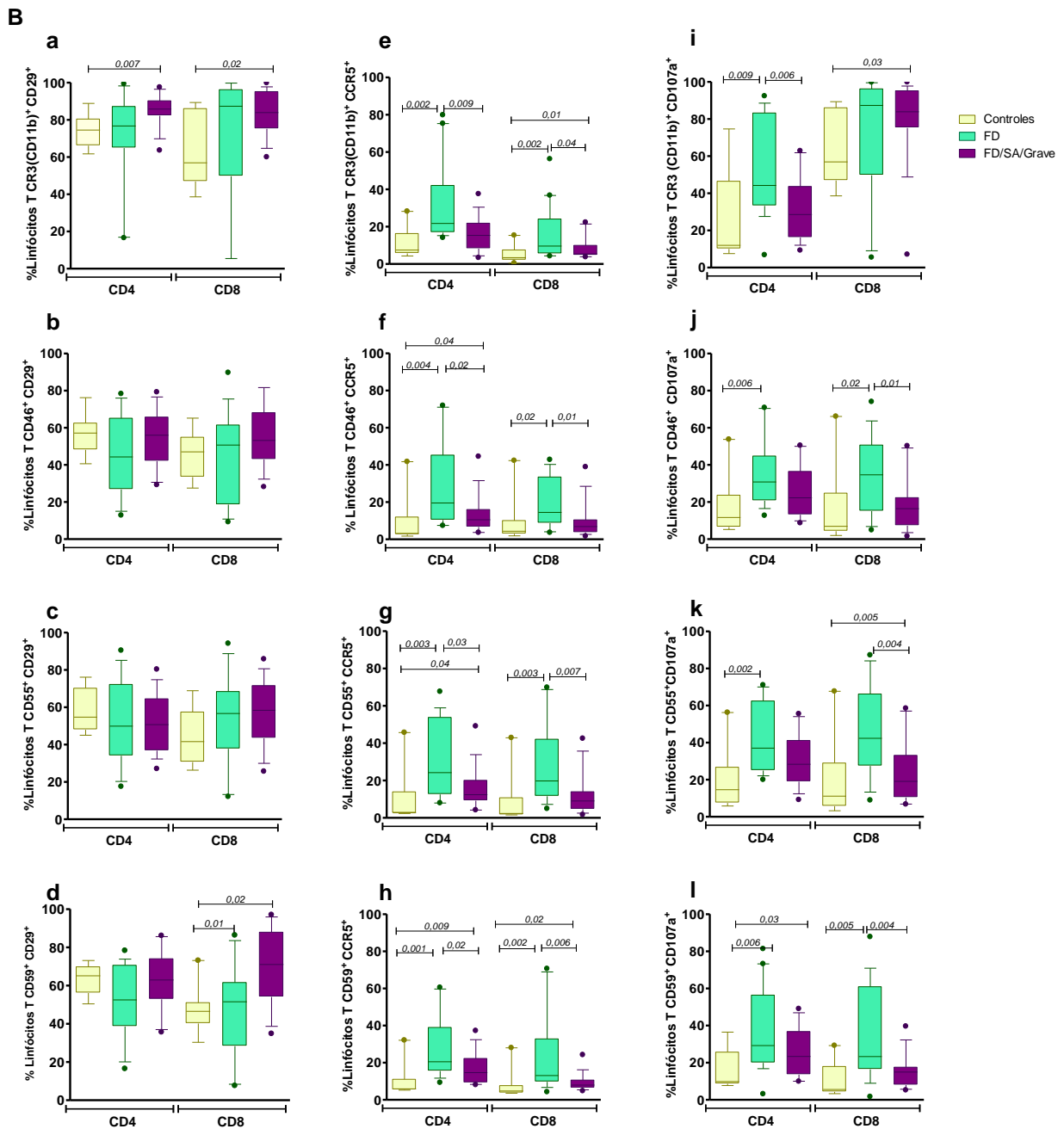


**Figura 4.10: Frequência de linfócitos T expressando marcadores de ativação CD29, CCR5 e CD107a em pacientes infectados pelo DENV-4.** A expressão moléculas associadas à ativação celular na superfície de linfócitos foi investigada por citometria de fluxo em controles saudáveis e pacientes infectados pelo DENV-4 dentro das populações de linfócitos T CD4-APCCy7<sup>+</sup> ou CD8-PECy7<sup>+</sup>. Gráficos da frequência da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando (A) CD29, (B) CCR5 e (C) CD107a em controles saudáveis (amarelo) e pacientes FD (verde), FDSA/Grave (roxo). Para a análise estatística foi aplicado o teste Mann-Whitney U. Linhas horizontais representam as medianas de cada grupo enquanto que as verticais representam a variação interquartil (10-90%). A significância estatística entre os pares, quando existir, é indicada pela barra horizontal superior contendo os valores de p.

Apesar da infecção natural pelo DENV-4 não modular a expressão de receptores de complemento na superfície de linfócitos T, estas células apresentam um fenótipo ativado. Sendo assim, a fim de caracterizar estas células quanto a ativação e um

possível papel efetor com associado à expressão de CR, foi investigado o perfil de ativação de linfócitos T coexpressando CD11b, CD46, CD55 e CD59. Neste sentido, foi observado nos linfócitos T CD4 CD11b+ e CD8 CD11b+ elevação na expressão de CD29 nos pacientes FD/SA/Grave comparado aos controles (figuras 4.11a). Ainda, aumento da expressão de CD29 nos linfócitos TCD8 CD59+ foi observada em pacientes FD e FD/SA/Grave comparado aos controles (figura 4.11d). A maior expressão de CCR5 dentro da população de linfócitos T CD4 e CD8 expressando CR3 (CD11b), CD46, CD55 e CD59 foi visto em pacientes FD comparado aos FD/SA/Grave e controles (figuras 4.11e-h). Particularmente, a expressão de CCR5 foi maior nos linfócitos T CD8 CD11b+ e TCD8 CD59+ nos pacientes FD/SA/Grave comparado aos controles (figuras 4.11 e,h). Bem como nos linfócitos T CD4 CD46+, T CD4CD55+ e T CD4CD59+ em pacientes FD/SA/Grave comparado aos controles (figuras 4.11 f-h). Finalmente, com relação ao CD107a, as maiores frequências foram observadas em linfócitos T CD4 expressando (CR3)CD11b+, CD46+, CD55+ e CD59+ e nos linfócitos T CD8+ CD46+ de pacientes FD comparado aos controles (figura 4.11 i-l). No caso dos linfócitos T CD8 o aumento de CD107a foi observado naqueles expressando CD11b+ e CD55+ nos pacientes FD/SA/Grave comparado aos controles (figuras 4.11 i,k), e nos linfócitos T CD8 expressando CD46+ e CD59+ em pacientes FD em relação aos controles (figuras 4.9 j,l). Esses dados sugerem que linfócitos T que expressam CR de pacientes infectados pelo DENV apresentam um perfil ativado, sendo mais evidente no grupo de pacientes mais brandos. Contudo, no geral a frequência de linfócitos T CR+ co-expressando CCR5, CD29 e CD107a parece refletir a expressão dos marcadores de ativação nestas células.





**Figura 4.11: Frequência de linfócitos T coexpressando os marcadores de ativação e CR em pacientes infectados pelo DENV-4 (A)** Modelo representativo da estratégia de regiões a partir de gráficos de citometria de fluxo adotada para a definição das populações expressando marcadores de ativação. Dot plots representativos da subpopulação linfócitos T CD4 CR3 (CD11b)<sup>+</sup> em um controle saudável e um paciente infectado pelo DENV, os histogramas revelam a expressão de CD29 e CCR5 dentro dos linfócitos T CD4 CR3(CD11b)<sup>+</sup> em um controle (cinza claro), pacientes DF (cinza médio) e DF/SA/Grave (preto) e o isotipo controle (linha pontilhada preenchida). A mesma estratégia foi usada para os demais receptores avaliados. **(B)** Gráficos a expressão do marcador de ativação CD29 dentro dos linfócitos T [CR3 (CD11b)<sup>+</sup> (a), CD46<sup>+</sup> (b), CD55<sup>+</sup>(c), CD59<sup>+</sup>(d)]; o receptor de quimiocina CCR5 dentro dos linfócitos T [CR3 (CD11b)<sup>+</sup> (e), CD46<sup>+</sup> (f), CD55<sup>+</sup>(g), CD59<sup>+</sup>(h)] e o marcador de citotoxicidade CD107a dentro dos linfócitos T [CR3 (CD11b)<sup>+</sup> (i), CD46<sup>+</sup> (j), CD55<sup>+</sup>(k), CD59<sup>+</sup>(l)] de em controles saudáveis (amarelo) e pacientes FD (verde), FD/SA/Grave (roxo). Para a análise estatísticas foi aplicado o teste Mann-Whitney U. Linhas horizontais

representam as medianas de cada grupo enquanto que as verticais representam a variação interquartil (10-90%). A significância estatística entre os pares, quando houver, é indicada pela barra horizontal superior contendo os valores de p.

#### 4.2.4. Níveis séricos de SC5b-9 e frequência de linfócitos T expressando os CR correlacionados com citocinas séricas em pacientes.

Nós dosamos as quantidades séricas de TNF-alfa, IL-1beta, IFN-gama, IL-10 e IL-8, citocinas extensamente descritas na literatura quanto ao seu papel na ativação de uma resposta imune antiviral, embora na Dengue, em particular, a produção exacerbada destas moléculas contribuiriam ao extravasamento plasmático, observado principalmente nas formas graves da doença. Todos os mediadores solúveis, com exceção do IL-1beta, estavam aumentados no soro de pacientes, independente da forma clínica, comparado a controles saudáveis (dados no Anexo 1). A partir desses dados, análises de correlação demonstraram significância direta entre os níveis de SC5b-9 e de TNF-alfa, IL-1beta, IFN-gama, IL-8, porém inversa com IL-10. Também vimos correlação direta entre a frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 expressando CR3(CD11b) e IL-1beta e inversa entre TCD4 CR3(CD11b) com IL-10. Por fim, linfócitos T CD4 e T CD8 expressando CD59 foram correlacionados diretamente com IFN-gama (tabela 4.8). Não observamos correlação com as citocinas IL-6, IL-10, CXCL10/IP-10 e CCL2/MCP-1 ou com a frequência de linfócitos T expressando CD46 ou CD55 (dado não mostrado).

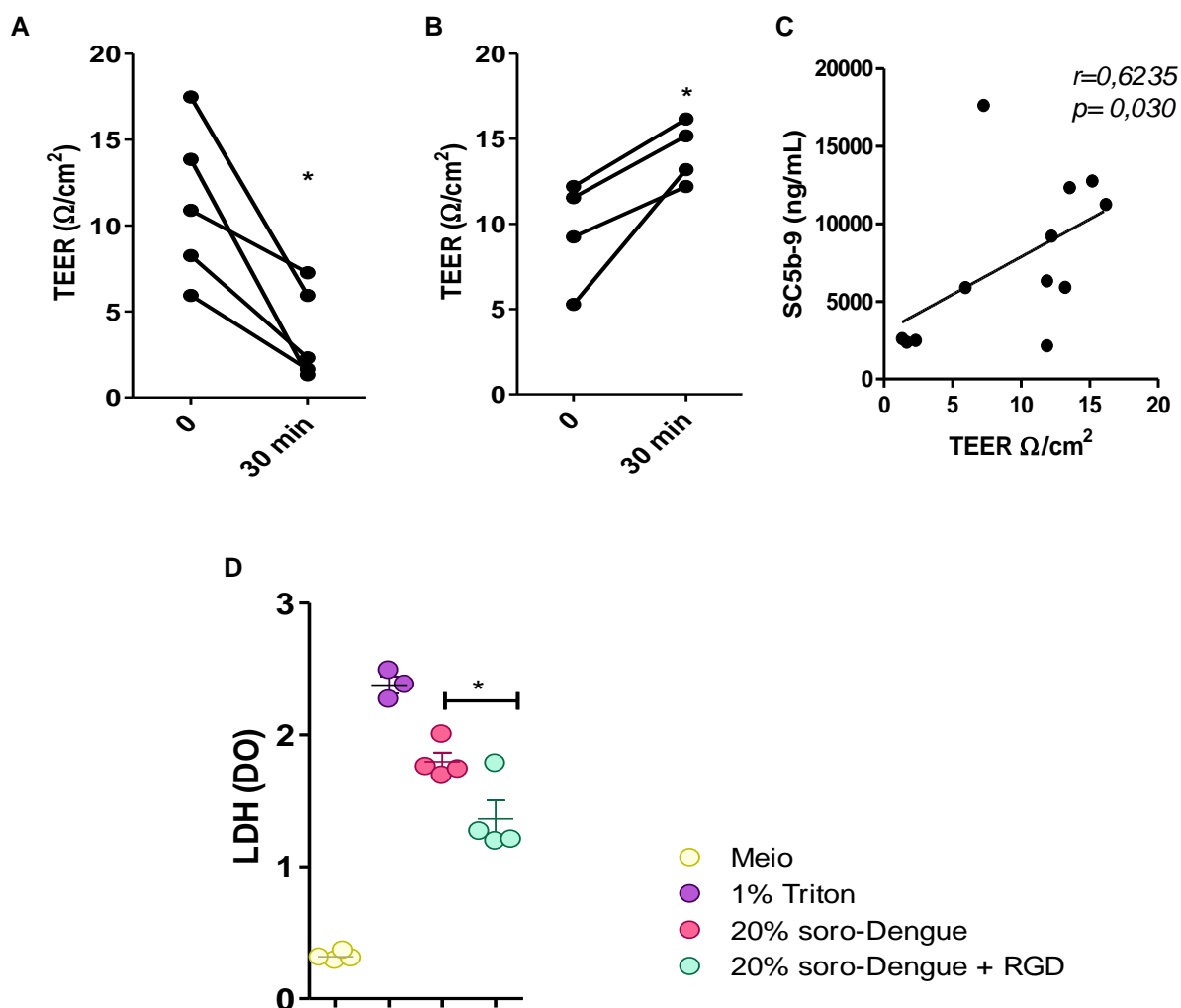
**Tabela 4.8: Correlação entre níveis de SC5b-9 séricos e frequência de linfócitos T expressando os CR com citocinas em pacientes.**

	TNF-alfa	IL-1beta	IFN-gama	IL-10	IL-8
SC5b-9	0,495 <sup>n=20</sup> p = 0,03	0,692 <sup>n=20</sup> p = 0,0007	0,627 <sup>n=11</sup> p = 0,04	-0,496 <sup>n=20</sup> p = 0,03	0,606 <sup>n=20</sup> p = 0,005
CD11b <sup>+</sup> nas CD4 <sup>+</sup>	ns <sup>n=28</sup>	0,536 <sup>n=20</sup> p = 0,02	ns <sup>n=12</sup>	-0,575 <sup>n=20</sup> p = 0,0080	ns <sup>n=28</sup>
CD11b <sup>+</sup> nas CD8 <sup>+</sup>	ns <sup>n=28</sup>	0,498 <sup>n=20</sup> p = 0,03	ns <sup>n=12</sup>	ns <sup>n=20</sup>	ns <sup>n=28</sup>
CD59 <sup>+</sup> nas CD4 <sup>+</sup>	ns <sup>n=27</sup>	ns <sup>n=20</sup>	0,671 <sup>n=12</sup> p = 0,02	ns <sup>n=20</sup>	ns <sup>n=28</sup>
CD59 <sup>+</sup> nas CD8 <sup>+</sup>	ns <sup>n=27</sup>	ns <sup>n=20</sup>	0,645 <sup>n=12</sup> p = 0,02	ns <sup>n=20</sup>	ns <sup>n=28</sup>

Correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism versão 5. Valores de p (two-tailed) foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ , *ns* significa correlação não significativa, n representa o número de pares analisados.

