

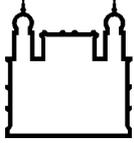
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

FREQUÊNCIA GÊNICA DOS ALELOS DE HLA CLASSE I E II E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM A RESPOSTA IMUNE CELULAR T FRENTE AO ANTÍGENO  
DENV-2 EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DENGUE

JÉSSICA BADOLATO CORRÊA DA SILVA

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*JÉSSICA BADOLATO CORRÊA DA SILVA*

#### **Frequência gênica dos alelos de HLA classe I e II e sua associação com a resposta imune celular T frente ao antígeno DENV-2 em pacientes infectados pelo vírus dengue**

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

**Orientadora: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto**

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2015

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

S586 Silva, Jéssica Badolato Corrêa da

Frequência gênica dos alelos de HLA classe I e II e sua associação com a resposta imune celular T frente ao antígeno DENV-2 em pacientes infectados pelo vírus dengue / Jéssica Badolato Corrêa da Silva. – Rio de Janeiro, 2015.

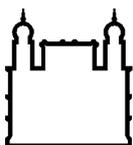
xviii, 109 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 89-101

1. Linfócitos T. 2. HLA. 3. Dengue. 4. Pacientes. 5. Brasil. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: JÉSSICA BADOLATO CORRÊA DA SILVA***

### **FREQUÊNCIA GÊNICA DOS ALELOS DE HLA CLASSE I E II E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RESPOSTA IMUNE CELULAR T FRENTE AO ANTÍGENO DENV-2 EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DENGUE**

**ORIENTADORA: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto**

**Aprovada em:**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior - IOC/FIOCRUZ - Presidente**

**Prof. Dra. Myrna Cristina Bonaldo - IOC/FIOCRUZ**

**Prof. Dra. Juliana Cardoso de Oliveira - UERJ**

**Prof. Dr. Marciano Viana Paes- IOC/FIOCRUZ**

**Prof. Dra. Joanna Reis Santos de Oliveira - IFRJ**

Rio de Janeiro, 17 de Dezembro de 2015

## DEDICATÓRIA

---

Dedico esta dissertação à minha família e a todos que tornaram este trabalho possível.

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.

Aos meus familiares, por todo o apoio, suporte e compreensão. Pessoas como vocês são nas quais me espelho. Obrigada por acreditarem na minha capacidade, me apoiarem em todas as minhas decisões e sempre investirem no meu futuro. Amo vocês mais do que tudo.

Aos meus grandes amigos pessoais e profissionais da família LIV pelo enorme prazer de trabalhar ao lado de ótimas pessoas, além de todo o aprendizado. Agradeço também às chefes de laboratório Elzinandes Azeredo e Claire Kubelka.

À Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto, pela oportunidade, confiança e atenção, e por ser um exemplo pessoal e profissional. Obrigada pelo carinho e por ser muito mais do que uma orientadora. Me espelharei em você para tentar ser uma profissional tão competente e completa quanto. Guardarei, com todo o carinho essa experiência no meu coração.

Ao Laboratório Flavivírus, pela parceria e auxílio, em especial à Msc. Nieli Faria por realizar os ensaios de confirmação, isolamento e crescimento de massa viral, além de ceder o antígeno viral.

Ao Laboratório de HLA da UERJ pela colaboração e realização da metodologia de tipagem. Em especial ao Dr. Luis Cristovão Porto e Dra. Juliana Oliveira.

Aos médicos colaboradores das epidemias, Dr. Rivaldo Venâncio da Costa, Dr. Luis José, Dr. Fernando Bozza e Dr. Paul Vieira, assim como a todos os pacientes voluntários, ao passo que sem eles, esse trabalho não seria realizado.

Aos componentes da banca por aceitarem o convite, em especial ao Dr. Josué da Costa Lima Junior por realizar muito mais do que uma colaboração, e sim contribuir para um aprendizado cada vez maior, sempre de forma paciente e bastante didática.

À plataforma de Citometria de Fluxo e EliSpot, por nos auxiliarem de modo eficaz sempre que necessário.

À secretaria de ensino do IOC, em especial à Rita, pela paciência, compreensão e eficiência.

Ao CNPq e IOC/FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

E a todos que fizeram parte dessa trajetória, e que, de certa forma, foram essenciais para a realização desta caminhada.

---

*“Um cientista no laboratório não é um mero técnico: é uma criança confrontando fenômenos naturais que são tão impressionantes quanto contos de fada”.*

Marie Curie

## RESUMO

---

O vírus dengue é caracterizado por quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a 4), apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, em que o risco de desenvolvimento das formas graves está parcialmente relacionado com a resposta imune de reatividade cruzada a sorotipos heterólogos. Os alelos do antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I e classe II têm sido correlacionados com a susceptibilidade à dengue grave em diferentes populações. Neste estudo, nosso objetivo foi associar a frequência dos alelos do HLA de classe I e II de pacientes com dengue, caracterizados pela infecção por diferentes sorotipos e apresentando diferentes manifestações clínicas, com as frequências de células T produtoras de IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B, e também com o perfil de ativação destas células em resposta ao antígeno total de DENV-2 (DENV-2 Ag). Utilizamos uma coorte de 60 pacientes naturalmente infectados de diferentes epidemias com prevalência de DENV-1, 2 e 4. Entre os pacientes, 36 deles foram classificados como dengue (FD) e 24 deles como FD com sinais de alerta mais graves (FDSA/Graves) de acordo com a OMS, 2009. A tipagem de alelos de HLA de classe I e II foi realizada utilizando Luminex de múltiplas análises (One Lambda, CA). As células de pacientes foram cultivadas com DENV-2 Ag (isolado de um paciente brasileiro) para a realização dos ensaios de FluoroSpot de IFN- $\gamma$ /IL-2/Granzima B. Em seguida, recuperamos gentilmente as células após a estimulação e realizamos a marcação extracelular com marcadores de ativação (CD45RO, CCR7 e CD62L) por citometria de fluxo. Para as análises estatísticas os testes T pareado, não paramétrico Mann Whitney U, Wilcoxon e as análises com o RATE foram utilizadas. Desta forma, a frequência gênica dos HLA classe I mais frequentes em nossa coorte de pacientes DENV+ (>5%) inclui 6 alelos HLA-A (A\*02, A\*30, A\*24, A\*03, A\*23 e A\*01), 7 alelos HLA-B (B\*51, B\*35, B\*44, B\*15, B\*07, B\*58 e B\*40), e 7 alelos HLA-C (C\*07, C\*04, C\*03, C\*06, C\*15, C\*08 e C\*05). Para o HLA de classe II, 4 alelos HLA-DQA1 (\*01, \*05, \*03 e \*02), 5 alelos HLA-DQB1 (\*03, \*02, \*06, \*05 e \*04) and 8 alelos HLA-DRB1 (\*13, \*04, \*03, \*07, \*11, \*01, \*15 e \*16). Destes, 2 alelos foram associados com aumento da susceptibilidade (alelo HLA-A\*03,  $p=0.024$ ) ou resistência (alelo HLA-B\*15,  $p=0.034$ ) ao desenvolvimento de FDSA/Grave. Além disso, 6 alelos foram associados com contagem de plaquetas abaixo de 150 mil/mm<sup>3</sup> (alelo HLA-B\*35,  $p=0.02$ , HLA-C\*04,  $p=0.04$  e supertipo A03,  $p=0.003$ ) ou acima de 150 mil/mm<sup>3</sup> (HLA-DQA1\*02,  $p=0.033$ , HLA-DRB1\*07,  $p=0.022$  e supertipo A24,  $p=0.03$ ). Nós demonstramos um aumento de células T produtoras de IFN- $\gamma$  específicas ao DENV-2 Ag em pacientes FD, mas não em pacientes FDSA/Grave, em comparação com a condição de estímulo basal. No entanto, nenhuma resposta restrita a alelos de HLA foi associada com células produtoras de IFN- $\gamma$ , mas o alelo HLA-C\*03 foi associado com células T produtoras de Granzima B após estimulação com DENV-2 Ag. Por fim, também avaliamos a frequência de subpopulações de linfócitos T. A maior parte da resposta de linfócitos T CD4+ após estímulo com DENV-2 Ag foi da subpopulação de linfócitos T CD4 CD45RO<sup>pos</sup>CCR7<sup>neg</sup>CD62L<sup>neg</sup>, caracterizado por linfócitos T de memória efetora/efetor. A ausência desta resposta foi associada ao alelo HLA-B\*58. Portanto, corroborando estudos anteriores, a expressão de certas moléculas de HLA contribuem com a susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento de formas graves da doença. Além disso, dois dos alelos mais frequentes em nossa coorte de pacientes parecem estar relacionados com uma resposta imune de alta magnitude, e, portanto, uma possível resposta imunoprotetora.

**Palavras-chaves:** 1. Linfócitos T. 2. HLA. 3. Dengue. 4. Pacientes. 5. Brasil.

## ABSTRACT

---

The dengue virus comprises four antigenically distinct serotypes (DENV-1 to 4), characterized by a broad spectrum of clinical manifestations, in which the risk of developing the severe forms is partially related to the cross-reactive immune responses with heterologous serotypes. Human leukocyte antigen (HLA) class I and class II alleles have been correlated with susceptibility to severe dengue in different populations. In this study, our goal is to associate the HLA class I and II allele frequency from dengue patients, characterized by different serotypes infection and clinical outcomes, with the frequencies of the IL-2, IFN- $\gamma$  and Granzyme B-producing T-cells and also with the profile of activation of these cells in response to DENV-2 antigen. We proceeded in a cohort of 60 naturally infected patients from different epidemics with prevalence of DENV-1, 2 and 4. Among patients, 36 of them classified as dengue fever (DF) and 24 of them as DF with warning signs plus severe (DFWS/S) according to WHO 2009. The profile of HLA class I and II alleles were typed using a Luminex Multi-analyte profiling system (One Lambda, CA). Cells from patients were cultured with DENV-2 Antigen (DENV-2 Ag isolated from a Brazilian patient) for realizing IFN- $\gamma$ /IL-2/Granzyme-B FluoroSpot assays. Then, we gently recovered these cells after stimulation and submitted them to the activation markers (CD45RO, CCR7 and CD62L) extracellular staining by flow cytometry assay. The paired t test, nonparametric t test Mann Whitney U, Wilcoxon and RATE analysis were used. Briefly, the genotypic frequency of the highly prevalent HLA class I found in our DENV-patients (>5%) included six HLA-A alleles (A\*02, A\*30, A\*24, A\*03, A\*23 and A\*01), seven HLA-B alleles (B\*51, B\*35, B\*44, B\*15, B\*07, B\*58 and B\*40), and seven HLA-C alleles (C\*07, C\*04, C\*03, C\*06, C\*15, C\*08 and C\*05). For HLA class II, four HLA-DQA1 alleles (\*01, \*05, \*03 and \*02), five HLA-DQB1 alleles (\*03, \*02, \*06, \*05 and \*04) and eight HLA-DRB1 alleles (\*13, \*04, \*03, \*07, \*11, \*01, \*15 and \*16). These two alleles were associated with increased susceptibility (HLA-A\*03 allele,  $p=0.024$ ) or resistance (HLA-B\*15 allele,  $p=0.034$ ) to DFWS/Severe DENV clinical outcomes. Besides, six alleles were associated with platelets count bellow 150 mil/mm<sup>3</sup> (HLA-B\*35 allele,  $p=0.02$ , HLA-C\*04,  $p=0.04$  and supertype A03,  $p=0.003$ ) or up 150 mil/mm<sup>3</sup> (HLA-DQA1\*02,  $p=0.033$ , HLA-DRB1\*07,  $p=0.022$  and supertype A24,  $p=0.03$ ). We demonstrated an increased DENV Ag-specific IFN- $\gamma$ -producing T cells in DF patients, but not in DFWS/Severe patients, in relation to unstimulated conditions. However, no HLA allele restricted responses were associated with the IFN- $\gamma$ -producing T cells, but HLA-C\*03 allele was associated with the granzyme B-producing T cells following DENV-2 Ag stimulation. In the same series of experiment, we also tested the frequency T cells subsets. The majority of the CD4<sup>+</sup> T-cell responses after DENV-2 Ag stimulation were CD45RO<sup>pos</sup>CCR7<sup>neg</sup>CD62L<sup>neg</sup> CD4 T-cells subsets, characterized by effector/effector memory T-cells. This response was mostly associated with HLA-B\*58 allele. Therefore, confirming previous studies the expression of certain HLA molecules contribute with susceptibility to or protection from severe clinical outcome. Moreover, two of the most frequent alleles seen in our patients appear to be involved in a higher magnitude of immune response and therefore a more immunoprotective response.

**Keywords:** 1. T cells. 2. HLA. 3. Dengue. 4. Patients. 5. Brazil

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.1.</b> Casos notificados de Dengue no período de 1986 até 2014 .....	3
<b>Figura 1.2.</b> Genoma do vírus Dengue (DENV) .....	4
<b>Figura 1.3.</b> Ciclo de replicação intracelular do vírus da dengue .....	8
<b>Figura 1.4.</b> Curso da dengue .....	10
<b>Figura 1.5.</b> Representação da região do genoma onde está localizado o complexo HLA .....	23
<b>Figura 1.6.</b> Estrutura da molécula do MHC classe I e II .....	24
<b>Figura 1.7.</b> Via do MHC Classe I de apresentação antigênica .....	25
<b>Figura 1.8.</b> Via do MHC Classe II de apresentação antigênica .....	27
<b>Figura 1.9.</b> Reconhecimento do complexo peptídeo-MHC pela célula T .....	28
<b>Figura 4.1.</b> Classificação dos casos de dengue e seus níveis de gravidade .....	37
<b>Figura 4.2.</b> Interface da ferramenta RATE .....	40
<b>Figura 4.3.</b> Interface da região de resultados do RATE .....	42
<b>Figura 4.4.</b> FluoroSpot de Células Produtoras de Spots para IFN- $\gamma$ , IL-2 e Granzima B de PBMCs pacientes DENV+ frente a diferentes antígenos .....	46
<b>Figura 5.1.</b> Frequência gênica dos 120 alelos HLA Classe I em pacientes-DENV+ .....	55
<b>Figura 5.2.</b> Frequência gênica dos 120 alelos HLA Classe II em pacientes-DENV+ .....	56
<b>Figura 5.3.</b> Células Formadoras de “Spots” (SFC) para IL-2, IFN- $\gamma$ e Granzima B em células de pacientes-DENV+ após estímulo policlonal com anti-CD3 .....	63
<b>Figura 5.4.</b> Células Formadoras de “Spots” (SFC) para IL-2 em células de pacientes-DENV+ após diferentes estímulos .....	64
<b>Figura 5.5.</b> Células Formadoras de “Spots” (SFC) para IFN- $\gamma$ em células de pacientes-DENV+ após diferentes estímulos .....	65
<b>Figura 5.6.</b> Células Formadoras de “Spots” (SFC) para Granzima B em células de pacientes-DENV+ após diferentes estímulos .....	66
<b>Figura 5.7.</b> Estratégia de gate .....	71
<b>Figura 5.8.</b> Frequência de células T de pacientes-DENV+ em diferentes status de diferenciação após diferentes estímulos .....	72

## LISTA DE QUADROS

---

<b>Quadro 1.1.</b> Associação entre alelos HLA Classe I com Susceptibilidade/Resistência a formas graves da Dengue .....	31
<b>Quadro 1.2.</b> Associação entre alelos HLA Classe II com Susceptibilidade/Resistência a formas graves da Dengue .....	32