#### **4.2.5 Correlação entre ativação do sistema complemento, através da medida do SC5b-9, e alteração da permeabilidade vascular.**

Uma vez que citocinas envolvidas na imunopatogênese da Dengue, foram correlacionadas com os níveis de SC5b-9, nós selecionamos o soro de 11 pacientes com Dengue (DF n=6 e FD/SA/Grave n=5 com 2 a 18 dias após o aparecimento dos sintomas) para avaliar o efeito destes soros na resistência elétrica transendotelial (TEER) da monocamada de células endoteliais HMVEC-d. Como demonstrado nas figuras 4.12A-B, a alteração TEER da monocamada de HMVEC foi observada no tempo de 30min de incubação com 20% do soro de pacientes, comparado ao tempo 0 min, antes da adição do soro. Dos 11 pacientes, cinco apresentaram diminuição (figura 4.12.A) e quatro pacientes mostraram aumento significativos na TEER (figura 4.12.B) e em dois pacientes não apresentaram alterações (dado não mostrado). O SC5b-9 interage com células endoteliais através do receptor de vitronectina, bloqueando esta interação pelo uso do peptídeo RGD (Arg-Gly-Asp). Observamos que o tratamento prévio da monocamada das HMVEC com o peptídeo RGD comparada as não tratadas, resultou na menor liberação de LDH por CEs tratadas com o soro dos pacientes. Sugerindo que a adição de soro que promoveria a liberação de LDH sem exercer efeitos na barreira endotelial (figura 4.12 D). Nós não observamos correlações entre os níveis séricos de TNF-alfa, IL-1beta, IFN-gama, IL-10 ou de IL-8 na TEER. Porém, os níveis de SC5b-9 foram correlacionados positivamente com a resistência transendotelial (figura 4.12 C). Curiosamente, sugerindo que o SC5b-9 poderia estar envolvido na manutenção da integridade das CEs.



**Figura 4.12: Medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) em HMVEC na presença de soro de pacientes:** Gráficos da Medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) em HMVEC-d incubadas com 20% de soro de pacientes-DENV em meio EGM-2mv sem SFB, por 30 min. Em **(A)** soro de pacientes que promoveram diminuição na TEER e em **(B)** soro de pacientes que promoveram aumento na TEER. Em **(C)**, análise de correlação entre os níveis séricos de SC5b-9 e a TEER medida após 30 min de incubação com soro de pacientes. O valor do r de Spearman, p e o número de pares comparados são indicados próximos ao gráfico. **(D)** Diagrama mostrado a densidade óptica do ensaio de LDH em HMVEC-d incubadas em meio sem soro (círculos amarelo), 1% de triton X-100 (círculos roxo) e 20% soro de pacientes-DENV pré-tratadas (círculos verde) ou não (círculos rosa) com RGD (10µg/mL). A média e desvio padrão de **(D)** são demonstrados no gráfico. O teste t não paramétrico foi utilizado para avaliar as diferenças estatísticas nas diferentes condições. Valore de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.



### 4.3. Clivagem de C3 na presença do DENV-2 e de componentes da via alternativa do sistema complemento.

---

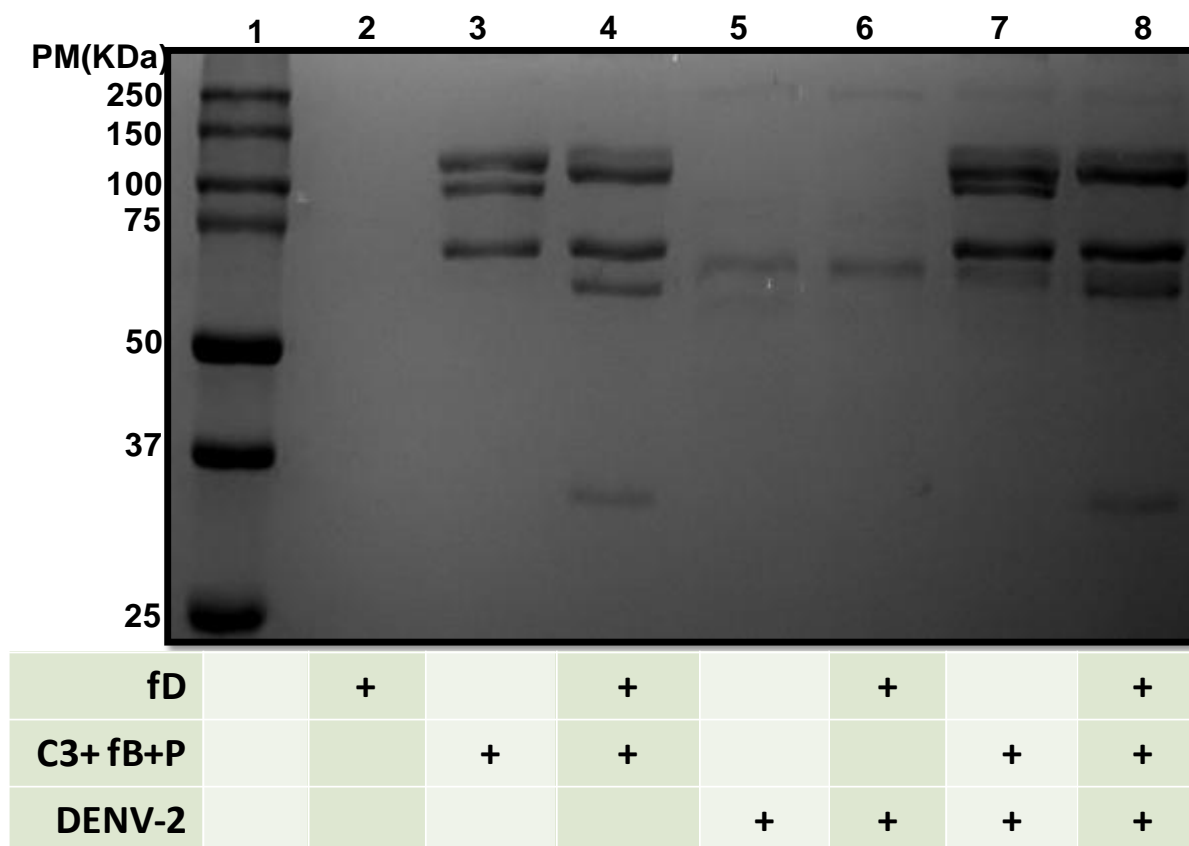
*Neste capítulo serão descritos os resultados obtidos durante Estágio de Doutorado Sanduíche no Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, sob a supervisão do Dr. Ernesto Marques:*

Na literatura é bem descrito que o CR3 (CD11b) medeia a fagocitose de microrganismos opsonizados por fragmentos de C3, como o iC3b e, em menor grau, C3b. Na seção 4.1 deste estudo demonstramos que o bloqueio prévio do CR3 (CD11b) resulta na diminuição da infecção pelo DENV-2 em monócitos humanos. Nesta parte dos nossos resultados, investigamos a interação do DENV com as opsoninas C3b e iC3b, buscando avaliar se a infecção do DENV via CR3 seria influenciada por fragmentos de C3 gerados após sua ativação. Para isto foi padronizado o ensaio de opsonização pelo complemento utilizando componentes purificados (fB, fD, C3 e properdina) responsáveis pela formação e estabilização da C3 convertase na via alternativa (C3bBb). Uma vez formada, a C3 convertase medeia a clivagem de C3 resultando na liberação da anafilatoxina C3a e da opsonina C3b, capaz de se ligar covalentemente a superfície da membrana de uma célula-alvo. O DENV-2 foi utilizado como alvo para a opsonização com C3b (DENV-2/C3b) e iC3b (DENV-2/iC3b).

A ativação do SC e opsonização do DENV- 2 com C3b foi verificado em gel SDS-PAGE. Conforme observado na figura 4.14 abaixo. Na coluna 2 não foi observada a banda de 24 KDa referente ao fD, provavelmente devido a baixa quantidade deste fator utilizada na reação. Na coluna 3, podemos observar as bandas referentes as proteínas C3 e fB (~97 KDa), sem o fD, indicando que não houve ativação do SC. O perfil eletroforético da molécula de C3 é caracterizado pela presença de duas cadeias: alfa (C3 $\alpha$ ') e beta (C3 $\beta$ ') de aproximadamente 110-115 KDa e 75 KDa, respectivamente. Na coluna 4, a adição do fD cliva o fB nos fragmentos Ba (~33 KDa) e Bb (~60 KDa) que unido ao C3b, gera a C3 convertase (C3bBb). Pela ação da C3 convertase há a clivagem da cadeia alfa de C3 originando a cadeia alfa de C3b (~104 KDa). Note que há diminuição da banda da cadeia alfa de C3 $\alpha$ ' (~110-115 KDa) e aparecimento da cadeia alfa de C3b (~104 KDa).

O DENV-2, visualizado pela proteína de envelope (~ 53KDa), sozinho ou na presença apenas de fD é observado nas colunas 5 e 6 da figura 4.14, respectivamente. Surpreendentemente, na coluna 7 a presença do DENV-2 resultou em clivagem da

cadeia alfa de C3 (C3 $\alpha$ '-linha 1), gerando C3b imediatamente abaixo (linha 2), mesmo na ausência de fD (figura 4.14) e ocorreu independente da formação da C3 convertase, uma vez que não houve consumo aparente de fB (linha 3, coluna 7). Por fim, na coluna 8 a presença de DENV-2, C3, fB e fD levou a clivagem da C3 $\alpha$ ' (~ 115KDa) originando a cadeia alfa de C3b (~104KDa) com consumo de fB, gerando os fragmentos Bb (~60 KDa) e Ba (~ 33 KDa) (figura 4.14 - coluna 8) sugerindo formação da C3 convertase. Contudo, a cadeia de alto peso molecular relacionada à formação do DENV-2 opsonizado por C3b não pôde ser identificada no gel, como observado nos ensaios de padronização descrito nos materiais e métodos.



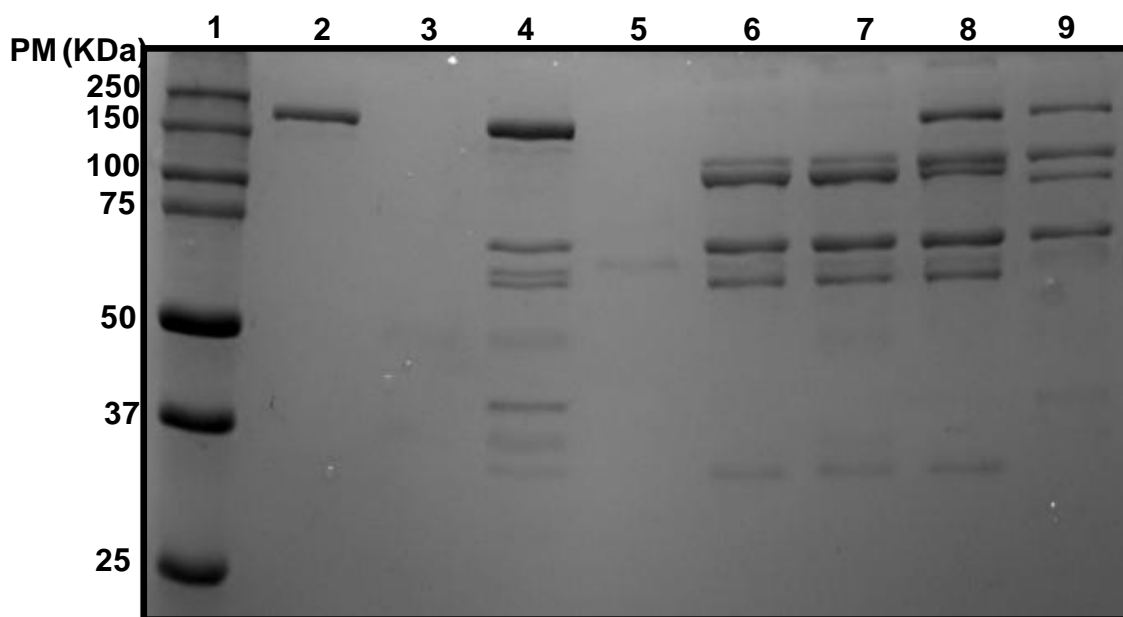
**Figura 4.13: Padronização da reação de ativação da via alternativa do SC na fase fluída com geração de C3b.** Ativação do sistema complemento *in vitro* pela adição de C3 (800µg/mL), fB (200µg/mL), fD (1µg/mL), properdina (P) (15µg/mL) e de Mg<sup>2+</sup> (0,5mM) por 30 minutos a 37°C na presença ou não DENV-2 (5µg) num volume final de todas as condições foi ajustado para 25µL. E o mesmo volume foi aplicado no gel para cada condição indicada nas colunas **(1)** controle de peso molecular (faixa de peso molecular: 25-250KDa); **(2)** apenas fD (24KDa); **(3)** adição C3+ fB+ P (53KDa) [bandas visíveis: C3 (C3α'= 115KDa e C3β'=75KDa), fB (97KDa)]; **(4)** adição de fD +C3+ fB+ P [bandas visíveis: C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3bα'~110KDa), fBb (~60KDa)e fBa (~33KDa)]; **(5)** DENV-2 (Envelope ~ 54KDa); **(6)** adição de fD + DENV-2; **(7)** adição de C3+ fB+ P + DENV-2 [bandas visíveis C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fB (97KDa) e DENV-2 (Envelope ~ 54KDa)] e **(8)** adição de fD+ C3+ fB+ P + DENV-2 [bandas visíveis C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fBb (~60KDa), fBa (~33KDa)]. Figura representativa de 3 experimentos independentes.

Uma vez que a fagocitose mediada por CR3 é principalmente mediada pelo reconhecimento de iC3b, o próximo passo foi gerar DENV-2 opsonizado com fragmentos de iC3b, para isto foi adicionado a reação os reguladores purificados do complemento fator I (fI) e fator H (fH). A figura 4.15 demonstra o perfil da eletroforese em gel de SDS dos fatores do complemento após a ativação *in vitro* na presença dos fI e fH. A coluna 1 mostra o controle de peso molecular, composto proteínas na faixa de 25 até 250KDa. Na coluna 2, foi aplicado o fH exposto as mesmas condições de

reação, visualizado pela banda 155KDa (figura 4.15 coluna 2). O mesmo foi feito para o fl (figura 4.13 coluna 3) entretanto, nenhuma das duas cadeias do fl (50KDa ou 38KDa) foram visualizados no gel, provavelmente devido a baixa quantidade de fD utilizado na reação.

Na coluna 4, o perfil da eletroforese dos fatores de complemento C3, fB, fD, P na presença dos reguladores fl e fH, é caracterizado pelo consumo completo de C3 $\alpha'$  e aparecimento dos produtos de degradação de C3b. Tendo como base apenas os tamanhos moleculares dos produtos finais da degradação de C3, é possível supor que os fragmentos de aproximadamente 67 e 45 KDa corresponderiam as cadeias de iC3b. O fragmento de 40KDa corresponderia ao C3dg, enquanto o de 35KDa ao C3d (figura 4.15 coluna 4). Por outro lado, a adição de fl ou fH isoladamente não resultou na geração dos produtos finais de degradação de C3, figura 4.15 coluna 7 e 8 respectivamente.