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 4.1.</b> Detalhamento das diferentes epidemias utilizadas neste estudo .....	35
<b>Tabela 4.2.</b> <i>Cut off</i> das análises dos diferentes parâmetros na ferramenta RATE .....	41
<b>Tabela 4.3.</b> Combinação de anticorpos monoclonais para marcação extracelular por citometria de fluxo .....	47
<b>Tabela 4.4.</b> Combinação de marcadores para diferenciação de subpopulações de linfócitos T .....	48
<b>Tabela 5.1.</b> Características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes infectados pelo DENV .....	51
<b>Tabela 5.2.</b> Correlação entre os dados laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV .....	53
<b>Tabela 5.3.</b> Associação entre alelos HLA classe I e classificação clínica ...	57
<b>Tabela 5.4.</b> Associação entre alelos HLA classe I e II e contagem de plaquetas .....	58
<b>Tabela 5.5.</b> Associação entre supertipos de HLA classe I e contagem de plaquetas .....	59
<b>Tabela 5.6.</b> Peptídeos preditos a partir da proteína não estrutural NS3 .....	61
<b>Tabela 5.7.</b> Número de células formadoras de “Spots” de IL-2, IFN- $\gamma$ e Granzima B dos pacientes DENV+ frente aos diferentes estímulos de acordo com a forma clínica do paciente-DENV+ .....	67
<b>Tabela 5.8.</b> Número de células formadoras de “Spots” de IL-2, IFN- $\gamma$ e Granzima B dos pacientes DENV+ frente aos diferentes estímulos de acordo com o sorotipo viral infectante do paciente-DENV+ .....	68
<b>Tabela 5.9.</b> Associação entre alelos HLA e a liberação de Granzima B frente a estímulo com Ag DENV-2 em pacientes infectados pelo DENV .....	69
<b>Tabela 5.10.</b> Associação entre alelos HLA e a frequência de perfis de diferenciação de pacientes infectados pelo DENV .....	73

## LISTA DE AVREVIATURA E SIGLAS

---

ACD = Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose

ADE = Facilitação dependente de anticorpo (do inglês *antibody-dependent enhancement*).

Ag = Antígeno

ALT/TGP = Alanina Aminotransferase/ Transaminase glutâmico-pirúvica

APC = Célula apresentadora de antígenos (do inglês *antigen-presenting cell*)

AST/TGO = Aspartato Aminotransferase/Transaminase Glutâmico-Oxalacética

BSA = Albumina Bovina.

CD209 = Também chamado de DC-SIGN.

DCs = Células dendríticas.

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

DEN = Dengue.

DENV = Vírus da Dengue.

DENV-1 = Vírus da Dengue sorotipo 1.

DENV-2 = Vírus da Dengue sorotipo 2.

DENV-3 = Vírus da Dengue sorotipo 3.

DENV-4 = Vírus da Dengue sorotipo 4.

DI = Domínio I

DII = Domínio II

DIII = Domínio III

DMSO = Dimetil Sulfóxido (do inglês *Dimethyl sulfoxide*).

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

FACS = Técnica de citometria de fluxo.

Fc = Fragmento cristalizado.

FcR $\gamma$  = Receptor para porção Fc de anticorpos classe  $\gamma$  (G).

FD = Febre do Dengue.

FD com SA = Dengue com sinais de alerta

FD sem AS = Dengue sem sinais de alerta

FHD = Febre Hemorrágica do Dengue.

FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz

FLAVIDB = Banco de Dados de Flavivírus (do inglês *Flavivirus Database*)

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

HLA = Antígeno Leucocitário Humano (do inglês *Human leukocyte antigen*)  
IC = Concentração Inibitória  
IEDB = Banco de Dados de Epitopos Imunes (do inglês, *Immune Epitope Database*)  
IFN = Interferon.  
IFN- $\alpha$  = Interferon alfa.  
IFN- $\beta$  = Interferon beta.  
IFN- $\gamma$  = Interferon gama.  
IgG = Imunoglobulina G  
IgM = Imunoglobulina M  
IL-1 = Interleucina -1.  
IL-10 = Interleucina -10.  
IL-12 = Interleucina -12.  
IL-13 = Interleucina -13.  
IL-17 = Interleucina -17.  
IL-1 $\beta$  = Interleucina -1 beta.  
IL-2 = Interleucina -2.  
IL-2 = Interleucina -2.  
IL-21 = Interleucina -21.  
IL-4 = Interleucina -4.  
IL-5 = Interleucina -5.  
IL-6 = Interleucina - 6.  
IL-7 = Interleucina - 7.  
IL-8 = Interleucina - 8.  
IL-9 = Interleucina - 9.  
INI = Instituto Nacional de Infectologia (Também conhecido como IPEC)  
IOC = Instituto Oswaldo Cruz  
IOC = Instituto Oswaldo Cruz.  
JEV = Vírus da Encefalite Japonesa.  
L-15 = Leibovitz-15  
MCP-1 = Proteína quimioatrativa de monócitos-1 (do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*)  
MHC = Complexo de Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)  
MIF = Fator de inibição de migração de macrófagos

MIP-1 $\beta$  = Proteína Inflamatória de Macrófago-1 $\alpha$  (do inglês *Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$* ).

mNS1 = NS1 associada à membrana.

NK = Natural *Killer*.

NS = Proteína não-estrutural.

OMS = Organização Mundial de Saúde.

OPAS = Organização Pan-Americana de Saúde.

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

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

PBS = Tampão salina fosfato.

prM = Precursor da proteína M.

Proteína C = Proteína do Capsídeo.

Proteína E = Proteína do Envelope.

Proteína M = Proteína de Membrana.

RATE = do inglês *Restrictor Analysis Tool for Epitopes*

RE = Retículo Endoplasmático

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

RT-PCR = Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa

SCD = Síndrome do Choque do Dengue.

SE = Semana Epidemiológica

SFB = Soro Fetal Bovino.

SFCs = Células Formadoras de Spot

SNP = Polimorfismo de um único nucleotídeo (do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism*).

sNS1 = NS1 secretada.

SVS/MS = Secretaria de Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde.

Tc = fenótipo T *citotóxico*.

TCID<sub>50</sub> = 50% da dose de infecção de cultura de tecidos

TCR = Receptor de Célula T

Th = fenótipo T *helper*.

TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral  $\alpha$ .

UERJ = Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

UF = Unidade Federada

UFMS = Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

YFV = Vírus da Febre Amarela.

## SUMÁRIO

---

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>Parte 1: Dengue</b> .....	1
<b>1.1.1. Histórico Recente e Epidemiologia</b> .....	1
<b>1.1.2. Vírus Dengue</b> .....	4
<b>1.1.2.1. Estrutura Viral</b> .....	4
<b>1.1.2.2. Características Genômicas e Proteicas do DENV</b> .....	4
<b>1.1.2.3. Replicação Viral</b> .....	7
<b>1.1.3. Manifestações e Classificação Clínica segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde</b> .....	8
<b>1.1.3.1. Fases febril, Crítica (ou de Defervescência) e Convalescente</b> .....	10
<b>Parte 2: Imunopatogênese da Dengue</b> .....	13
<b>1.2.1. Mecanismos envolvidos na resposta imune efetora e imunopatogênese</b> .....	13
<b>1.2.1.1. Teoria da Virulência Viral</b> .....	13
<b>1.2.1.2. Teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE)</b> .....	14
<b>1.2.1.3. Teoria do mimetismo molecular</b> .....	16
<b>1.2.1.4. Tempestade de citocinas e extravasamento vascular</b> .....	17
<b>1.2.1.5. Teoria do pecado antigênico original</b> .....	18
<b>1.2.1.6. Teoria do polimorfismo genético</b> .....	22
<b>1.2.1.6.1. Antígeno Leucocitário Humano (HLA): Estrutura e função</b> .....	22
<b>1.2.1.6.1.1. Associação de alelos de HLA e Dengue</b> .....	29
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	34
<b>3.2. Objetivo Específicos</b> .....	34
<b>4 – METODOLOGIA</b> .....	35
<b>4.1. População de Estudo</b> .....	35
<b>4.2. Confirmação do Diagnóstico Laboratorial e Classificação Clínica dos Casos Confirmados</b> .....	36
<b>4.3. Isolamento e descongelamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)</b> .....	38
<b>4.4. Extração de DNA e Tipagem dos alelos dos HLA de Classe I e II dos pacientes infectados pelo DENV</b> .....	38
<b>4.5. Análise de Associação dos alelos de HLA</b> .....	40
<b>4.6. Predição de epítomos</b> .....	42
<b>4.7. Determinação do grau de conservação</b> .....	43

4.8. Isolamento de DENV-2 e Crescimento de Massa Viral utilizando Células C6/36 .....	44
4.9. Ensaio de FluoroSpot para IFN- $\gamma$ /IL-2 e IFN- $\gamma$ /Granzima B.....	45
4.10. Recuperação de Células da Metodologia de FluoroSpot .....	46
4.11. Marcação Extracelular por Citometria de Fluxo .....	47
4.12. Análises Estatísticas .....	48
<b>5 – RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
5.1. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV.....	49
5.2. Correlação entre os parâmetros laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV.....	52
5.3. Frequência gênica dos alelos de HLA Classe I e HLA Classe II dos pacientes .....	54
5.4. Associação entre alelos de HLA Classe I e II com as formas clínicas e contagem de plaquetas.....	57
5.5. Associação de Haplótipos de HLA classe I e II com as formas clínicas ....	58
5.6. Associação dos Supertipos HLA-A e HLA-B com formas clínicas e contagem de plaquetas.....	59
5.7. Predição de epítomos .....	59
5.8. Avaliação da resposta aos diferentes estímulos, incluindo a antígeno total de DENV-2 (0337/2008) das PBMCs de pacientes por FluoroSpot.....	62
5.9. Associação entre alelos de HLA e resposta de IL-2, IFN- $\gamma$ e Granzima B dos pacientes DENV+ frente aos estímulos DENV-2 Ag e anti-CD3 por FluoroSpot.....	69
5.10. Avaliação do status de diferenciação dos linfócitos T após diferentes estímulos, incluindo antígeno total de DENV-2 (0337/2008), recuperadas do Fluorospot, por Citometria de Fluxo.....	69
5.11. Correlação entre os status de diferenciação de linfócitos T com a contagem de spots de IL-2, IFN- $\gamma$ ou Granzima B após estímulo com antígeno total de DENV-2 (0337/2008) em pacientes .....	73
5.12. Associação entre alelos HLA classe I e II com a variação na frequência de células com <i>status</i> de diferenciação distintos após estímulo com antígeno total de DENV-2 .....	73
<b>6 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>8 – PERSPECTIVAS .....</b>	<b>88</b>
<b>9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>

# 1 – INTRODUÇÃO

## Parte 1: Dengue

### 1.1.1. Histórico Recente e Epidemiologia

A Dengue é uma das arboviroses de maior impacto na saúde pública mundial, com incidência de 50 a 100 milhões de infecções por ano no mundo, e ainda 2,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão (OMS, 2009). Seu agente etiológico é o vírus dengue (DENV), transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* em um ciclo humano-mosquito-humano. O DENV tem quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, -2, -3 e -4) que compartilham 65%-75% de homologia entre suas sequências de RNA. Infecções por qualquer um dos quatro sorotipos confere imunidade de longa duração para o sorotipo homólogo. Observa-se uma imunidade cruzada entre sorotipos logo após a infecção primária, porém, após 6 meses o hospedeiro torna-se suscetível aos demais sorotipos do DENV (Bhatt *et al.*, 2013).

Os primeiros relatos de uma doença com características similares à dengue foram documentados entre os anos de 1779 e 1788 (Gubler *et al.*, 2006). A primeira descrição de um surto de dengue no Brasil, com casos confirmados laboratorialmente, ocorreu na cidade de Boa Vista, Roraima, entre 1981 e 1982 (Abe *et al.*, 2012). Estima-se que, na época, cerca de 11 mil pessoas foram infectadas, marcando a introdução dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 no país (Osanai *et al.*, 1983). A propagação viral para o restante do país não ocorreu a partir desse episódio, devido à uma rápida contenção e também, pelo *Aedes aegypti* ainda não estar tão disperso no território brasileiro (Teixeira *et al.*, 1999).

Anos depois, em 1986, ocorreram epidemias em algumas capitais do Nordeste causadas pelo DENV-1, assim como sua reintrodução no Rio de Janeiro, em Nova Iguaçu, a 2ª maior Região Metropolitana do país (Schatzmayr *et al.*, 1986). A partir daí a dengue se disseminou com uma surpreendente força de transmissão para as cidades vizinhas, incluindo Niterói e Rio de Janeiro. Em 1986, mais de 33 mil casos foram notificados. Em 1987, São Paulo, Bahia e Minas Gerais foram acometidos por surtos localizados em pequenas cidades (Teixeira *et al.*, 1999). O DENV-4 entrou pela primeira vez no país em 1982,

através de Roraima, de onde chegou a se espalhar por alguns estados, porém nos anos seguintes sua ocorrência não foi mais notificada (Rocco *et al.*, 2012). Nos dois primeiros anos da década de 1990, a dengue permaneceu quase que exclusivamente nos estados do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e Pernambuco, com poucas notificações de casos oriundos do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Teixeira *at al.*, 1999). Nos anos seguintes, a circulação dos sorotipos virais DENV-1 e DENV-2, se expandiu rapidamente para outras áreas do território brasileiro, acompanhada da disseminação do mosquito vetor, o *Aedes aegypti* (Teixeira *et al.*, 2008).

Em 1999, o DENV-3 foi introduzido no território brasileiro em Limeira, São Paulo, porém sua confirmação e isolamento deram-se somente em 2001 no Rio de Janeiro. Este sorotipo foi considerado o mais virulento do país (Nogueira *et al.*, 2005). Assim, em 2002, foram confirmados cerca de 697 mil casos. Essa epidemia ocasionou uma célebre dispersão para outros estados, sendo que, em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos DENV 1, 2 e 3 (Barreto & Teixeira, 2008).

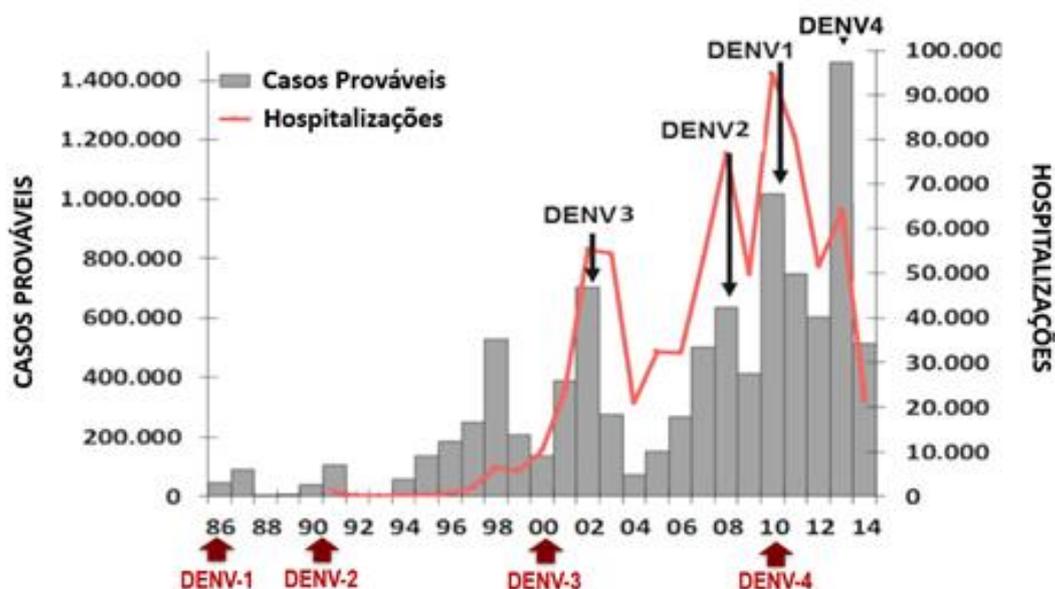
Desde os primeiros casos notificados no país, os adultos jovens eram os mais acometidos pela doença. No entanto, a partir de 2006, período em que o DENV-3 predominava, alguns estados apresentaram a recirculação do DENV-2. Esse panorama acarretou em um aumento do número de casos graves e de hospitalizações em crianças, sobretudo no Nordeste. Em 2008, novas epidemias causadas pelo DENV-2 ocorreram em diversos estados do país, assinalando o cenário mais grave da doença no Brasil em relação ao total de internações e de óbitos até o momento (MS, 2015).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou um total de 286.011 casos de dengue no país de janeiro a abril de 2012. Na análise comparativa em relação ao ano de 2011, foi observada redução de 44% dos casos. Apesar de todas as regiões apresentarem diminuição na transmissão da doença, algumas unidades federadas (UF) apresentaram aumento na incidência e no número absoluto de casos em 2012.