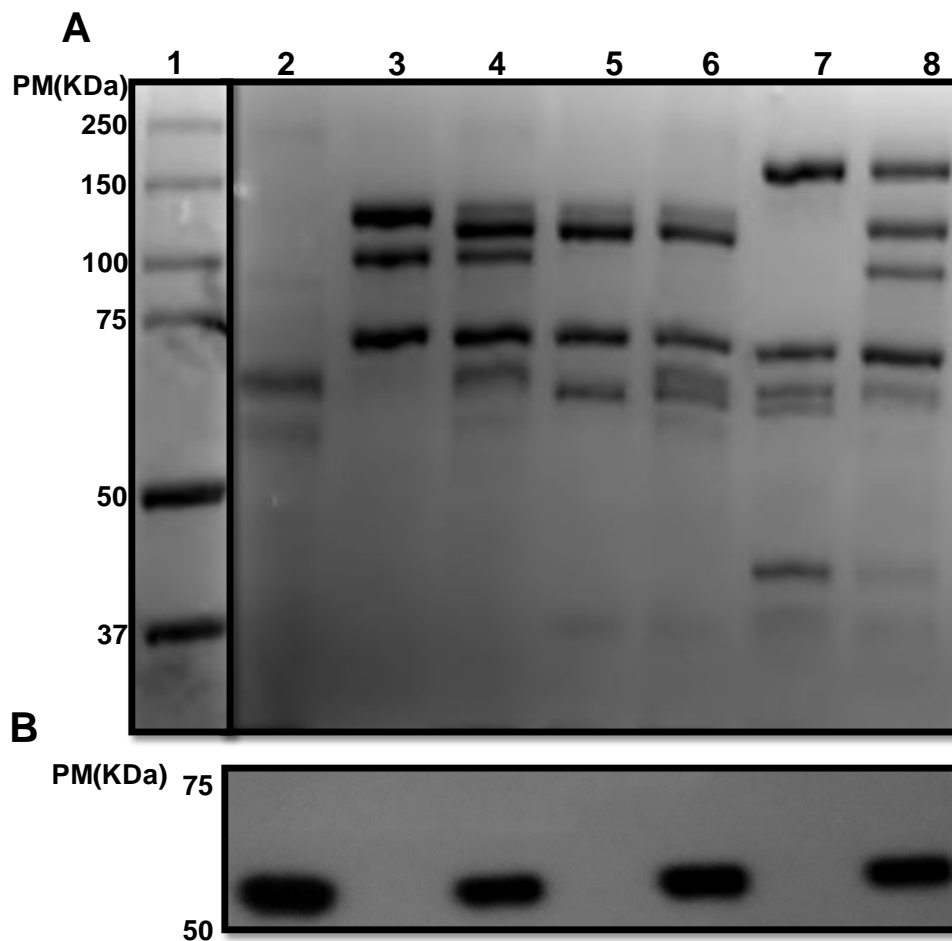
Na coluna 5 é demonstrado a banda correspondente a proteína de envelope do DENV. Como o observado anteriormente (figura 4.14 coluna 8) a clivagem da C3 $\alpha'$ , gerando C3b, ocorre na presença do DENV-2 e dos componentes do SC (C3, fD, fB e P) (figura 4.15 coluna 6). De maneira interessante, a presença do DENV-2 e dos reguladores fl e fH não resultou na completa degradação da cadeia de C3 $\alpha'$  (figura 4.15 linha 9), nem na geração evidente de C3b (~104KDa) ou dos produtos de degradação iC3b, C3dg, C3d, como observado na ausência do vírus (figura 4.15 coluna 4). Além disso, a presença do DENV-2 e reguladores fl e fH levaram a um menor consumo do fB (~97KDa) e menor geração de Ba (~33KDa), em comparação a coluna 4, sugerindo menor formação da C3 convertase.



<b>fH</b>		+		+				+	+
<b>fI</b>			+	+			+		+
<b>C3+ fB+fD+P</b>				+		+	+	+	+
<b>DENV-2</b>					+	+	+	+	+

**Figura 4.14: Padronização da reação de ativação da via alternativa do SC na fase fluída com geração de iC3b:** Ativação do sistema complemento *in vitro* pela adição de C3 (800µg/mL), fB (200µg/mL), fD (1µg/mL), properdina (P) (15µg/mL), Mg<sup>2+</sup> (0,5mM), fI (54µg/mL) e fH (340µg/mL) por 15 minutos a 37°C na presença ou não DENV-2 (5µg) num volume final de todas as condições foi ajustado para 30µL. O mesmo volume foi aplicado no gel para cada condição indicada nas colunas **(1)** controle de peso molecular (faixa de peso molecular: 25-250KDa); **(2)** apenas fH (155KDa) ou **(3)** fI (duas cadeias 50Kda e 38KDa); **(4)** C3+ fB + P (53KDa)+ fD+ fI e fH [bandas visíveis: fH (~155KDa), C3β'(~75KDa), iC3b (~67KDa e ~45KDa), C3dg (~40KDa), C3d (~35KDa), fBb (~60KDa) e fBa(~33KDa)]. **(5)** DENV-2 (Envelope ~ 54KDa); **(6)** adição de fD+ C3+ fB+ P + DENV-2 [bandas visíveis C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fBb (~60KDa), fBa (~33KDa), DENV-2 (Envelope ~ 54KDa)]; **(7)** adição de fD+ C3+ fB+ P + fI+ DENV-2 [bandas visíveis C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fBb (~60KDa), fBa (~33KDa), DENV-2 (Envelope ~ 54KDa)]; **(8)** adição de fD+ C3+ fB+ P + fH+ DENV-2 [bandas visíveis fH(~115 KDa), C3 (C3α'~115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fBb (~60KDa), fBa (~33KDa), DENV-2 (Envelope ~ 54KDa)]; e **(9)** adição de fD+ C3+ fB+ P + fH+ fI + DENV-2 [bandas visíveis fH (~115 KDa), C3 (C3α'~115KDa e C3β'~75KDa), fB (~ 97KDa) DENV-2 (Envelope ~ 54KDa)]. Figura representativa de 3 experimentos independentes.

Devido ao fato de que a banda de alto peso molecular, que estaria associada ao DENV-2 opsonizado com fragmentos de C3 não ter sido observada nos géis anteriores, uma nova reação foi realizada com um gel menos concentrado (8%SDS). O perfil eletroforético das proteínas do DENV-2 é demonstrado na coluna 2 da figura 4.16A. Na coluna 3, é observado o perfil das cadeias de C3, alfa (~115KDa) e beta (~75KDa), e do fB (~97KDa). A inclusão do DENV-2 neste sistema (coluna 4A) resulta na clivagem da cadeia alfa de C3 sem consumo do fB gerando a cadeia alfa de C3b (~104KDa). Por outro lado, a inclusão do fD na reação contendo C3, fB e P (coluna 5A) resulta na clivagem da cadeia alfa de C3 com consumo de fB. O mesmo perfil é observado na reação de C3, fB, fD e P na presença do DENV-2 (coluna 6A). O total consumo da cadeia alfa de C3 é observado na presença dos reguladores fI e fH (coluna 7A). No entanto a presença do DENV-2, aparentemente resultou em menor consumo da cadeia alfa de C3 e do fB (coluna 8A). Nem o gel corado pelo Comassie blue e nem o Western blot para o DENV, demonstrado na figura 4.16A e B, revelaram as bandas de alto peso molecular que corresponderiam ao DENV-2 opsonizado, contudo na presença de proteínas do SC a banda relativa ao DENV-2 parece estar diminuída (coluna 4B, 6B e 8B) comparada a banda do DENV-2 sozinho (coluna 2B). Esses dados sugerem que a possível opsonização DENV-2 com componentes do C3 diminuiria a banda da proteína E do DENV. Entretanto, não foram realizadas análises quantitativas nessas bandas. Apesar de não ter sido observada a banda de alto peso molecular correspondente ao DENV-2/C3b ou DENV-2/iC3b, esses resultados indicam que DENV-2 regularia a geração da C3 convertase e geração dos fragmentos de C3b.



<b>fH</b>							+	+
<b>fI</b>							+	+
<b>fD</b>					+	+	+	+
<b>C3+ fB+ P</b>			+	+	+	+	+	+
<b>DENV-2</b>		+		+		+		+

**Figura 4.15 Padronização da reação de ativação da via alternativa do SC na fase fluída com geração de C3b e iC3b:** A reação de ativação do complemento in vitro para a geração de fragmentos de iC3b foi realizada pela adição de C3 (0.8µg/µL), fB (200µg/mL), fD (1µg/mL), properdina (P) (15µg/mL) fl (54µg/mL), fH (340µg/mL) e 0.5mM de Mg<sup>2+</sup> por 15 minutos a 37°C na presença ou não DENV-2 (5 µg). As proteínas **(A)** foram coradas pelo Coomassie blue ou **(B)** transferidas para uma membrana de PDVF para western blot do DENV-2. Nas colunas em A tem-se **(1)** controle de peso molecular (faixa de peso molecular: 37-250KDa); **(2)** DENV-2 (Envelope ~ 54KDa); **(3)** adição de C3+ fB+ P + DENV-2 [bandas visíveis C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fB (97KDa) e DENV-2 (Envelope ~ 54KDa)]; **(4)** adição de fD+ C3+ fB+ P + DENV-2 [bandas visíveis C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fBb (~60KDa), fBa (~33KDa)]; **(5)** adição de fD +C3+ fB+ P [bandas visíveis: C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fBb (~60KDa) e fBa (~33KDa)]; **(6)** adição de fD+ C3+ fB+ P + DENV-2 [bandas visíveis C3 (C3α'~ 115KDa e C3β'~75KDa), C3b (C3b~104KDa), fBb (~60KDa), fBa (~33KDa)]; **(7)** C3+ fB + P (53KDa)+ fD+ fl e fH [bandas visíveis: fH (~155KDa), C3β'(~75KDa), iC3b (~67KDa e ~45KDa), C3dg (~40KDa), C3d (~35KDa), fBb (~60KDa) e fBa(~33KDa)] e **(8)** adição

de fD+ C3+ fB+ P + fH+ fI + DENV-2 [bandas visíveis fH (~115 KDa), C3 (C3 $\alpha$ '~115KDa e C3 $\beta$ '~75KDa), fB (~ 97KDa) DENV-2 (Envelope ~ 54KDa)].



## 5. DISCUSSÃO

---

Baseado em um extenso número de dados da literatura, a ativação do sistema complemento (SC) atua efetivamente no *clearance* de infecções virais, seja neutralizando os vírus por mecanismos de opsonização, fagocitose e/ou lise, seja atuando em mecanismos de ativação da resposta imune inata e adaptativa efetora antiviral. Mediadores ativos, liberados como resultado da ativação da cascata proteolítica do SC, atuam no recrutamento de células inflamatórias, na opsonização, na habilidade das DC, quanto a sua capacidade de apresentação antigênica e ainda, na ativação de linfócitos (260-261). Por outro lado, patógenos desenvolveram estratégias de escape ao ataque do SC a fim de estabelecerem infecção (262). Um exemplo disto é o HIV, que inibe a cascata de ativação do SC, pela incorporação de reguladores do SC dos pacientes infectados no seu envelope viral, levando a inativação de C3b com geração de iC3b e C3d (263-265).

Na Dengue, a ativação do SC exerce um papel importante no controle viral, mas ao mesmo tempo, uma desregulação desse sistema parece estar relacionada à maior susceptibilidade a gravidade da doença (239, 247). Neste trabalho, avaliamos a influência do SC através, inicialmente, da medida do SC5b-9 componente relacionado à sua ativação. Além disso, avaliamos se existiria alteração na frequência de células imunes expressando receptores relacionados à ativação e também à regulação do SC em pacientes infectados pelo DENV. Investigamos um possível papel desse sistema na infecção *in vitro* de monócitos pelo DENV-2 e por fim, avaliamos a interação do SC com as alterações funcionais das células endoteliais *in vitro*.

Para isto, dois grupos de pacientes oriundos das epidemias de DENV-1/-2 e DENV-4 em 2010 e 2013, respectivamente, foram utilizados neste estudo. Em ambos os grupos, independente do sorotipo, alterações hematológicas e bioquímicas foram comuns, como trombocitopenia e elevação das transaminases hepáticas, sendo mais significativas no grupo grave comparado aos FD e FD/SA. No entanto, nos pacientes da epidemia de DENV-1/-2 observamos maior frequência de sangramentos (29% FD, 53% FD/SA e 53,3% Graves) e sinais de extravasamento plasmático (53,3% Graves) (tabela 4.1) comparado aos pacientes da epidemia de DENV-4 (33% manifestações hemorrágicas e 27% extravasamento vascular nos pacientes FD/SA/Graves e nenhum percentual nos FD) (tabela 4.7). Ainda, dentre os 35 pacientes-DENV-4 apenas 1 (3%) foi classificado como Dengue grave, enquanto que dos 66 DENV-1/-2, 15 (23%) eram

graves. O sorotipo DENV-4 ficou 28 anos sem circular no Brasil, voltando a ser isolado em 2010 (10), o que inicialmente foi preocupante devido à presença de um número maior de indivíduos susceptíveis ao sorotipo e, portanto, um risco elevado de casos graves e óbitos (266). Thomas e colaboradores realizaram estudo retrospectivo de 2005 a 2010 comparando sinais e sintomas de 715 pacientes (entre 14-91 anos) infectados por diferentes sorotipos virais. Pacientes infectados pelo sorotipo DENV-2 foram em sua maioria infecções secundárias, admitidos na fase crítica da doença, com sinais de extravasamento plasmático. As infecções pelo sorotipo DENV-1 levou a uma gravidade intermediária, sem extravasamento plasmático evidente. Interessante, nas infecções pelo sorotipo DENV-4, similar aos nossos achados, os pacientes tiveram uma apresentação clínica mais branda, confirmando a existência de diferenças em relação à virulência entre os sorotipos (66). Nossos dados estão de acordo com a literatura e de fato, parece que a hipótese de que a infecção por diferentes sorotipos como um dos fatores potenciais ao desfecho clínico do paciente na Dengue é bastante relevante.

Monócitos circulantes desempenham papel chave na Dengue, por ser um dos principais alvos da infecção e replicação viral, além de produzirem uma variedade de mediadores solúveis envolvidos tanto na resposta imune antiviral, como também no aumento da permeabilidade vascular (52, 267). Inicialmente, nós avaliamos a expressão de receptores de complemento (CR) em monócitos de pacientes. Observamos uma diminuição na frequência de monócitos expressando CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) e do regulador CD59 em pacientes comparado aos controles. O bloqueio do CR3, mas não do CR4 ou CR1, antes da infecção *in vitro* de monócitos de doadores pelo DENV, reduziu a infecção viral em cerca de 30%, bem como a produção de citocinas antivirais, sem alterar o perfil de ativação das células ou a ativação do inflamossoma (dados da tese, encontrados na publicação da revista Plos One (268) por CFM, anexo 2).

Sabe-se que diferentes vírus utilizam os CR como mecanismo de entrada em células alvo. Citamos aqui o vírus Epstein Barr com o CR2 na superfície de linfócitos B e T imaturos (269-270), o vírus do sarampo e o Herpesvirus humano tipo-6 com o CD46 (271-272), além de enterovírus com o CD55 (273). A entrada do DENV na célula alvo ocorre via endocitose mediada por receptores (274), dentre os quais já foram identificados o receptor de manose (46), e o DC-SIGN, este último atua fixando o vírus à célula, facilitando a infecção (41). Em nosso estudo, o bloqueio do CR3 com anticorpo monoclonal reduziu em 30% a detecção de antígenos intracelulares, bem

como em 30% a secreção da proteína viral NS1 indicando a importância do CR3 na infecção pelo DENV. A NS1 é uma proteína viral essencial para o processo de replicação do DENV (22) encontrada em níveis elevados no plasma de pacientes com FHD além de estar correlacionada com maior carga viral (67). Entretanto, ainda não sabemos por quais mecanismos o bloqueio de CR3 inibiu a infecção. É possível que o DENV se ligue diretamente ao CR3 ou que a entrada do vírus na célula possa ser facilitada pela opsonização por componentes do complemento que se liguem ao CR3, entender o mecanismo pelo o CR3 influencia na infecção pelo DENV é uma das perspectivas do nosso estudo.