Em 2013, até 16 de fevereiro, foram notificados 204.650 casos no país. Deste total, 324 foram notificados como casos graves e 33 óbitos. Comparando esses resultados com igual período de 2012, nota-se um aumento de 190% dos

casos notificados, e uma importante redução de 44% nos casos graves e de 20% nos óbitos. Em relação à circulação viral, 52,6% das análises realizadas foram positivas para o DENV-4 (OPAS, 2013).

Em 2014, foram registrados 572.308 casos prováveis de dengue no país. Da semana epidemiológica (SE) 01 até a 47, foram confirmados 673 casos de dengue grave e 8.047 casos com sinais de alarme. Houve também confirmação de 400 óbitos, o que representa uma redução no país de 39% em comparação com o mesmo período de 2013. As proporções dos sorotipos virais identificados foram: DENV1 (82%), seguido de DENV4 (16,1%), DENV2 (1,5%) e DENV3 (0,5%) (OPAS, 2014) (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Casos notificados de Dengue no período de 1986 até 2014.** Setas vermelhas representam introdução dos sorotipos. Setas pretas, sorotipos prevalentes nas epidemias. Fonte: Boletim Epidemiológico, volume 46, nº 18 – Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2014.

Em 2015, foram registrados 1.125.955 casos suspeitos de dengue no país até a 23ª SE (04/01/15 a 13/06/15). As proporções dos sorotipos virais identificados foram: DENV-1 (93,2%), seguido de DENV-4 (5,6%), DENV-2 (0,9%) e DENV-3 (0,3%) (OPAS, 2015). Oitocentos e quarenta e um casos de dengue grave e 11.900 casos de dengue com sinais de alarme foram confirmados. Houve também confirmação de 434 óbitos, o que representa um aumento no país de 42% em comparação com o mesmo período de 2014.

## 1.1.2. Vírus Dengue

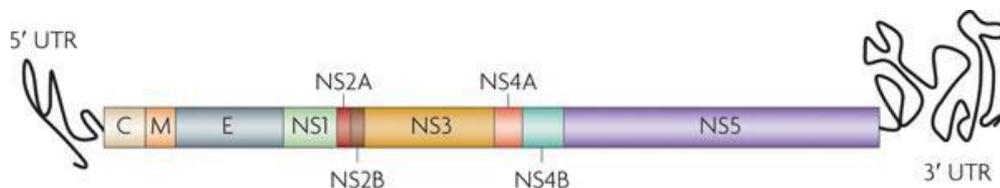
### 1.1.2.1. Estrutura Viral

O vírus dengue (DENV) é um representante do grupo B dos arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*. O DENV apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos e sorologicamente relacionados, conhecidos como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (revisado por Rothman, 2011).

Como um integrante da família *Flaviviridae*, o DENV possui um envelope formado por uma bicamada lipídica, no qual são inseridas as proteínas do envelope (E) e de membrana (M). A partícula viral tem formato esférico e diâmetro de aproximadamente 50 nm. Abaixo do envelope viral há um nucleocapsídeo com diâmetro de aproximadamente 30 nm, composto por um capsídeo viral icosaédrico, formado pela proteína do capsídeo (C) e complexo a uma molécula de RNA fita simples, com polaridade positiva (Lindenbach & Rice, 2001; Kuhn *et al.*, 2002).

### 1.1.2.2. Características Genômicas e Proteicas do DENV

O RNA viral tem aproximadamente 10,7 Kb e apresenta uma única fase aberta de leitura que codifica uma poliproteína precursora das proteínas virais. Esta proteína precursora é clivada tanto por proteases celulares do hospedeiro quanto pela protease viral, gerando três proteínas estruturais, C, pré-Membrana (prM)/M, E, e sete não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (revisado por Guzman *et al.*, 2010) (Figura 1.2).



**Figura 1.2. Genoma do vírus Dengue (DENV).** Imagem representativa do genoma do DENV, destaca-se a região que codifica as proteínas estruturais, como a do capsídeo (C), membrana (M – transcrita na sua forma precursora pre-M) e a do envelope (E); além da região que codifica as proteínas não-estruturais, como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. **Fonte:** Adaptado de Guzman *et al.*, 2010.

A proteína C (capsídeo) tem peso molecular em torno de 13,5 kDa e é o primeiro polipeptídeo sintetizado durante a tradução. Possui uma alta proporção de aminoácidos básicos que parecem neutralizar a carga negativa da molécula de RNA viral com a qual está associada. Sua porção central contém domínios hidrofóbicos que interagem com membranas celulares, tendo um papel na montagem da partícula viral (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

A glicoproteína prM, de aproximadamente 26 kDa, é gerada pela clivagem da sua região N-terminal no retículo endoplasmático durante o processamento da poliproteína viral. Aparentemente, essa proteína funciona impedindo que a proteína E sofra mudanças conformacionais durante o seu trânsito em compartimentos ácidos na fase de maturação do vírus. Acredita-se que a proteína prM, antes de ser clivada durante a maturação viral, poderia assessorar a montagem da proteína E, agindo como uma chaperona (Kuhn *et al.*, 2002). A porção N-terminal dessa proteína é clivada durante o transporte pelo complexo de Golgi, originando a proteína M presente na partícula madura (revisado por Stiasny & Heinz, 2006).

A proteína E, a maior proteína viral com 495 aminoácidos, apresenta-se como o principal componente da superfície dos virions de flavivírus. É glicosilada e tem peso molecular de aproximadamente 53 kDa. Esta proteína é formada por 3 domínios estruturais (DI, DII e DIII) separados por uma região com dois domínios transmembranares que ancoram a proteína à membrana do envelope do vírus (Lee *et al.*, 1997). Está envolvida com várias funções biológicas, tais como: ligação aos receptores das células-alvo e endocitose do vírus; indução da produção de anticorpos neutralizantes; hemaglutinação de eritrócitos e montagem da partícula viral (Kuhn *et al.*, 2002).

A glicoproteína NS1 possui 45-48 kDa e é essencial para a viabilidade do DENV, contudo, pouco é conhecido sobre o papel desta proteína. Durante a infecção viral, a NS1 é translocada pela via do retículo endoplasmático utilizando a sequência sinal localizada na região C-terminal da proteína E. Este peptídeo sinal é clivado por uma peptidase sinal da célula hospedeira, gerando a porção N-terminal da proteína NS1 (Falgout *et al.*, 1989). A proteína NS1 é translocada pela via secretora e permanece ancorada à membrana plasmática da célula infectada ou secretada para o meio extracelular na forma de hexâmeros

(Flamand *et al.*, 1999). A NS1 circulante (sNS1) foi detectada em amostras de soro de pacientes na fase aguda. Em culturas de células infectadas, os níveis de sNS1 no sobrenadante das culturas correlacionam-se com os títulos de vírus infecciosos (Libraty *et al.*, 2002).

Pouco é descrito sobre a atividade das pequenas proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A e NS4B. A proteína NS4A aparentemente funciona como âncora da replicase viral à membrana celular. A proteína NS4B parece auxiliar na modulação da replicação viral em associação à NS3 (Preugschat & Strauss, 1991). Além disso, essas proteínas poderiam também atuar na inibição da resposta aos interferon- $\alpha/\beta$  em indivíduos infectados (Umareddy *et al.*, 2006).