O CR3 também foi envolvido na infecção *in vitro* pelo vírus West Nile (WNV). Neste contexto, macrófagos peritoneais, que expressam CR3 e FcR, ou a linhagem de fibroblastos L929, que não expressam esses receptores, foram submetidos a infecção pelo WNV na presença ou, na ausência, de soro imune e de anticorpos monoclonais anti-WNV e do SC. Nestas condições, a linhagem L929 não foi infectada, contudo, macrófagos peritoneais foram altamente infectados pelo mecanismo do ADE, semelhante ao que acontece no DENV. De forma interessante, o uso de inibidores da opsonização por fragmentos de C3 ou de anticorpos bloqueadores de CR3, mas não de bloqueadores do FcR, inibiu o efeito de ADE em macrófagos, sugerindo que o aumento da infecção pelo WNV em macrófagos é dependente de complemento e do CR3 (275). Yamanaka e colaboradores induziram ADE na linhagem monocítica U937 com doses subneutralizantes de anticorpos heterólogos contra a proteína de Envelope do DENV-2 ou -4 e na presença de soro inativado ou depletado de produtos do SC, o que resultou no aumento da infecção pelo DENV nestas células. Contudo, a adição de complemento comercial ou soro humano inativado reduziu a atividade ADE e portanto, diminuiu a frequência de células infectadas. Desta forma, os autores sugeriram que a funcionalidade dos anticorpos podem ser revertidas, isto é, um anticorpo capaz de promover o ADE pode tornar-se neutralizante na presença do complemento (239).

Em outro modelo de infecção *in vitro* pelo HIV em DC, a opsonização do HIV, feita pela adição de soro de doadores saudáveis (HIV-C'), resultou em um aumento da internalização viral, comparado ao vírus não opsonizado (HIV livre). Interessante, o bloqueio de várias integrinas, incluindo o CR3 reduziu a ligação e a internalização tanto do HIV-C' como do HIV livre (276). Esse mesmo grupo em outro trabalho confirmou que o bloqueio de CR3, e de outras integrinas, inibiu a internalização do HIV-C' e do HIV livre e, além disso, desfavoreceu a apresentação antigênica das DC via MHC de

classe I e II (277). Por fim, foi demonstrado que comparado ao HIV-C', o HIV livre aumenta significativamente a expressão de fatores antivirais como IFN-beta, genes estimulados pelo IFN, além de fatores inflamatórios como IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa comparado ao HIV-C'. Muito interessante, o CR3 foi capaz de modular a via de sinalização dos receptores Toll-like-8 (TLR8) o que parece, segundo os autores, ter levado ao aumento da infecção das DC pelo HIV-C' (278).

Nossos dados demonstram que o bloqueio prévio de CR3 não alterou a expressão de moléculas de ativação nem de MHC classe II em monócitos infectados pelo DENV, contudo a inibição da infecção foi acompanhada pela diminuição da produção das citocinas antivirais TNF-alfa e IFN-alfa. É possível que a interação direta ou indireta do DENV via CR3 altere de forma importante a resposta imune antiviral, semelhante aos dados anteriores discutidos no modelo de HIV. Acreditamos, portanto, que o CR3 poderia constituir um alvo promissor de terapias antivirais, tanto pela atividade antiviral quanto pela modulação da resposta imune. Um dado interessante do nosso estudo é que nos pacientes infectados observamos uma diminuição da frequência de monócitos expressando CR3. Em pacientes infectados pelo HCMV (citomegalovirus humano), *Candida albicans* é o principal microrganismo responsável pelas infecções oportunistas (279). Na infecção *in vitro* de macrófagos pelo HCMV, autores observaram diminuição da expressão de CR3 e também de CR4, o que prejudicou a adesão da *C. albicans* nos macrófagos infectados (279). Portanto, em pacientes infectados pelo DENV, menor frequência de monócitos expressando CR3 poderia ser um mecanismo estabelecido *in vivo* na tentativa de conter a infecção e alterar a funcionalidade das células, favorecendo o desfecho clínico do paciente.

Em relação à funcionalidade das células, mas sem relação com o SC, estudo revelou que na forma de complexo imune DENV-anticorpo anti-DENV, além do aumento da infecção *in vitro*, os monócitos passaram a expressar com maior intensidade moléculas de coestimulação CD86 e CD40 e aumentaram a produção das citocinas TNF-alfa, IFN-alfa e IL-10, quando comparados aos monócitos infectados apenas pelo DENV (280). Ainda, a infecção *in vitro* pelo DENV passou a induzir maior ativação da caspase-1 em macrófagos humanos, com consequente liberação de IL-1beta e IL-18. O bloqueio de CLEC-5A foi capaz de reduzir a infecção com inibição da ativação do inflamassoma via NLRP3 e maturação de IL-1beta e IL-18 (281). Nossos dados não demonstraram influência da ativação da caspase-1 com o bloqueio de CR3, sugerindo uma via independente de inflamassoma. O CR3 parece influenciar

diferentes modelos de infecção. A opsonização da bactéria *Francisella tularensis* via fragmentos de C3 aumenta sua fagocitose em macrófagos humanos via CR3 e resulta em menor produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, IL-6 e IL-1beta, quando comparada a bactéria não opsonizada (282). Outro exemplo interessante foi o modelo de infecção *in vitro* de monócitos pela *Porphyromonas gingivalis*, um dos principais patógenos de doença periodontal, no qual os autores demonstraram que o patógeno interage com CR3 inibindo a produção de IL-12p70. Essa relação foi confirmada com o uso de antagonista do CR3 (283).

Nos monócitos, o CR3 encontra-se associado ao receptor de imunoglobulina FcγIII (CD16), não só pela proximidade física como também pela interação da região “lectina-like” localizada na cadeia alfa de CR3 (284-285). Esta interação é mantida também pela presença de CD16 solúvel (286) e é bastante importante na regulação da função de CR3, por exemplo, modulando sua interação com iC3b (287), entre outras (284). Em modelo de malária, foi observado que a subpopulação de monócitos CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> é a principal célula envolvida na fagocitose de eritrócitos infectados pelo *Plasmodium falciparum*, isso por vias dependentes de anticorpos e do SC (288). Essa subpopulação de monócitos CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> apresenta uma forte expressão de CR3 e CR4 comparada as outras subpopulações (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), reafirmando que existe uma cooperação entre CD16 e CRs (288). Na Dengue, independente da expressão de CD16, monócitos são susceptíveis a infecção, contudo a subpopulação CD16<sup>+</sup> são as principais produtoras de citocinas pró-inflamatórias IL-1beta, TNF-alfa, IL-6 e quimiocinas CCL2, 3 e 4 em resposta a infecção (97). Com base nesses dados é possível supor que, na infecção *in vitro* pelo DENV o bloqueio de CR3 poderia influenciar na via de sinalização do CD16 e conseqüentemente, na produção de citocinas, como o TNF-alfa.

Quanto aos demais CR, não observamos diferenças com relação à expressão de CR2(CD21) ou CR1(CD35) nos monócitos de pacientes infectados pelo DENV. Dados da literatura demonstram que o CR2 é expresso principalmente nos linfócitos B e células dendríticas foliculares (FDC). Nos linfócitos B, CR2 interage com C3d na superfície do antígeno, além de formar um complexo com CD19 e CD81 o que resulta na diminuição do limiar de ativação destas células (289). Somado a isso, a interação antígeno-C3d-CR2 expresso nas FDC é responsável pela retenção do antígeno nos centros germinativos e ativação de linfócitos B (290). O CR2 além de se ligar ao C3d (291), também se liga a proteína gp350/220 do vírus Epstein Barr, contribuindo para a

infecção de linfócitos B (292). Na fisiologia, CR2 é o receptor do IFN-alfa e da molécula solúvel CD23 (293-294). Existe uma carência de dados na literatura que demonstrem a expressão de CR2 em monócitos e neste trabalho, nós confirmamos a baixa frequência de monócitos expressando CR2 em pacientes infectados pelo DENV e estes dados, nos levam a pensar que esse receptor não exerceria funções importantes na biologia de monócitos durante infecção pelo DENV.

A remoção de complexos imunes (CI) pelas células fagocíticas é um importante mecanismo da homeostase. O CR1(CD35) desempenha papel importante na remoção dos CI, em cooperação com CR3 e FcγR, e também na inativação de C3b e C4b, regulando a ativação do SC (295). No modelo de infecção experimental murina com o *Plasmodium yoeli*, observa-se um acúmulo de CI circulante, muito provavelmente por conta da expressão diminuída de CR1 nos monócitos/macrófagos durante a infecção (296). Neste mesmo estudo, os autores detectaram diminuição da expressão de CR1 em monócitos/macrófagos de pacientes com malária comparado aos indivíduos saudáveis. (296). Uma vez que o desenvolvimento da glomerulonefrite é frequentemente observada na malária, é possível que níveis aumentados de CI circulantes favoreçam sua deposição renal resultando na patologia (297). Na Dengue acredita-se que a presença de CI contendo o vírus facilitaria a infecção de monócitos via receptores Fc, aumentando a carga viral e contribuindo para patogênese da doença (298). Entretanto, pequenas quantidades de CI foram detectadas na circulação de pacientes (245). Assim, é possível que a diminuição de CR em monócitos de pacientes contribua para uma deficiência na regulação da resposta inflamatória via CRs, o que resultaria em uma maior produção de mediadores inflamatórios associados à gravidade da doença.

O CD59 é um regulador importante do SC que atua inibindo a montagem do MAC ou C5b-9 na superfície celular. Nossos resultados revelaram diminuição na frequência de monócitos expressando CD59 em pacientes comparado aos controles. Além disso, monócitos que expressavam CD59, comparado aos monócitos CD59<sup>neg</sup>, foram mais susceptíveis a infecção *in vitro* pelo DENV-2. Diminuição da expressão de CD59 nas infecções virais tem sido demonstrada. Duas linhagens de hepatócitos, a BEL7402 (do inglês: “Human hepatoma cell line”) e HL7702 (do inglês: “normal liver cell line”) foram infectadas *in vitro* pelo vírus da Hepatite B (HBV), o que resultou na infecção e na diminuição da expressão de CD59 nestas duas linhagens. O bloqueio do CD59 com anticorpo neutralizante, seguido de incubação com soro normal humano, aumentou a

susceptibilidade destas células à citotoxicidade dependente de complemento em comparação às células tratadas com soro inativado, nas mesmas condições de bloqueio. Neste mesmo trabalho, os autores viram uma diminuição da expressão de CD59 em hepatócitos, obtidos por centese hepática e marcados por imunohistoquímica, de pacientes com infecção crônica pelo HBV, comparado a indivíduos saudáveis. Desta forma, eles sugeriram que hepatócitos de indivíduos HBV+ são mais susceptíveis aos componentes de ativação do SC, o que contribuiria para o dano no tecido hepático frequentemente observado nestes pacientes (299). De forma interessante, foi demonstrado que a infecção de células T pelo herpes vírus humano-7 (HHV-7) induz aumento na expressão de dois outros reguladores, o CD46 e CD55 tornando-as mais resistentes à lise mediada pelo SC, em comparação a células não infectadas, sugerindo um mecanismo de escape viral, favorecendo o estabelecimento da infecção (300). Em nossos dados, observamos uma diminuição da frequência monócitos expressando CD59 nos pacientes com DENV. Portanto, monócitos provenientes de pacientes estariam mais susceptíveis à lise celular dependente de complemento, mas também, à infecção pelo DENV. Portanto, este poderia constituir um mecanismo de eliminação de células infectadas de muita importância para o desfecho clínico do paciente.

Na fase fluída o C5b-9 é rapidamente inibido pela associação com a clusterina ou a proteínas S (vitronectina), originando o SC5b-9 (301-302), cujos níveis circulantes refletem diretamente a ativação do SC (303). Contudo, o SC5b-9 é descrito não ser mais capaz de levar a formação de poros na membrana, porém pode induzir uma variedade de efeitos, particularmente em células endoteliais, incluindo a ativação de respostas pró-inflamatórias e pró-coagulantes (228, 304). De fato, o endotélio é um alvo potencial para os produtos biologicamente ativos do complemento. Em nosso estudo, tivemos dois cenários relacionados ao SC5b-9 nos grupos de pacientes infectados pelo DENV-1/-2 ou pelo DENV-4. Não pudemos comparar os níveis circulantes de SC5b-9 entre os grupos, uma vez que a dosagem foi feita em um grupo no plasma e no outro grupo, no soro. De forma interessante, na infecção pelo DENV-1/-2 níveis aumentados de SC5b-9 foram encontrados nos pacientes graves comparado aos FD e FD/SA, enquanto que, entre os pacientes-DENV-4 FD e FD/SA/Grave não observamos diferenças em relação aos níveis de SC5b-9. Ainda, nós confirmamos apenas nos pacientes-DENV-1/-2 uma associação entre níveis aumentados de SC5b-9 e o aparecimento de manifestações hemorrágicas e extravasamento vascular,

confirmando dados de outro grupo (27). Entretanto, nos pacientes-DENV-4 os níveis séricos de SC5b-9 foram correlacionados diretamente com a contagem de plaquetas e leucócitos, o que poderia indicar que o SC5b-9 nestes pacientes não estaria correlacionado a gravidade, diferente do observado nos pacientes-DENV-1/-2. Além disso, encontramos uma correlação positiva entre os níveis de SC5b-9 com o aumento da medida do TEER quando o soro de pacientes-DENV-4 foi adicionado sobre as monocamadas de HMVEC-d, indicando um efeito protetor da integridade endotelial pelo SC5b-9 nos pacientes-DENV-4. De fato, pacientes DENV-4 apresentaram uma doença de curso clínico mais brando comparado aos pacientes-DENV-1/-2. Como perspectiva, pretendemos avaliar a medida do TEER em presença de soro de pacientes-DENV-1/-2. Não sabemos ainda se o SC5b-9 estaria contribuindo de alguma forma para o desfecho clínico dos pacientes acometidos por diferentes sorotipos virais, mas nossos dados preliminares nos incentivam a continuar esse tipo de investigação.

Neste mesmo modelo em que adicionamos soro de pacientes-DENV-4 numa monocamada de HMVEC-d, foi medido a liberação da enzima intracelular LDH, como uma das possíveis formas de se avaliar a viabilidade celular. A adição de soro de pacientes contendo níveis de SC5b-9 conhecidos induziu aumento da liberação de LDH pelas HMVEC-d. Já o pré-tratamento com o peptídeo RGD, bloqueador da ligação do SC5b-9 ao receptor de vitronectina na célula, reduziu a liberação de LDH pelas HMVEC-d. Estes resultados apontam para, embora níveis circulantes de SC5b-9 nos pacientes-DENV-4 estivessem associados com a manutenção da permeabilidade endotelial, o SC5b-9 alteraria a integridade ou a viabilidade das HMVEC-d. Estudo utilizando células renais de rato demonstrou que a montagem do C5b-9 em quantidades sublíticas resultou na morte celular por apoptose, indicada pela fragmentação do núcleo, exposição de fosfatidilserina e indução da clivagem e ativação da caspase-3. De forma interessante, o tratamento das células com complexo inativo SC5b-9, também resultou em ativação da caspase-3 e apoptose, confirmando que ambos os sistemas foram capazes de induzir apoptose e dano celular (305).

Bossi e colaboradores demonstraram que SC5b-9 poderia exercer efeito indireto na alteração da permeabilidade. Neste contexto, os autores confirmaram a alteração da permeabilidade de HUVECs (célula endotelial vascular umbilical humana) após 30 min de incubação *in vitro* com o SC5b-9. Neste mesmo sistema, os autores viram que, a adição de bradicinina, molécula de efeito vasodilatador, promoveu aumento da permeabilidade já nos 5 min de incubação. Para fins de avaliação, os autores usaram



antagonistas do receptor de bradicinina (HOE-140) ou do PAF (do inglês “platelet activating factor”, CV3988) no tratamento com o SC5b-9 e viram uma redução da alteração da permeabilidade, enquanto o uso dos dois antagonistas simultaneamente inibiu completamente a alteração da permeabilidade. Com esses dados, os autores acreditam que o efeito do SC5b-9 na permeabilidade endotelial possa ser indireto, por exemplo, através da indução de fatores intermediários como a bradicinina e PAF (229).