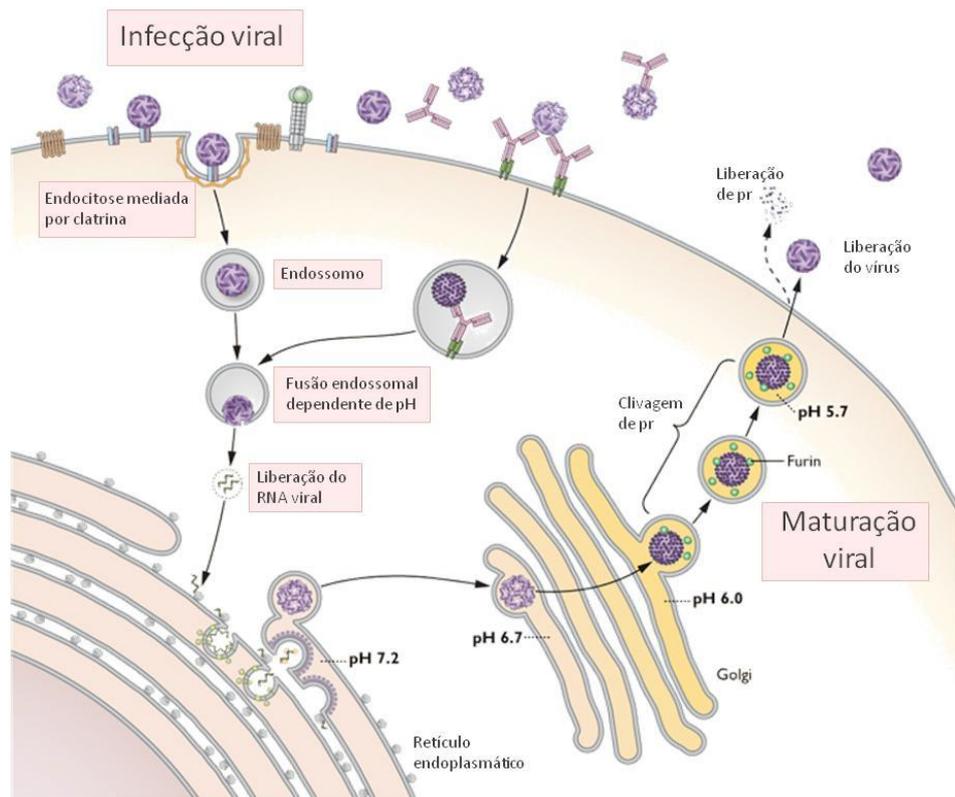
A NS3 é uma proteína de aproximadamente 70 kDa, bastante conservada entre os flavivírus, que participa da replicação do DENV. Esta proteína apresenta múltiplas atividades enzimáticas, incluindo um domínio serino-protease localizado na região N-terminal, enquanto que sua porção C-terminal apresenta atividades de helicase, nucleosídeo 5' trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase 5' terminal (RTPase) (Qi *et al.*, 2008). A função helicase não está completamente esclarecida, mas pode atuar dissociando a estrutura dupla-fita durante a replicação do RNA viral ou desdobrar estruturas secundárias envolvidas no início da síntese de RNA. Esta atividade é dependente de energia, que é fornecida pela atividade NTPase que hidrolisa ATP (Sampath *et al.*, 2006). A função RTPase é provavelmente necessária para a remoção do grupo fosfato 5'-terminal e formação da estrutura de *cap* do RNA viral (Qi *et al.*, 2008).

A proteína NS5 apresenta três atividades enzimáticas essenciais para replicação viral. Aproximadamente 320 resíduos da porção N-terminal compreendem uma metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina, que apresenta atividade de metiltransferase e guanililtransferase. A região C terminal da NS5 é uma RNA polimerase dependente de RNA, que atua na síntese do RNA intermediário que serve de molde para transcrição da fita positiva de RNA (Qi *et al.*, 2008).

### 1.1.2.3. Replicação Viral

A infecção pelo DENV inicia-se com a picada do mosquito e liberação dos vírus juntamente com a secreção salivar do vetor. A partícula viral interage com a membrana plasmática da célula alvo e é internalizada (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). A glicoproteína do envelope (E) é responsável tanto pela ligação do DENV ao receptor da célula-alvo, quanto pelo processo de fusão com a membrana celular do endossomo e liberação de componentes virais no citoplasma da célula-alvo. Desta maneira, a correta organização da proteína E é essencial durante as fases de adsorção e penetração (Henchal & Putnak, 1990). O DENV entra por endocitose mediada por clatrina na qual a proteína E ou glicoproteínas do DENV atuam como ligantes para diversos receptores celulares, como por exemplo, o DC-SIGN/CD209 (*dendritic cell ICAM-3 grabbing nonintegrin*) presente em subpopulações de células dendríticas (DC; *dendritic cell*) (revisado por De La Guardia & Lieonard, 2014). O ambiente acidofílico do endossomo é responsável por desencadear uma mudança conformacional irreversível nas glicoproteínas de fusão, resultando na fusão das membranas viral e celular (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

A bicamada lipídica do DENV é obtida por brotamento no retículo endoplasmático celular e possui em sua composição a proteína do envelope (E) e a proteína precursora da membrana (prM). A partícula viral imatura passa pela via secretória e a prM é clivada por uma furino-protease, passando a assumir sua forma madura, a proteína de membrana (M). A clivagem permite a exposição de partes da proteína E, facilitando a saída do vírus por exocitose (Modis *et al.*, 2003). A clivagem de prM em M é fundamental para a infectividade do vírus, uma vez que partículas imaturas são incapazes de promover a fusão do vírus com as membranas celulares, inclusive com a do endossomo. Todavia, a maturação da partícula a torna mais lábil e menos resistente, enquanto que a partícula imatura inerte, é mais estável (Henchal & Putnak, 1990) (Figura 1.3).



**Figura 1.3. Ciclo de replicação intracelular do vírus da dengue.** O DENV se liga e entra por meio de vários receptores celulares, via endocitose mediada por receptor (RME, *receptor-mediated endocytosis*). A acidificação endossomal resulta em uma trimerização irreversível da proteína viral E, expondo o domínio de fusão. Com a perda do capsídeo, o RNA viral é traduzido nas membranas do retículo endoplasmático (RE) onde é processado em três proteínas estruturais e sete não estruturais. Após o complexo de replicação viral ser sintetizado, a tradução do RNA viral se encerra e inicia-se a síntese de RNA. Em seguida, sucessivos ciclos de tradução são seguidos pela montagem no RE. O virion sofre um processo de maturação no complexo de Golgi e é finalmente eliminado das células através da via de secreção do hospedeiro. **Fonte:** Adaptado de PIERSON, T. C. e DIAMOND, M. S. **Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses.** *Curr Opin Virol.* 2(2):168-75. 2012

### 1.1.3. Manifestações e Classificação Clínica segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde

A Dengue tem um amplo espectro de apresentações clínicas, muitas vezes com evoluções clínicas imprevisíveis. Enquanto a maioria dos pacientes se recupera após um curso-clínico autolimitado brando, uma pequena parcela progride para a forma grave da dengue, principalmente caracterizada por extravasamento plasmático, na presença ou não de hemorragias (Srikiatkachorn *et al.*, 2011).

Em 1997, a Organização Mundial de Saúde (OMS) agrupou as infecções sintomáticas da dengue em três categorias: Febre Indiferenciada, Febre do Dengue (DF) e Dengue Hemorrágica (FHD). A FHD foi classificada em quatro graus de gravidade, sendo os graus III e IV definidos como Síndrome do Choque do Dengue (SCD). Dificuldades na aplicação dos critérios de FHD na situação clínica, preferencialmente na América Latina, juntamente com o aumento de casos de dengue clinicamente graves que não se incluíam nos rigorosos critérios de FHD, incentivou a revisão dessa classificação (Yacoub *et al.*, 2013). A partir de 2009, a OMS passou a classificá-la binariamente como Dengue e Dengue Grave, analisando os sinais de alerta. Atualmente, esta nova classificação é aplicada agrupando os pacientes em três critérios de gravidade:

(1) Dengue sem Sinais de Alarme (FD), caracterizado por náusea, vômitos, erupções cutâneas, mialgia, artralgia, cefaléia, leucopenia, prova do laço positivo sem sinais de hemorragia;

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

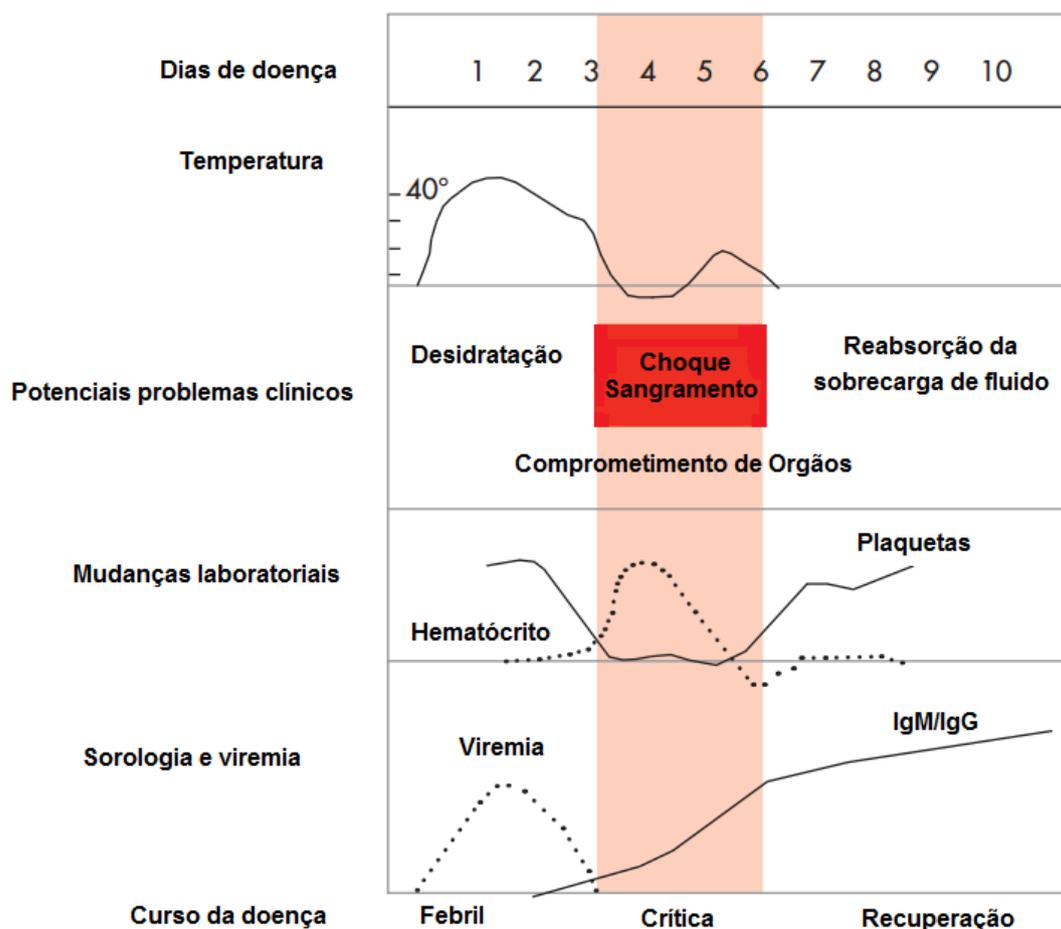
(3) Dengue Grave (Grave), caracterizado por extravasamento plasmático grave, podendo levar ao choque e acúmulo de fluidos acompanhado de desconforto respiratório, hemorragias graves e comprometimento de órgãos como fígado, coração, sistema nervoso central (com perda de consciência), dentre outros (Gan *et al.*, 2013; Yacoub *et al.*, 2013).

Gan e colaboradores (2013) realizaram um estudo retrospectivo para comparar as classificações da OMS de 2009 e 1997, utilizando as classificações de casos de dengue confirmados em epidemias de Singapura em 2004 e 2007 com predominância de DENV-1 e 2, respectivamente. As duas classificações de dengue da OMS foram discordantes na definição de doença grave. Cinco pacientes SCD (15%) foram classificados como dengue não grave, sem sinais de alerta. Dos pacientes graves, 107 não cumpriam os critérios de FHD. Destes, 14,9% apresentaram transaminases elevadas, 18,7% sangramento gastrointestinal, sem comprometimento hemodinâmico e 56,1% extravasamento de plasma com taquicardia isolada. Além disso, os autores discutem que apesar

da classificação da OMS de 2009 ser clinicamente útil, manter critérios de extravasamento de plasma e comprometimento hemodinâmico da diretriz da OMS de 1997 e definições de hemorragia grave e insuficiência de órgãos, pode melhorar a relevância clínica após ter constatado que as diferenças nestes aspectos representaram a discordância entre as classificações.

### 1.1.3.1. Fases febril, Crítica (ou de Defervescência) e Convalescente

Segundo o Tratado de Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle (TRS/OMS, 2009), a dengue é caracterizada por um período de incubação, que varia entre 4 a 10 dias. A doença começa abruptamente seguida por 3 fases – febril, crítica e de recuperação (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Curso da dengue.** Nesta imagem são representadas as fases do curso clínico da doença: fase febril, crítica e de recuperação. Estão representadas ainda as cinéticas de temperatura, parâmetros laboratoriais, sorologia e viremia de acordo com os dias de doença. **Fonte:** Adaptado de *Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. OMS, 2009.

Pacientes tipicamente desenvolvem febre alta de forma abrupta, com duração entre 2-7 dias, acompanhada frequentemente de rubor facial, eritema, dor no corpo, mialgia, artralgia e dor de cabeça (Rigau-Perez *et al.*, 1998). Alguns pacientes podem apresentar dor de garganta, faringite e irritação conjuntival. Anorexia, náusea e vômito são comuns. Isto pode dificultar o diagnóstico clínico de dengue ou de outras doenças febris. A prova do laço positiva nesta fase aumenta a probabilidade de dengue (Kalayanarooj *et al.*, 1997). Essas manifestações clínicas não distinguem a evolução clínica dos casos de dengue branda e grave. Portanto, o monitoramento dos sinais de alarme e outros parâmetros clínicos é crucial para o reconhecimento da progressão para a fase crítica.

Manifestações hemorrágicas leves como petéquias e sangramentos de mucosas (como nariz e gengiva), podem ser observados (Kalayanarooj *et al.*, 1997; Balmaseda *et al.*, 2005). Sangramentos vaginal maciço (em mulheres com idade reprodutiva) e gastrointestinal podem ocorrer durante esta fase, mas não são comuns (Balmaseda *et al.*, 2005). O fígado pode apresentar hipertrofia e sensibilidade após alguns dias de febre (Kalayanarooj *et al.*, 1997). A primeira anormalidade no hemograma total é a diminuição progressiva da contagem total de leucócitos.

No momento de defervescência, a temperatura cai para 37,5-38°C e permanece abaixo deste nível. Essa fase se dá frequentemente nos dias 3-7, em que se observa aumento na permeabilidade capilar em paralelo com aumento do hematócrito (Srikiatkhachorn *et al.*, 2007; Nimmannitya *et al.*, 1969). É o início da fase crítica. O período de extravasamento plasmático frequentemente ocorre nas últimas 24-48 horas nesta fase.

Leucopenia progressiva (Kalayanarooj *et al.*, 1997) seguida pela rápida diminuição na contagem de plaquetas usualmente precede o extravasamento plasmático. Neste ponto, pacientes podem se recuperar, enquanto aqueles com alteração na permeabilidade endotelial podem piorar clinicamente, resultando em uma grande perda de volume de plasma. Derrame pleural e ascite podem ser clinicamente detectáveis dependendo do grau de extravasamento plasmático e volume de fluidoterapia (OMS, 2009).