Nas células endoteliais, o SC5b-9 é capaz de estimular a expressão de fator tecidual, moléculas de adesão como ICAM, VCAM e E-selectina em cooperação com o TNF-alfa (220, 228), migração de polimorfonucleares, entre outras funções (230). Do mesmo modo que produtos do SC influenciam a produção de citocinas, foi demonstrado que citocinas como IL-2 e IFN-gama recombinante induzem a biossíntese de componentes do SC, como C3 e C4 por células epiteliais (306-307), enquanto o estímulo pelo TGF- $\beta$  levou a diminuição da produção destes componentes e do fator H em células epiteliais (308). De forma interessante, nossos dados demonstraram uma correlação direta entre os níveis de SC5b-9 e citocinas pró-inflamatórias como a IL-1beta, TNF-alfa, IFN-gama, IL-8 e inversa com IL-10. Esses dados corroboram a existência de uma conexão entre a ativação do SC e citocinas, conseqüentemente, qualquer tipo de desregulação em um desses sistemas, afetaria diretamente o outro.

Num segundo aspecto do nosso trabalho, dados publicados nos anais do *Frontiers of Immunology*, em forma de resumo (309) e com o manuscrito em vias de submissão, iniciamos com a observação de que existia uma correlação inversa entre os níveis de SC5b-9 e a frequência de linfócitos T CD4 e CD8, em pacientes-DENV-4, o que nos levou a investigar a expressão de reguladores da ativação do complemento nestas células. O envolvimento de linfócitos T na Dengue é um dos fatores estritamente relacionados à imunopatogênese, achados mostraram que nas infecções secundárias, linfócitos T CD8 de memória cruzada apresentavam um perfil pró-inflamatório, produtor preferencialmente de TNF-alfa e IFN-gama, e menos citotóxico. Ainda, estas citocinas secretadas pelos linfócitos T contribuiriam para o estabelecimento do dano vascular observado em pacientes nas formas graves (83, 114). Em acordo com os dados anteriores, Duangchinda e colaboradores observaram em pacientes FD maior frequência de linfócitos T citotóxicos expressando CD107a (80%) do que os pró-inflamatórios produtores de TNF-alfa e IFN-gama (20%), enquanto que em pacientes FHD, a população predominante eram de pró-inflamatórios (71%) em detrimento aos citotóxicos (29%), sugerindo que a ativação de um perfil citotóxico contribuiria

positivamente para o controle da infecção e resistência às formas graves (310). Por outro lado, recentemente um estudo questionou a hipótese anterior, uma vez que foi observado ativação dos linfócitos T antes do aparecimento de hemoconcentração e trombocitopenia, ambos sinais de extravasamento vascular (120). Independente do perfil citotóxico ou inflamatório, nosso grupo publicou dados bastante relevantes que mostravam frequências aumentadas de linfócitos T expressando os receptores de quimiocina CCR5, CCR4 e CXCR3 em pacientes infectados pelo DENV comparado aos controles, e ainda, que estes linfócitos T coexpressavam moléculas associadas à função citotóxica e ativação/migração celular. De forma interessante, enquanto os níveis plasmáticos de CCL5 eram baixos nos pacientes-DENV, observamos em 4 casos fatais pela doença, um aumento de células CCL5+ no tecido hepático. Esses dados nos levaram a hipótese de que linfócitos T expressando receptores de quimiocinas, especialmente CCR5, seriam células efetoras e aptas a migrar para sítios de infecção (311). Independente do perfil de resposta, o que autores, recentemente, estão defendendo é que a eficácia da resposta de linfócitos T é associada a um perfil multifuncional (312) e que na infecção pelo DENV, a multifuncionalidade destas células é o ponto importante para o estabelecimento de uma resposta imune protetora durante infecções secundárias (111). Com relação à expressão de CR na Dengue, resultados obtidos na minha dissertação de mestrado revelaram uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4 expressando CR1(CD35) nos pacientes, independente da gravidade clínica, comparado aos controles, enquanto que nas T CD8 essa diminuição foi observada apenas em pacientes FD comparados aos controles. Vimos também uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4 e CD8 expressando CR2 (CD21) em pacientes FD em comparação aos controles. Por outro lado, pacientes graves apresentam maior frequência de linfócitos T expressando CR2 comparado aos pacientes FD. Assim, na infecção pelo DENV existiria uma modulação na expressão de CR nos linfócitos T.

Inicialmente, nós avaliamos a expressão de CR3(CD11b) nos linfócitos T de pacientes infectados pelo DENV, observamos uma maior expressão de CR3(CD11b) em linfócitos T CD8. De fato, a expressão de CR3(CD11b) em linfócitos T CD8 vem sendo associada às infecções virais agudas. Neste contexto, pacientes infectados pelo citomegalovírus (CMV) durante período de viremia apresentaram aumento na frequência de células T CD8 expressando CD11b, porém esta população não foi detectada 2 a 6 meses após a infecção (313). No modelo de infecção murina pelo

LCMV (do inglês “lymphocytic choriomeningitis virus”) também foi observado aumento na frequência de linfócitos T CD8 CD11b<sup>+</sup>. A seleção de células T CD8 CD11b<sup>+</sup> demonstrou que essa subpopulação exerce uma maior atividade citolítica antiviral comparada aos linfócitos T CD8 CD11b<sup>neg</sup>. Desta forma, ambos os estudos anteriores discutem o papel dos linfócitos T CD8 CD11b<sup>+</sup> como uma subpopulação efetivamente envolvida com a função efetora antiviral (314). Em nossos dados, embora não tivéssemos observado um aumento da frequência de linfócitos T expressando CD11b, pacientes-DENV+ apresentam uma frequência aumentada de linfócitos T CD8 CD11b<sup>+</sup> coexpressando CD107a, indicando que estas células exerceriam uma função citotóxica na Dengue.

Além disso, observamos que a frequência de linfócitos T CD4 e CD8 expressando CD11b<sup>+</sup> foram correlacionadas diretamente com níveis séricos de IL1-beta, mas apenas os linfócitos T CD4 CD11b<sup>+</sup> foram correlacionados inversamente com IL-10. Em outros tipos celulares a expressão de CR3 (CD11b) parece ser modulada em resposta as citocinas. Por exemplo, monócitos humanos tratados com a citocina imunomodulatória TGF-beta diminuiu a expressão de CR3(CD11b) (315). Aumento da expressão de CR3(CD11b) em células NK foi observado após tratamento destas células com as citocinas recombinantes IFN-alfa e IL-2 (316). Esses dados poderiam sugerir que citocinas produzidas em resposta a infecção pelo DENV teriam efeito na expressão de CR3(CD11b) nos linfócitos T de pacientes.

Classicamente, a função dos reguladores da ativação do complemento CD46, CD55 e CD59 é proteger células sadias de um possível dano causado pela ativação inadequada do SC. Aqui, nós não observamos alteração na frequência de linfócitos T expressando CR em pacientes-DENV-4. Uma vez que vários estudos tem demonstrado o envolvimento dos reguladores do complemento na ativação da resposta de linfócitos T (317-318), nós avaliamos o perfil de ativação destas células o que em geral, indicou um aumento da frequência de células T CD46<sup>+</sup> ou CD55<sup>+</sup> coexpressando os marcadores de ativação, migração e citotoxicidade CCR5, CD29 e CD107a.

Em relação ao CD46, a estimulação com anticorpos monoclonais anti-CD46 e anti-CD3 promoveu a diferenciação de linfócitos T CD4 circulantes de doadores para um fenótipo regulador, produtores de IL-10 e granzima B (208). Somado a isto, neste mesmo sistema os linfócitos T CD4 aumentaram a expressão da molécula de adesão  $\alpha_4\beta_7$  e do receptor de quimiocina CCR9, ambos envolvidos na migração de linfócitos T para o intestino. De fato, perfil similar foi observado nos linfócitos T CD4 isolados da

lâmina própria, sugerindo que CD46 contribuiria para a ativação e capacidade migratória das células T (319). Análises similares foram feitas observando o CD55, no qual o estímulo do CD55 através do seu ligante EGF-TM7, e anti-CD3 induziu proliferação, expressão de marcadores de ativação e secreção de IL-10 por linfócitos T CD4 humanos (213). Num modelo bem interessante de infecção viral aguda pelo LCMV (do inglês “Lymphocytic Choriomeningitis virus”), a estimulação com antígenos específicos *in vitro* induziu maior proliferação, produção de IFN-gama e maior atividade citolítica nos linfócitos T CD8 de camundongos deficientes de CD55 (CD55<sup>-/-</sup>) comparado aos animais selvagens, o que favoreceria um maior controle da infecção. Estes e outro conjunto de dados demonstram que os CR reguladores participam efetivamente da resposta de linfócitos T (320). Na Dengue, é possível que o aumento da frequência de linfócitos T coexpressando CR e marcadores de ativação tenham papel importante na resposta imune antiviral, contudo mais estudos precisam ser realizados a fim de caracterizar melhor estas células fenotípica- e funcionalmente, bem como avaliar pacientes com infecção por sorotipos e gravidade diferentes.

No caso da coexpressão CD59 e marcadores de ativação nos linfócitos T de pacientes, a frequência de linfócitos T CD8CD59<sup>+</sup> CD29<sup>+</sup> foi aumentada nos FD, enquanto que os linfócitos T CD8CD59<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> ou CD107a<sup>+</sup> estava diminuída nos FD/SA/Grave. Trabalhos demonstram a participação do CD59 na ativação de linfócitos T. Assim, utilizando técnica de supressão da expressão do CD59 (siCD59), autores demonstraram um aumento significativo da ativação e proliferação de linfócitos T, com produção de IL-2 pelos TCD4 e IFN-gama pelos CD8 co-cultivados na presença de DCs autólogas estimuladas com lisado tumoral. Por outro lado, o siCD59 tornou as células mais susceptíveis a lise mediada pelo complemento quando na presença de soro e anticorpos, comparado aos linfócitos T CD59<sup>+</sup> (214). Citocinas estão envolvidas na expressão de CD59, por exemplo, enquanto IL-1-beta, IL-6 e TNF-alfa aumentaram a expressão deste receptor em hepatócitos humanos, o contrário foi observado para o IFN-gama (321). Fatores relacionados ao patógeno como a proteína do core (HBc) do HBV diminuiu a expressão de CD59 nas linhagens de hepatócitos HepG2. Em pacientes, biópsias de fígado de pacientes infectados pelo HBV apresentaram diminuição da expressão de CD59 e maior deposição do MAC, resultando em dano tecidual mais acentuado no fígado destes pacientes (322). Em nosso trabalho, observamos apenas uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos T expressando CD59 e níveis de IFN-gama, diferente dos achados em hepatócitos.

Ainda, a frequência de linfócitos T CD59<sup>+</sup> coexpressando marcadores associados à função citotóxica, ativação e de migração sugere que estas células T são capazes de migrar para sítios inflamatórios e exercer sua função efetora, estando ainda protegidas da lise mediada pelo complemento. No geral pensamos que todo ambiente, ou seja, tipo de infecção, subpopulação celular e citocinas influenciam de maneira diferencial a expressão de reguladores do complemento. Especificamente nas células infectadas, a diminuição da expressão desses reguladores poderia constituir um mecanismo de escape viral, contra a lise induzida pelo MAC.

Por fim, uma terceira etapa do trabalho foi realizada na Universidade de Pittsburgh em colaboração com Dr. Ernesto Marques. Relembrando, na tentativa de estabelecer a infecção, certos vírus desenvolveram mecanismos de escape limitando a ação dos componentes do complemento. Dentre esses, citamos casos de vírus que utilizam os CR como receptores de entrada na célula alvo (275, 323-324), aqueles que por diferentes mecanismos suprimem ou diminuem a ação dos componentes de ativação do complemento (325-326) ou ainda, aqueles que diminuem a expressão de reguladores do complemento em células do hospedeiro prevenindo a lise mediada pelo MAC (300). Alguns destes mecanismos atuam no momento da formação e estabilização da C3 convertase (327), regulando a clivagem de C3, componente central do complemento, prevenindo não só a montagem do MAC, mas a fagocitose de partículas opsonizadas por fragmentos de C3.

Em nossos resultados preliminares, parece que o DENV-2 induziu a clivagem da cadeia alfa de C3, na ausência de fD, sem consumo do fB. Esse dado poderia sugerir que a clivagem de C3 constituiria um mecanismo de escape do DENV-2 da ativação do complemento, com diminuição da deposição de C3. A literatura já demonstrou que pacientes com FHD apresentaram níveis plasmáticos elevados de fD e C3a em comparação aos pacientes com FD (247). Chung e colaboradores demonstraram a interação da proteína NS1 do WNV com o fH. O complexo NS1 e fH promoveu degradação de C3b em solução (328). Curiosamente, observamos que a incubação do DENV com os fatores C3, fB, fD e properdina, na presença de ambos os reguladores fI e fH, levou a uma menor clivagem de C3 e menor geração dos seus produtos de degradação. Assim, a presença do DENV ou de suas proteínas virais como a NS1, seria um mecanismo de controle da ativação do complemento, uma vez que na ausência do DENV-2, o C3 foi totalmente consumido. Possivelmente, a regulação da clivagem de C3 depende da formação da C3 convertase, o que poderia ocasionar

prejuízo nos mecanismos de opsonização por fragmentos de C3 e na montagem do MAC. É foco ainda de nossos estudos, entender o que acontece com a infecção, uma vez que estudos anteriores indicam que a maior clivagem de C3 na infecção pelo DENV com menores níveis do regulador fH, o que poderia constituir uma forma de induzir desregulação do SC observada principalmente nas formas graves da doença (247). Ainda, investigar se existe ligação do vírus com CR3 (CD11b) e como a interação vírus-fragmentos de C3 influenciaria na infecção.

Assim, a partir do conjunto de nossos dados, acreditamos que a diminuição da frequência de monócitos expressando CR em pacientes infectados pelo DENV constituiria um dos mecanismos de resistência à infecção, uma vez que *in vitro*, o bloqueio de CR3(CD11b) sozinho ou associado a molécula CD18, reduziu a infecção em 30%. Embora mais resistentes à infecção, esses monócitos não alteram seu fenótipo relacionada à apresentação antigênica via MHC de classe II, moléculas de coestimulação e a propriedade de ativação da caspase-1, apesar de redução da produção de IFN-alfa e TNF-alfa. Todo esse conjunto seria importante para o controle da infecção viral e também, na indução de uma resposta pró-inflamatória menos exacerbada. A redução de parte da infecção pelo bloqueio do CR3, nos motiva a investigar por qual mecanismo se dá esse efeito, uma vez que poderíamos considerá-lo um potencial candidato as terapias anti-DENV. Mais estudos são necessários e vão desde as etapas iniciais de interação vírus com o receptor, até a modulação da via endocítica e produção de moléculas com efeitos antivirais pelas células-alvo. Ao mesmo tempo, observamos uma diminuição na frequência de monócitos expressando CD59, o que favoreceria a eliminação de células infectadas pela lise dependente do MAC. Apesar de observamos ativação do SC pela medida dos níveis de SC5b-9 em pacientes infectados pelo DENV, associação entre os níveis de SC5b-9 e gravidade foi observada apenas em pacientes-DENV-1/-2, mas não em pacientes-DENV-4, o que poderia contribuir para o entendimento da patogênese da Dengue de acordo com os diferentes sorotipos virais. Nós observamos uma correlação positiva entre os níveis de SC5b-9 em pacientes DENV-4 e medidas altas de TEER, o que significa manutenção da integridade do endotélio em nosso sistema. Além do SC, não descartamos que mediadores inflamatórios solúveis, como citocinas, quimiocinas, bradicinina, componentes da coagulação e outros contribuiriam para a manutenção da integridade da monocamada das HMVEC-d. Um dado bastante desafiador para nosso grupo foi a participação do SC5b-9 como indutor da liberação da enzima intracelular LDH nas HMVEC-d, indicando sua participação na viabilidade dessas células. Contudo, essas

dados são bastante preliminares e outros ensaios que incluam a adição do soro de indivíduos saudáveis, soro inativado e do complexo SC5b-9 purificado como controles deverão ser realizados a fim de investigar se de fato existe morte celular e quais mecanismos intracelulares são induzidos. O aumento da frequência de linfócitos T coexpressando os receptores reguladores do complemento e marcadores de citotoxicidade, ativação e migração em pacientes sugere que essas células possuem um perfil efetor, capazes de migrar para os sítios de infecção e exercer atividade antiviral e estando ainda protegidas da lise mediada pelo SC. Acreditamos que também seja necessário caracterizar esses linfócitos T por meio de ensaios de funcionalidade como capacidade de induzir citotoxicidade e produzir citocinas. Ainda, avaliar essa subpopulação nas infecções por diferentes sorotipos. Por fim, o DENV parece induzir clivagem de C3 na fase fluída. É preciso ainda entender se este mecanismo prejudicaria ou não a deposição de fragmentos de C3 na superfície viral, o que poderia constituir um mecanismo de escape viral contra a lise pelo complemento. E investigar se a deposição de fragmentos de C3 na superfície viral poderia bloquear ou aumentar a infecção via CR3, na tentativa de esclarecer o mecanismo pelo qual o bloqueio de CR3 diminui a infecção pelo DENV *in vitro*.

## 6. CONCLUSÃO

---

6.1. A diminuição da frequência de monócitos CD14+ expressando CR4 (CD11c), CR3 (CD11b) e CD59 em pacientes infectados pelo DENV constituiria um mecanismo de controle da eliminação de células infectadas mediada pelo sistema complemento.

6.2. O bloqueio prévio de CR3 reduz a infecção pelo DENV-2 em monócitos, sem alterar seu perfil de ativação celular, mas diminuindo a produção das citocinas TNF-alfa e IFN-alfa. O que constituiria um mecanismo de controle da infecção, associado a uma resposta pró-inflamatória menos intensa.

6.3. Elevados níveis do complexo SC5b-9 em pacientes indicam ativação do SC na Dengue. Ainda, dependendo do sorotipo da infecção, no caso, DENV-1/-2 ou DENV-4, parece que SC5b-9 teria uma atuação diferente na patogênese da doença, inclusive na manutenção da integridade e viabilidade de células endoteliais.

6.4. Um aumento da frequência de linfócitos T CD8+ CR3(CD11b)+ CD107a+ poderia indicar um papel potencial dessas células no controle da infecção viral.

6.5. Ainda, um aumento da frequência de linfócitos T coexpressando receptores reguladores CD46, CD55 ou CD59 e marcadores de ativação e migração celular indicaria papel potencial dessas células em sítios inflamatórios no controle da infecção e resistentes a lise mediada pelo complemento.

6.6. A clivagem de C3 pelo DENV na ausência de fD sugere que o vírus, por si só, é capaz de modular a ativação do SC.



## 7. BIBLIOGRAFIA

---

1. Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jul;9(7):532-41.
2. Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res*. 2008 Apr;78(1):116-24.
3. Halstead SB, Thomas SJ. New Japanese encephalitis vaccines: alternatives to production in mouse brain. *Expert Rev Vaccines*. 2011 Mar;10(3):355-64.
4. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983 Jan-Feb;25(1):53-4.
5. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986 Apr-Jun;81(2):245-6.
6. Vasconcelos PF, Mota K, Straatmann A, Santos-Torres S, da Rosa AP, Tavares Neto J. [A dengue epidemic in Ipujiara and Prado, Bahia. A seroepidemiologic survey]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000 Jan-Feb;33(1):61-7.
7. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Apr-Jun;85(2):253.
8. De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004 Sep;98(9):553-62.
9. 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.
10. 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.
11. Heringer M, Nogueira RM, de Filippis AM, Lima MR, Faria NR, Nunes PC, et al. Impact of the emergence and re-emergence of different dengue viruses' serotypes in Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015 Apr;109(4):268-74.
12. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e617.
13. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceicao TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Mar;39(2):155-70.
14. Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 9;101(10):3414-9.
15. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*. 2003 Nov;10(11):907-12.
16. Zhang X, Sheng J, Plevka P, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 23;110(17):6795-9.

17. Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol.* 2008 Dec;89(Pt 12):3047-51.
18. Randolph VB, Winkler G, Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology.* 1990 Feb;174(2):450-8.
19. Yu IM, Holdaway HA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *J Virol.* 2009 Dec;83(23):12101-7.
20. van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol.* 2007 Nov;81(21):12019-28.
21. Cardoso MJ, Wang SM, Sum MS, Tio PH. Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *BMC Microbiol.* 2002 May 5;2:9.
22. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology.* 1996 Jun 1;220(1):232-40.
23. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Aug;11(4):369-77.
24. Smith GW, Wright PJ. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. *J Gen Virol.* 1985 Mar;66 ( Pt 3):559-71.
25. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 10;108(19):8003-8.
26. Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol.* 1988 Aug;69 ( Pt 8):2101-7.
27. 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.
28. Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, et al. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost.* 2007 Nov;5(11):2291-9.
29. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med.* 2015 Sep 9;7(304):304ra142.
30. Chen J, Ng MM, Chu JJ. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2015 Jul;11(7):e1005053.
31. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol.* 2006 Sep;87(Pt 9):2605-14.
32. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:23-61.
33. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* 2007 Mar 23;282(12):8873-82.
34. 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.

35. Pierson TC.  
<http://www.niaid.nih.gov/labsandresources/labs/aboutlabs/lvd/viralpathogenesissection/Pages/default.aspx>. 2012.
36. Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol.* 2011 Dec 26;195(7):1071-82.
37. Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol.* 2007 Jul;81(13):7136-48.
38. Pryor MJ, Gualano RC, Lin B, Davidson AD, Wright PJ. Growth restriction of dengue virus type 2 by site-specific mutagenesis of virus-encoded glycoproteins. *J Gen Virol.* 1998 Nov;79 ( Pt 11):2631-9.
39. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *J Med Virol.* 2007 Apr;79(4):386-92.
45. 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.
46. 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.
47. Kangwanpong D, Bhamarapravati N, Lucia HL. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method: a case report. *Clin Diagn Virol.* 1995 Feb;3(2):165-72.
48. de Araujo JM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods.* 2009 Jan;155(1):34-8.
49. Pova TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One.* 2014;9(4):e83386.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Aye KS, Charngkaew K, Win N, Wai KZ, Moe K, Punyadee N, et al. Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. *Hum Pathol*. 2014 Jun;45(6):1221-33.
54. 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.
55. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):7814-23.
56. 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.
57. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 2004 Oct;80(948):588-601.
58. Ranjit S, Kisson N. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. *Pediatr Crit Care Med*. 2011 Jan;12(1):90-100.
59. WHO. TDR - Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009(New Edition, Geneva).
60. Tsai CY, Lee IK, Lee CH, Yang KD, Liu JW. Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013 Aug;46(4):271-81.
61. 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.
62. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol*. 2000 Nov 1;152(9):793-9; discussion 804.
63. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Dec;75(6):1113-7.
64. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol*. 2005 Jan;79(2):853-9.
65. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):4738-47.
66. Thomas L, Najjioullah F, Besnier F, Valentino R, Cesaire R, Rosine J, et al. Clinical presentation of dengue by serotype and year of epidemic in Martinique. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Jul;91(1):138-45.
67. 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.
68. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis*. 2002 Jun;6(2):118-24.

69. Gamble J, Bethell D, Day NP, Loc PP, Phu NH, Gartside IB, et al. Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock? *Clin Sci (Lond)*. 2000 Feb;98(2):211-6.
70. Kalayanaroj S, Nimmannitya S. Is dengue severity related to nutritional status? *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005 Mar;36(2):378-84.
71. 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.
72. 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.
73. Monteiro SP, Brasil PE, Cabello GM, Souza RV, Brasil P, Georg I, et al. HLA-A\*01 allele: a risk factor for dengue haemorrhagic fever in Brazil's population. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Mar;107(2):224-30.
74. Nascimento EJ, Mailliard RB, Khan AM, Sidney J, Sette A, Guzman N, et al. Identification of conserved and HLA promiscuous DENV3 T-cell epitopes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2497.
75. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Jul;28(3):183-8.
76. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):476-81.
77. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica*. 2002 Apr;11(4):223-7.
78. Valdes K, Alvarez M, Pupo M, Vazquez S, Rodriguez R, Guzman MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Sep;7(5):856-7.
79. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011 Aug;11(8):532-43.
80. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med*. 1970 Apr;42(5):311-28.
81. Thompson BS, Moesker B, Smit JM, Wilschut J, Diamond MS, Fremont DH. A therapeutic antibody against west nile virus neutralizes infection by blocking fusion within endosomes. *PLoS Pathog*. 2009 May;5(5):e1000453.
82. 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.
83. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3821-9.
84. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control 2009.
85. Wehner R, Dietze K, Bachmann M, Schmitz M. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun*. 2011;3(3):258-63.
86. Sun P, Fernandez S, Marovich MA, Palmer DR, Celluzzi CM, Boonnak K, et al. Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology*. 2009 Jan 20;383(2):207-15.
87. Tsai YT, Chang SY, Lee CN, Kao CL. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol*. 2009 Apr;11(4):604-15.

88. Nasirudeen AM, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1):e926.
89. Bowie AG, Haga IR. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol*. 2005 May;42(8):859-67.
90. da Conceicao TM, Rust NM, Berbel AC, Martins NB, do Nascimento Santos CA, Da Poian AT, et al. Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. *Virology*. 2013 Jan 20;435(2):281-92.
91. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001 Jan;69(1):11-20.
92. Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol*. 2005 Jun 15;174(12):8163-72.
93. Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol*. 2005 May;79(9):5414-20.
94. Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, Garcia-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*. 2009 Jun;83(11):5408-18.
95. Mazzon M, Jones M, Davidson A, Chain B, Jacobs M. Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis*. 2009 Oct 15;200(8):1261-70.
96. Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, Gutman D, et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog*. 2012;8(10):e1002934.
97. 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.
98. Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E, Larreal Y, et al. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology*. 2014 Mar;452-453:42-51.
99. Becerra A, Warke RV, Martin K, Xhaja K, de Bosch N, Rothman AL, et al. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. *J Med Virol*. 2009 Aug;81(8):1403-11.
100. 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.
101. 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.
102. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Aug;53(3):287-99.
103. Crill WD, Hughes HR, Delorey MJ, Chang GJ. Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One*. 2009;4(4):e4991.
104. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 2010 May 7;328(5979):745-8.
105. 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.

106. Chuang YC, Lin YS, Liu HS, Wang JR, Yeh TM. Antibodies against thrombin in dengue patients contain both anti-thrombotic and pro-fibrinolytic activities. *Thromb Haemost.* 2013 Aug;110(2):358-65.
107. Chuang YC, Lei HY, Lin YS, Liu HS, Wu HL, Yeh TM. Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation. *J Immunol.* 2011 Dec 15;187(12):6483-90.
108. Lin CF, Lei HY, Shiao AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):657-64.
109. Simmons CP, Dong T, Chau NV, Dung NT, Chau TN, Thao le TT, et al. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *J Virol.* 2005 May;79(9):5665-75.
110. Appanna R, Huat TL, See LL, Tan PL, Vadivelu J, Devi S. Cross-reactive T-cell responses to the nonstructural regions of dengue viruses among dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Malaysia. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Aug;14(8):969-77.
111. 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.
112. Rivino L, Kumaran EA, Jovanovic V, Nadua K, Teo EW, Pang SW, et al. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection. *J Virol.* 2013 Mar;87(5):2693-706.
113. Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbataar M, Kitsutani P, Effler P, et al. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. *J Virol.* 2007 Sep;81(18):10081-91.
114. Dong T, Moran E, Vinh Chau N, Simmons C, Luhn K, Peng Y, et al. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PLoS One.* 2007;2(12):e1192.
115. 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.
116. Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001 Apr;30(3):229-33.
117. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225:300-13.
118. Mangada MM, Rothman AL. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2676-83.
119. Friberg H, Burns L, Woda M, Kalayanarooj S, Endy TP, Stephens HA, et al. Memory CD8+ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunol Cell Biol.* 2011 Jan;89(1):122-9.
120. Dung NT, Duyen HT, Thuy NT, Ngoc TV, Chau NV, Hien TT, et al. Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue. *J Immunol.* 2010 Jun 15;184(12):7281-7.
121. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015 Jan 31;385(9966):453-65.
122. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998 May 15;91(10):3527-61.

123. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res.* 2010 Jul 15;87(2):300-10.
124. Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Aguilar L, Amalric F, et al. Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(2):60-72.
125. Baumgartner-Parzer SM, Waldhausl WK. The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109 Suppl 2:S166-79.
126. Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med.* 2004 May;32(5 Suppl):S271-9.
127. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol.* 2007 Jan;85(1):43-5.
128. Ramos C, Sanchez G, Pando RH, Baquera J, Hernandez D, Mota J, et al. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol.* 1998 Aug;4(4):465-8.
129. Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Mar;80(3):416-24.
130. Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, et al. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Mar;29(3):238-42.
131. Dalrymple N, Mackow ER. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *J Virol.* 2011 Sep;85(18):9478-85.
132. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jul-Aug;63(1-2):71-5.
133. Liu P, Woda M, Ennis FA, Libraty DH. Dengue virus infection differentially regulates endothelial barrier function over time through type I interferon effects. *J Infect Dis.* 2009 Jul 15;200(2):191-201.
134. Dalrymple NA, Mackow ER. Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue virus infection. *J Virol.* 2012 Jun;86(12):6408-15.
135. Azizan A, Fitzpatrick K, Signorovitz A, Tanner R, Hernandez H, Stark L, et al. Profile of time-dependent VEGF upregulation in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with DENV-1, -2, -3, and -4 viruses. *Virol J.* 2009;6:49.
136. Ong SP, Ng ML, Chu JJ. Differential regulation of angiopoietin 1 and angiopoietin 2 during dengue virus infection of human umbilical vein endothelial cells: implications for endothelial hyperpermeability. *Med Microbiol Immunol.* 2013 Dec;202(6):437-52.
137. Luplertlop N, Misse D. MMP cellular responses to dengue virus infection-induced vascular leakage. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Jul;61(4):298-301.
138. 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 Nov;8(11):1547-50.
139. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol.* 2004 Jul;85(Pt 7):1801-13.



140. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC, et al. Tissue plasminogen activator induced by dengue virus infection of human endothelial cells. *J Med Virol.* 2003 Aug;70(4):610-6.
141. Jiang Z, Tang X, Xiao R, Jiang L, Chen X. Dengue virus regulates the expression of hemostasis-related molecules in human vein endothelial cells. *J Infect.* 2007 Aug;55(2):e23-8.
142. Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Apr;66(4):435-41.
143. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Dec;65(6):840-7.
144. 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.
145. 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.
146. 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.
147. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* 2007 Nov;3(11):e183.
148. 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 Sep 9;7(304):304ra141.
149. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):785-97.
150. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol.* 2010 Nov 1;185(9):5628-36.
151. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol.* 2004 Nov;41(11):1089-98.
152. Diebolder CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science.* 2014 Mar 14;343(6176):1260-3.
153. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* 2004 Jul;25(7):368-73.
154. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaebler WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology.* 2010;215(1):1-11.
155. Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:131-55.
156. Harboe M, Mollnes TE. The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med.* 2008 Aug;12(4):1074-84.
157. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med.* 2011 Mar-Apr;17(3-4):317-29.

158. Morgan BP, Luzio JP, Campbell AK. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and cell injury: a paradoxical role of Ca<sup>2+</sup> in complement membrane attack. *Cell Calcium*. 1986 Dec;7(5-6):399-411.
159. Papadimitriou JC, Ramm LE, Drachenberg CB, Trump BF, Shin ML. Quantitative analysis of adenine nucleotides during the prelytic phase of cell death mediated by C5b-9. *J Immunol*. 1991 Jul 1;147(1):212-7.
160. Mathern DR, Heeger PS. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Sep 4;10(9):1636-50.
161. Davis AE, 3rd, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost*. 2010 Nov;104(5):886-93.
162. Ziccardi RJ. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J Immunol*. 1982 Jun;128(6):2505-8.
163. Gaboriaud C, Gupta RK, Martin L, Lacroix M, Serre L, Teillet F, et al. The serine protease domain of MASP-3: enzymatic properties and crystal structure in complex with ecotin. *PLoS One*. 2013;8(7):e67962.
164. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S. MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol*. 2009 Dec 1;183(11):7371-8.
165. Presanis JS, Hajela K, Ambrus G, Gal P, Sim RB. Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(13):921-9.
166. Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2001 Apr;180:35-48.
167. Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today*. 1988 Dec;9(12):387-93.
168. Lambris JD, Lao Z, Oglesby TJ, Atkinson JP, Hack CE, Becherer JD. Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *J Immunol*. 1996 Jun 15;156(12):4821-32.
169. Liszewski MK, Leung M, Cui W, Subramanian VB, Parkinson J, Barlow PN, et al. Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). *J Biol Chem*. 2000 Dec 1;275(48):37692-701.
170. Ross GD, Lambris JD, Cain JA, Newman SL. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol*. 1982 Nov;129(5):2051-60.
171. Davis AE, 3rd, Harrison RA. Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry*. 1982 Nov 9;21(23):5745-9.
172. Blom AM, Kask L, Dahlback B. Structural requirements for the complement regulatory activities of C4BP. *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(29):27136-44.
173. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, et al. Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009 Jul 23;361(4):345-57.
174. Feng S, Liang X, Kroll MH, Chung DW, Afshar-Kharghan V. von Willebrand factor is a cofactor in complement regulation. *Blood*. 2015 Feb 5;125(6):1034-7.
175. Nilsson UR, Funke L, Nilsson B, Ekdahl KN. Two conformational forms of target-bound iC3b that distinctively bind complement receptors 1 and 2 and two specific monoclonal antibodies. *Ups J Med Sci*. 2011 Mar;116(1):26-33.
176. Rodriguez de Cordoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*. 2004 Jun;41(4):355-67.

177. Klickstein LB, Bartow TJ, Miletic V, Rabson LD, Smith JA, Fearon DT. Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. *J Exp Med*. 1988 Nov 1;168(5):1699-717.
178. Krych-Goldberg M, Hauhart RE, Subramanian VB, Yurcisin BM, 2nd, Crimmins DL, Hourcade DE, et al. Decay accelerating activity of complement receptor type 1 (CD35). Two active sites are required for dissociating C5 convertases. *J Biol Chem*. 1999 Oct 29;274(44):31160-8.
179. Rawal N, Rajagopalan R, Salvi VP. Stringent regulation of complement lectin pathway C3/C5 convertase by C4b-binding protein (C4BP). *Mol Immunol*. 2009 Sep;46(15):2902-10.
180. Hourcade DE, Mitchell L, Kuttner-Kondo LA, Atkinson JP, Medof ME. Decay-accelerating factor (DAF), complement receptor 1 (CR1), and factor H dissociate the complement AP C3 convertase (C3bBb) via sites on the type A domain of Bb. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1107-12.
181. Harris CL, Pettigrew DM, Lea SM, Morgan BP. Decay-accelerating factor must bind both components of the complement alternative pathway C3 convertase to mediate efficient decay. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):352-9.
182. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2439-47.
183. Tschopp J, Chonn A, Hertig S, French LE. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J Immunol*. 1993 Aug 15;151(4):2159-65.
184. Dahlback B, Podack ER. Characterization of human S protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. Demonstration of a free reactive thiol group. *Biochemistry*. 1985 Apr 23;24(9):2368-74.
185. Korty PE, Brando C, Shevach EM. CD59 functions as a signal-transducing molecule for human T cell activation. *J Immunol*. 1991 Jun 15;146(12):4092-8.
186. Moskovich O, Fishelson Z. Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex. *J Biol Chem*. 2007 Oct 12;282(41):29977-86.
187. Morgan BP, Dankert JR, Esser AF. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. *J Immunol*. 1987 Jan 1;138(1):246-53.
188. Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol*. 2009 Sep;46(14):2753-66.
189. Benoit ME, Clarke EV, Morgado P, Fraser DA, Tenner AJ. Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. *J Immunol*. 2012 Jun 1;188(11):5682-93.
190. Amarilyo G, Verbovetski I, Atallah M, Grau A, Wiser G, Gil O, et al. iC3b-opsinized apoptotic cells mediate a distinct anti-inflammatory response and transcriptional NF-kappaB-dependent blockade. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):699-709.
191. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2313-20.
192. Rodgaard A, Christensen LD, Thomsen BS, Wiik A, Bendixen G. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression on peripheral T lymphocytes: both CD4- and CD8-positive cells express CR1. *Complement Inflamm*. 1991;8(5-6):303-9.
193. Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol*. 1998 Jun 1;160(11):5273-9.

194. Danielsson C, Pascual M, French L, Steiger G, Schifferli JA. Soluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage. *Eur J Immunol.* 1994 Nov;24(11):2725-31.
195. Carroll MC. The complement system in B cell regulation. *Mol Immunol.* 2004 Jun;41(2-3):141-6.
196. Levy E, Ambrus J, Kahl L, Molina H, Tung K, Holers VM. T lymphocyte expression of complement receptor 2 (CR2/CD21): a role in adhesive cell-cell interactions and dysregulation in a patient with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol.* 1992 Nov;90(2):235-44.
197. Dong X, Mi LZ, Zhu J, Wang W, Hu P, Luo BH, et al. alpha(V)beta(3) integrin crystal structures and their functional implications. *Biochemistry.* 2012 Nov 6;51(44):8814-28.
198. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:825-52.
199. Sandor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z. CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology.* 2013 Apr;218(4):652-63.
200. Bajic G, Yatime L, Sim RB, Vorup-Jensen T, Andersen GR. Structural insight on the recognition of surface-bound opsonins by the integrin I domain of complement receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 8;110(41):16426-31.
201. Chen X, Yu Y, Mi LZ, Walz T, Springer TA. Molecular basis for complement recognition by integrin alphaXbeta2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 20;109(12):4586-91.
202. Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.* 2005 Jul;26(7):388-95.
203. Thieblemont N, Haeffner-Cavaillon N, Ledur A, L'Age-Stehr J, Ziegler-Heitbrock HW, Kazatchkine MD. CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) mediate infection of human monocytes and monocytic cell lines with complement-opsonized HIV independently of CD4. *Clin Exp Immunol.* 1993 Apr;92(1):106-13.
204. Dunkelberger JR, Song WC. Role and mechanism of action of complement in regulating T cell immunity. *Mol Immunol.* 2010 Aug;47(13):2176-86.
205. Wagner C, Ochmann C, Schoels M, Giese T, Stegmaier S, Richter R, et al. The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes. *Mol Immunol.* 2006 Feb;43(6):643-51.
206. Kolev M, Le Friec G, Kemper C. The role of complement in CD4(+) T cell homeostasis and effector functions. *Semin Immunol.* 2013 Feb;25(1):12-9.
207. Astier A, Trescol-Biemont MC, Azocar O, Lamouille B, Roubourdin-Combe C. Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6091-5.
208. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature.* 2003 Jan 23;421(6921):388-92.
209. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood.* 2004 Nov 1;104(9):2840-8.
210. Cardone J, Le Friec G, Vantourout P, Roberts A, Fuchs A, Jackson I, et al. Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):862-71.
211. Le Friec G, Sheppard D, Whiteman P, Karsten CM, Shamoun SA, Laing A, et al. The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat Immunol.* 2012 Dec;13(12):1213-21.

212. Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA. The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *J Exp Med*. 1996 Sep 1;184(3):1185-9.
213. Capasso M, Durrant LG, Stacey M, Gordon S, Ramage J, Spendlove I. Costimulation via CD55 on human CD4+ T cells mediated by CD97. *J Immunol*. 2006 Jul 15;177(2):1070-7.
214. Xie XH, Gao MH, Zhang B, Wang MJ, Wang J. Post-transcriptional CD59 gene silencing by siRNAs induces enhanced human T lymphocyte response to tumor cell lysate-loaded DCs. *Cell Immunol*. 2012;274(1-2):1-11.
215. Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol*. 2010 Aug;11(8):674-80.
216. Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity*. 2013 Dec 12;39(6):1143-57.
217. Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol*. 2014 Dec;14(12):811-20.
218. Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med*. 2003 Dec 8;115 Suppl 8A:99S-106S.
219. Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Morgan BP, Davies KA, Haskard DO. Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1673-82.
220. Kilgore KS, Shen JP, Miller BF, Ward PA, Warren JS. Enhancement by the complement membrane attack complex of tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell expression of E-selectin and ICAM-1. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1434-41.
221. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol*. 2004 Mar;164(3):849-59.
222. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glovsky MM, et al. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1147-55.
223. Kilgore KS, Flory CM, Miller BF, Evans VM, Warren JS. The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol*. 1996 Sep;149(3):953-61.
224. Ota H, Fox-Talbot K, Hu W, Qian Z, Sanfilippo F, Hruban RH, et al. Terminal complement components mediate release of von Willebrand factor and adhesion of platelets in arteries of allografts. *Transplantation*. 2005 Feb 15;79(3):276-81.
225. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol*. 2007 Apr;28(4):184-92.
226. Mollnes TE, Lea T, Harboe M. Detection and quantification of the terminal C5b-9 complex of human complement by a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol*. 1984 Aug;20(2):157-66.
227. Brandtzaeg P, Mollnes TE, Kierulf P. Complement activation and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis*. 1989 Jul;160(1):58-65.
228. Tedesco F, Pausa M, Nardon E, Introna M, Mantovani A, Dobrina A. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med*. 1997 May 5;185(9):1619-27.

229. Bossi F, Fischetti F, Pellis V, Bulla R, Ferrero E, Mollnes TE, et al. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. *J Immunol.* 2004 Dec 1;173(11):6921-7.
230. Dobrina A, Pausa M, Fischetti F, Bulla R, Vecile E, Ferrero E, et al. Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. *Blood.* 2002 Jan 1;99(1):185-92.
231. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell.* 1986 Feb 28;44(4):517-8.
232. Robson SC, Candinas D, Hancock WW, Wrighton C, Winkler H, Bach FH. Role of endothelial cells in transplantation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995 Apr;106(4):305-22.
233. Saadi S, Platt JL. Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J Exp Med.* 1995 Jan 1;181(1):21-31.
234. Brooimans RA, Hiemstra PS, van der Ark AA, Sim RB, van Es LA, Daha MR. Biosynthesis of complement factor H by human umbilical vein endothelial cells. Regulation by T cell growth factor and IFN-gamma. *J Immunol.* 1989 Mar 15;142(6):2024-30.
235. Ripoché J, Mitchell JA, Erdei A, Madin C, Moffatt B, Mokoena T, et al. Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *J Exp Med.* 1988 Nov 1;168(5):1917-22.
236. Bongrazio M, Pries AR, Zakrzewicz A. The endothelium as physiological source of properdin: role of wall shear stress. *Mol Immunol.* 2003 Jan;39(11):669-75.
237. Dauchel H, Julien N, Lemercier C, Daveau M, Ozanne D, Fontaine M, et al. Expression of complement alternative pathway proteins by endothelial cells. Differential regulation by interleukin 1 and glucocorticoids. *Eur J Immunol.* 1990 Aug;20(8):1669-75.
238. Sheerin NS, Zhou W, Adler S, Sacks SH. TNF-alpha regulation of C3 gene expression and protein biosynthesis in rat glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* 1997 Mar;51(3):703-10.
239. Yamanaka A, Kosugi S, Konishi E. Infection-enhancing and -neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *J Virol.* 2008 Jan;82(2):927-37.
240. Douradinha B, McBurney SP, Soares de Melo KM, Smith AP, Krishna NK, Barratt-Boyes SM, et al. C1q binding to dengue virus decreases levels of infection and inflammatory molecules transcription in THP-1 cells. *Virus Res.* 2014 Jan 22;179:231-4.
241. Fuchs A, Lin TY, Beasley DW, Stover CM, Schwaeble WJ, Pierson TC, et al. Direct complement restriction of flavivirus infection requires glycan recognition by mannose-binding lectin. *Cell Host Microbe.* 2010 Aug 19;8(2):186-95.
242. Nascimento EJ, Braga-Neto U, Calzavara-Silva CE, Gomes AL, Abath FG, Brito CA, et al. Gene expression profiling during early acute febrile stage of dengue infection can predict the disease outcome. *PLoS One.* 2009;4(11):e7892.
243. Avirutnan P, Hauhart RE, Marovich MA, Garred P, Atkinson JP, Diamond MS. Complement-mediated neutralization of dengue virus requires mannose-binding lectin. *MBio.* 2011;2(6).
244. Acioli-Santos B, Segat L, Dhalia R, Brito CA, Braga-Neto UM, Marques ET, et al. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum Immunol.* 2008 Feb;69(2):122-8.
245. Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1987 Sep;18(3):316-20.
246. Churdboonchart V, Bhamarapavati N, Futrakul P. Crossed immunoelectrophoresis for the detection of split products of the third complement in dengue hemorrhagic fever. I. Observations in patients' plasma. *Am J Trop Med Hyg.* 1983 May;32(3):569-76.

247. Nascimento EJ, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LH, Braga-Neto U, et al. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PLoS One*. 2009;4(8):e6782.
248. Pastor AF, Rodrigues Moura L, Neto JW, Nascimento EJ, Calzavara-Silva CE, Gomes AL, et al. Complement factor H gene (CFH) polymorphisms C-257T, G257A and haplotypes are associated with protection against severe dengue phenotype, possible related with high CFH expression. *Hum Immunol*. 2013 Sep;74(9):1225-30.
249. Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 3;362(4):1051-6.
250. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):6338-46.
251. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med*. 2010 Apr 12;207(4):793-806.
252. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol*. 2011 Jul 1;187(1):424-33.
253. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Feb;6(2):132-42.
254. Avirutnan P, Mehlhop E, Diamond MS. Complement and its role in protection and pathogenesis of flavivirus infections. *Vaccine*. 2008 Dec 30;26 Suppl 8:I100-7.
255. Ramadass M, Ghebrehiwet B, Smith RJ, Kew RR. Generation of multiple fluid-phase C3b:plasma protein complexes during complement activation: possible implications in C3 glomerulopathies. *J Immunol*. 2014 Feb 1;192(3):1220-30.
256. Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Mol Biol Cell*. 2007 Dec;18(12):5014-23.
257. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*. 2009 Apr 17;30(4):556-65.
258. Tan TY, Chu JJ. Dengue virus-infected human monocytes trigger late activation of caspase-1, which mediates pro-inflammatory IL-1 $\beta$  secretion and pyroptosis. *J Gen Virol*. 2013 Oct;94(Pt 10):2215-20.
259. Heeger PS, Kemper C. Novel roles of complement in T effector cell regulation. *Immunobiology*. 2012 Feb;217(2):216-24.
260. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):981-6.
261. van Montfoort N, de Jong JM, Schuurhuis DH, van der Voort EI, Camps MG, Huizinga TW, et al. A novel role of complement factor C1q in augmenting the presentation of antigen captured in immune complexes to CD8 $^{+}$  T lymphocytes. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):7581-6.
262. Favoreel HW, Van de Walle GR, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Virus complement evasion strategies. *J Gen Virol*. 2003 Jan;84(Pt 1):1-15.
263. Stoiber H, Banki Z, Wilflingseder D, Dierich MP. Complement-HIV interactions during all steps of viral pathogenesis. *Vaccine*. 2008 Jun 6;26(24):3046-54.
264. Stoiber H, Pruenster M, Ammann CG, Dierich MP. Complement-opsonized HIV: the free rider on its way to infection. *Mol Immunol*. 2005 Feb;42(2):153-60.
265. Saifuddin M, Parker CJ, Peeples ME, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Ghassemi M, et al. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and

- CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. *J Exp Med.* 1995 Aug 1;182(2):501-9.
266. Rigau-Perez JG, Ayala-Lopez A, Garcia-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Oct;67(4):355-62.
267. Bosch I, Khaja 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.
268. Marinho CF, Azeredo EL, Torrentes-Carvalho A, Marins-Dos-Santos A, Kubelka CF, de Souza LJ, et al. Down-regulation of complement receptors on the surface of host monocyte even as in vitro complement pathway blocking interferes in dengue infection. *PLoS One.* 2014;9(7):e102014.
269. Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, Cooper NR. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol.* 1987 May;61(5):1416-20.
270. Tsoukas CD, Lambris JD. Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance. *Immunol Today.* 1993 Feb;14(2):56-9.
271. Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol.* 1993 Oct;67(10):6025-32.
272. Santoro F, Greenstone HL, Insinga A, Liszewski MK, Atkinson JP, Lusso P, et al. Interaction of glycoprotein H of human herpesvirus 6 with the cellular receptor CD46. *J Biol Chem.* 2003 Jul 11;278(28):25964-9.
273. Bernet J, Mullick J, Singh AK, Sahu A. Viral mimicry of the complement system. *J Biosci.* 2003 Apr;28(3):249-64.
274. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 2008 Dec;4(12):e1000244.
275. Cardoso MJ, Gordon S, Hirsch S, Springer TA, Porterfield JS. Interaction of West Nile virus with primary murine macrophages: role of cell activation and receptors for antibody and complement. *J Virol.* 1986 Mar;57(3):952-9.
276. Tjomsland V, Ellegard R, Che K, Hinkula J, Lifson JD, Larsson M. Complement opsonization of HIV-1 enhances the uptake by dendritic cells and involves the endocytic lectin and integrin receptor families. *PLoS One.* 2011;6(8):e23542.
277. Tjomsland V, Ellegard R, Burgener A, Mogk K, Che KF, Westmacott G, et al. Complement opsonization of HIV-1 results in a different intracellular processing pattern and enhanced MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2013 Jun;43(6):1470-83.
278. Ellegard R, Crisci E, Burgener A, Sjowall C, Birse K, Westmacott G, et al. Complement opsonization of HIV-1 results in decreased antiviral and inflammatory responses in immature dendritic cells via CR3. *J Immunol.* 2014 Nov 1;193(9):4590-601.
279. Gafa V, Manches O, Pastor A, Drouet E, Ambroise-Thomas P, Grillot R, et al. Human cytomegalovirus downregulates complement receptors (CR3, CR4) and decreases phagocytosis by macrophages. *J Med Virol.* 2005 Jul;76(3):361-6.
280. Sun P, Bauza K, Pal S, Liang Z, Wu SJ, Beckett C, et al. Infection and activation of human peripheral blood monocytes by dengue viruses through the mechanism of antibody-dependent enhancement. *Virology.* 2011 Dec 20;421(2):245-52.
281. Wu MF, Chen ST, Yang AH, Lin WW, Lin YL, Chen NJ, et al. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood.* 2013 Jan 3;121(1):95-106.



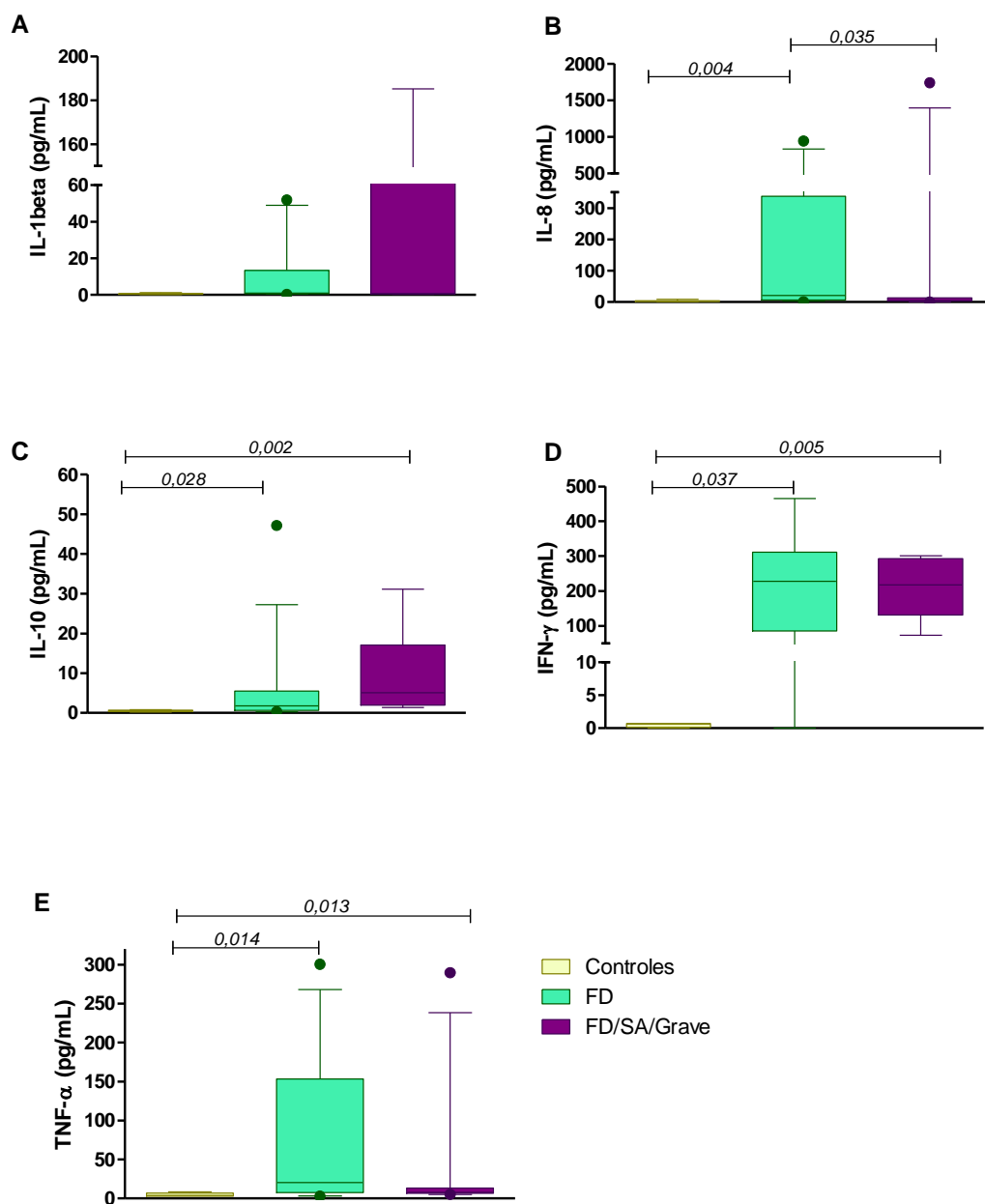
282. Dai S, Rajaram MV, Curry HM, Leander R, Schlesinger LS. Fine tuning inflammation at the front door: macrophage complement receptor 3-mediates phagocytosis and immune suppression for *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog*. 2013 Jan;9(1):e1003114.
283. Hajishengallis G, Shakhathreh MA, Wang M, Liang S. Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of *Porphyromonas gingivalis* and negates its virulence in vivo. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2359-67.
284. Stockl J, Majdic O, Pickl WF, Rosenkranz A, Prager E, Gschwantler E, et al. Granulocyte activation via a binding site near the C-terminal region of complement receptor type 3 alpha-chain (CD11b) potentially involved in intramembrane complex formation with glycosylphosphatidylinositol-anchored Fc gamma RIIB (CD16) molecules. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5452-63.
285. Zhou M, Todd RF, 3rd, van de Winkel JG, Petty HR. Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J Immunol*. 1993 Apr 1;150(7):3030-41.
286. Galon J, Gauchat JF, Mazieres N, Spagnoli R, Storkus W, Lotze M, et al. Soluble Fc gamma receptor type III (Fc gamma RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J Immunol*. 1996 Aug 1;157(3):1184-92.
287. Preynat-Seauve O, Villiers CL, Jourdan G, Richard MJ, Plumas J, Favier A, et al. An interaction between CD16 and CR3 enhances iC3b binding to CR3 but is lost during differentiation of monocytes into dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2004 Jan;34(1):147-55.
288. Zhou J, Feng G, Beeson J, Hogarth PM, Rogerson SJ, Yan Y, et al. CD14(hi)CD16+ monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med*. 2015;13:154.
289. Matsumoto AK, Martin DR, Carter RH, Klickstein LB, Ahearn JM, Fearon DT. Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J Exp Med*. 1993 Oct 1;178(4):1407-17.
290. Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol*. 2001 Jul 1;167(1):163-72.
291. Erdei A, Isaak A, Torok K, Sandor N, Kremlitzka M, Prechl J, et al. Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions. *Mol Immunol*. 2009 Sep;46(14):2767-73.
292. Young KA, Herbert AP, Barlow PN, Holers VM, Hannan JP. Molecular basis of the interaction between complement receptor type 2 (CR2/CD21) and Epstein-Barr virus glycoprotein gp350. *J Virol*. 2008 Nov;82(22):11217-27.
293. Asokan R, Hua J, Young KA, Gould HJ, Hannan JP, Kraus DM, et al. Characterization of human complement receptor type 2 (CR2/CD21) as a receptor for IFN-alpha: a potential role in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2006 Jul 1;177(1):383-94.
294. Letellier M, Sarfati M, Delespesse G. Mechanisms of formation of IgE-binding factors (soluble CD23)--I. Fc epsilon R II bearing B cells generate IgE-binding factors of different molecular weights. *Mol Immunol*. 1989 Dec;26(12):1105-12.
295. Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev*. 2001 Apr;180:112-22.
296. Fernandez-Arias C, Lopez JP, Hernandez-Perez JN, Bautista-Ojeda MD, Branch O, Rodriguez A. Malaria inhibits surface expression of complement receptor 1 in monocytes/macrophages, causing decreased immune complex internalization. *J Immunol*. 2013 Apr 1;190(7):3363-72.

297. Elsheikha HM, Sheashaa HA. Epidemiology, pathophysiology, management and outcome of renal dysfunction associated with plasmodia infection. *Parasitol Res.* 2007 Oct;101(5):1183-90.
298. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses.* 2010 Dec;2(12):2649-62.
299. Qu Z, Liang X, Liu Y, Du J, Liu S, Sun W. Hepatitis B virus sensitizes hepatocytes to complement-dependent cytotoxicity through downregulating CD59. *Mol Immunol.* 2009 Dec;47(2-3):283-9.
300. Takemoto M, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus 7 infection increases the expression levels of CD46 and CD59 in target cells. *J Gen Virol.* 2007 May;88(Pt 5):1415-22.
301. Hogasen K, Mollnes TE, Harboe M. Heparin-binding properties of vitronectin are linked to complex formation as illustrated by in vitro polymerization and binding to the terminal complement complex. *J Biol Chem.* 1992 Nov 15;267(32):23076-82.
302. de Boer HC, Preissner KT, Bouma BN, de Groot PG. Binding of vitronectin-thrombin-antithrombin III complex to human endothelial cells is mediated by the heparin binding site of vitronectin. *J Biol Chem.* 1992 Feb 5;267(4):2264-8.
303. Bjerre M, Holland-Fischer P, Gronbaek H, Frystyk J, Hansen TK, Vilstrup H, et al. Soluble membrane attack complex in ascites in patients with liver cirrhosis without infections. *World J Hepatol.* 2010 Jun 27;2(6):221-5.
304. Acosta J, Qin X, Halperin J. Complement and complement regulatory proteins as potential molecular targets for vascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2004;10(2):203-11.
305. Nauta AJ, Daha MR, Tijmsa O, van de Water B, Tedesco F, Roos A. The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur J Immunol.* 2002 Mar;32(3):783-92.
306. Gerritsma JS, Gerritsen AF, De Ley M, van Es LA, Daha MR. Interferon-gamma induces biosynthesis of complement components C2, C4 and factor H by human proximal tubular epithelial cells. *Cytokine.* 1997 Apr;9(4):276-83.
307. Brooimans RA, Stegmann AP, van Dorp WT, van der Ark AA, van der Woude FJ, van Es LA, et al. Interleukin 2 mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells. *J Clin Invest.* 1991 Aug;88(2):379-84.
308. Gerritsma JS, van Kooten C, Gerritsen AF, van Es LA, Daha MR. Transforming growth factor-beta 1 regulates chemokine and complement production by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 1998 Mar;53(3):609-16.
309. Marinho CF, Da Silva JB, Azeredo EL, Kubelka CF, de Souza LJ, da Cunha RV, et al. Frequency of circulating T lymphocytes expressing complement receptors in Dengue-infected patients. *Front Immunol Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015 - 11th Congress of the Latin American Association of Immunology - 10o Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología 2015.*
310. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Sep 28;107(39):16922-7.
311. de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Pova TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LD, et al. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS One.* 2012;7(7):e38527.
312. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2008 Apr;8(4):247-58.
313. Labalette M, Salez F, Pruvot FR, Noel C, Dessaint JP. CD8 lymphocytosis in primary cytomegalovirus (CMV) infection of allograft recipients: expansion of an

- uncommon CD8<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> subset and its progressive replacement by CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T cells. *Clin Exp Immunol*. 1994 Mar;95(3):465-71.
314. McFarland HI, Nahill SR, Maciaszek JW, Welsh RM. CD11b (Mac-1): a marker for CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *J Immunol*. 1992 Aug 15;149(4):1326-33.
315. Hogasen AK, Hestdal K, Hogasen K, Abrahamsen TG. Transforming growth factor beta modulates C3 and factor B biosynthesis and complement receptor 3 expression in cultured human monocytes. *J Leukoc Biol*. 1995 Feb;57(2):287-96.
316. Muto S, Vetvicka V, Ross GD. CR3 (CD11b/CD18) expressed by cytotoxic T cells and natural killer cells is upregulated in a manner similar to neutrophil CR3 following stimulation with various activating agents. *J Clin Immunol*. 1993 May;13(3):175-84.
317. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*. 2006 Feb-Mar;118(2-3):127-36.
318. Christmas SE, de la Mata Espinosa CT, Halliday D, Buxton CA, Cummerson JA, Johnson PM. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *Immunology*. 2006 Dec;119(4):522-8.
319. Alford SK, Longmore GD, Stenson WF, Kemper C. CD46-induced immunomodulatory CD4<sup>+</sup> T cells express the adhesion molecule and chemokine receptor pattern of intestinal T cells. *J Immunol*. 2008 Aug 15;181(4):2544-55.
320. Abid MR, Guo S, Minami T, Spokes KC, Ueki K, Skurk C, et al. Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb;24(2):294-300.
321. Halme J, Sachse M, Vogel H, Giese T, Klar E, Kirschfink M. Primary human hepatocytes are protected against complement by multiple regulators. *Mol Immunol*. 2009 Jul;46(11-12):2284-9.
322. Liu D, Ni B, Wang L, Zhang M, Liu W, Wu Y. Hepatitis B virus core protein interacts with CD59 to promote complement-mediated liver inflammation during chronic hepatitis B virus infection. *FEBS Lett*. 2013 Oct 11;587(20):3314-20.
323. Bajtay Z, Speth C, Erdei A, Dierich MP. Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J Immunol*. 2004 Oct 15;173(8):4775-8.
324. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jul;81(14):4510-4.
325. Kostavasili I, Sahu A, Friedman HM, Eisenberg RJ, Cohen GH, Lambris JD. Mechanism of complement inactivation by glycoprotein C of herpes simplex virus. *J Immunol*. 1997 Feb 15;158(4):1763-71.
326. Oleszak EL, Perlman S, Parr R, Collisson EW, Leibowitz JL. Molecular mimicry between S peplomer proteins of coronaviruses (MHV, BCV, TGEV and IBV) and Fc receptor. *Adv Exp Med Biol*. 1993;342:183-8.
327. Stoermer KA, Morrison TE. Complement and viral pathogenesis. *Virology*. 2011 Mar 15;411(2):362-73.
328. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 12;103(50):19111-6.

# 8. ANEXOS

## Anexo 1



**Anexo 1: Níveis séricos de citocinas em pacientes infectados pelo DENV e controles.** A dosagem das citocinas circulantes (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-8, (C) IL-10, (D) IFN-gama e (E) TNF-alfa no soro de controles saudáveis e em pacientes infectados pelo DENV foi realizada por ELISA ou Luminex. Gráficos representam as medianas e a variação interquartil (25 – 75%). Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney U. Valores de p estatisticamente significativos são demonstrado acima dos pares.