O choque hipovolêmico ocorre quando um volume crítico de plasma é perdido, o que é frequentemente precedido por sinais de alarme. Com o choque prolongado e consequente hipoperfusão, resulta em dano aos órgãos, acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada. O que, por sua vez, leva a hemorragias graves causando a diminuição do hematócrito. Inversamente, nesta fase a contagem de leucócitos total pode aumentar em pacientes com sangramentos graves. Alternativamente, podem ocorrer hepatites, encefalite ou miocardite e/ou sangramento grave sem a presença prévia de extravasamento plasmático ou choque (Martinez-Torres *et al.*, 2008).

Aqueles pacientes que melhoram após a fase de defervescência são classificados como Febre do Dengue. Em geral, ocorre reabsorção gradual de fluido dos compartimentos extravasculares e o bem-estar geral melhora. A contagem de leucócitos começa a subir logo após a fase de defervescência, no entanto, a recuperação da contagem de plaquetas é tipicamente mais tardia. Aqueles que não se recuperam, manifestando os sinais de alarme, são classificados como Febre do Dengue com Sinais de Alarme. Casos de dengue com sinais de alarme frequentemente se recuperam após reidratação intravenosa precoce. No entanto, alguns casos podem evoluir para dengue grave. (OMS, 2009)

Pacientes com dengue grave podem ter alterações da coagulação, mas estas geralmente não são suficientes para causar hemorragia grave. Quando a hemorragia grave ocorre, é quase sempre associada com choque hipovolêmico profundo uma vez que este, em combinação com trombocitopenia, hipóxia e acidose, pode levar à falência de múltiplos órgãos e avançar para coagulação intravascular disseminada. Hemorragia maciça pode ocorrer, sem choque prolongado, em casos em que o ácido acetilsalicílico, ibuprofeno ou corticosteróides tenham sido administrados (OMS, 2009).

Manifestações incomuns, incluindo insuficiência hepática aguda e encefalopatia, podem ser observados mesmo na ausência de perda de grandes quantidades de fluido ou choque. Cardiomiopatia e encefalite são também relatados em alguns casos de dengue. No entanto, a maioria das mortes por dengue ocorrem em pacientes com choque profundo, especialmente se a situação é complicada pela sobrecarga de líquidos (OMS, 2009).

## **Parte 2: Imunopatogênese da Dengue**

### **1.2.1. Mecanismos envolvidos na resposta imune efetora e imunopatogênese**

Quatro sorotipos do Dengue têm sido descritos, DENV 1-4 (Hammon *et al.*, 1960) e compartilham cerca de 65-75% da totalidade de seu genoma. Cada infecção resulta em uma imunidade de longa duração para o sorotipo homólogo, contudo, a alta divergência entre suas sequências não permite uma proteção contra sorotipos heterólogos (Rothman, 2004). Estudos sugerem que em uma infecção secundária por um sorotipo diferente seria um risco para a forma grave da doença (Sangkawibha *et al.*, 1984; Guzman *et al.*, 1990). Inúmeros conceitos imunológicos têm surgido para explicar esse fenômeno, entre os quais, a teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE) e a teoria do pecado antigênico original de células T (Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Além da infecção primária por um sorotipo, outros fatores influenciam na gravidade da doença como a cepa viral, idade, gênero, *status* nutricional e o *background* genético do paciente (Weiskopf & Sette, 2014). No entanto, a patogênese ainda é um desafio e apesar da Dengue estar sendo descrita e estudada por mais de 50 anos, ainda não existe uma compreensão clara acerca do tema.

#### **1.2.1.1. Teoria da Virulência Viral**

Defendida por Rosen (1977), a capacidade de virulência de determinadas cepas virais estaria relacionada as formas graves da dengue. Estudos filogenéticos e epidemiológicos vem demonstrando que determinados genótipos são capazes de produzir maior incidência da doença grave, como no caso da cepa DENV-2 do Sudeste Asiático que está mais relacionada a dengue grave quando comparada à cepa DENV-2 Americana (Watts *et al.*, 1999).

Uma análise recente de 1827 sequências completas do gene da proteína E apoia a existência de 6 genótipos para o DENV-2: Asiático I, Asiático II, Sudeste Asiático/Americano, Cosmopolita, Americano e Silvático (Chen & Vasilakis, 2011). Faria e colaboradores (2013) realizaram a caracterização e análises filogenéticas do DENV-2 durante 20 anos de atividade viral no Brasil.

As cepas virais sequenciadas foram isoladas de pacientes apresentando diferentes manifestações da doença, representando 6 estados do país, de 1990 a 2010. Os autores não observaram diferenças consistentes no gene da proteína E nas cepas isoladas de casos com diferentes classificações clínicas, sugerindo que se a severidade da doença tem uma origem filogenética, não estaria relacionada a diferenças observadas no gene E. As análises baseadas no sequenciamento do genoma parcial e/ou completo caracterizaram as cepas DENV-2 brasileiras como pertencentes ao genótipo Sudeste Asiático, no entanto, identificaram duas linhagens dentro do mesmo genótipo. Desta forma, os autores estabeleceram que cepas circulantes antes da emergência do DENV-2 (1990-2003) pertencem ao genótipo do Sudeste Asiático, linhagem II. Além disso, todas as cepas analisadas apresentavam uma aspargina (N) na região E390, previamente identificada como um possível marcador genético para a virulência observada em cepas causadoras de FHD de origem asiática.

Tem sido observado, ainda, que infecções por diferentes sorotipos podem estar relacionadas com a gravidade da doença. Sendo assim, Fried e colaboradores (2010) observaram que o DENV-2 parece estar associado com FHD grau I quando comparado com DENV-1. Em relação a análise de infecções secundárias, eles observaram que DENV-2 e 3 eram duas vezes mais relacionados com FHD do que o DENV-4. Portanto, dos 4 sorotipos do DENV, o DENV-2 e 3 tem sido associado com surtos de dengue grave enquanto que o DENV-1 e 4 estão frequentemente associados com uma doença branda (Yacoub *et al.*, 2013). Além disso, um estudo prospectivo da epidemia de 1980 na Tailândia revelou que infecções primárias por DENV-1, 3 ou 4, em ordem descendente de magnitude, seguido da secundária pelo DENV-2 são fatores de risco potenciais para a SCD (Sangkawibha *et al.*, 1984).

#### **1.2.1.2. Teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE)**

Os principais alvos dos anticorpos de neutralização anti-DENV são as proteínas E, prM/M e a NS1. Dentre os anticorpos de neutralização direcionados para a proteína E, o domínio DIII é um dos, mas não o único, alvo dos anticorpos de neutralização humanos, uma vez que foi demonstrado que o DENV-2 com DIII modificado, ainda são eficientemente neutralizados pelo soro humano

(Wahala *et al.*, 2012). Epítomos estão sendo mapeados e foram identificados resíduos de aminoácidos localizados nos domínios DI e DII que podem induzir uma fraca neutralização, mas uma forte resposta-cruzada (de Alwis *et al.*, 2012).

Um único anticorpo pode ser tanto neutralizante quanto subneutralizante dependendo de sua avidéz por seus alvos e sua concentração (Beltramello *et al.*, 2010). De fato, anticorpos neutralizantes constituem uma fração bem pequena do total de anticorpos humanos que respondem contra o DENV, a maior fração é composta por anticorpos subneutralizantes e de reatividade-cruzada que também se ligam a estruturas dos virions incluindo a proteína prM (Gubler, 2002; Stahl *et al.*, 2013). É comumente aceito que anticorpos subneutralizantes de reação-cruzada participam efetivamente da gravidade da doença, enquanto que os neutralizantes protegem contra a infecção. Anticorpos anti-NS1 são um caso especial, uma vez que a NS1 não está presente nos virions maduros. Estes anticorpos apresentam alta reatividade cruzada e participam no balanço entre proteção e patogenicidade (revisado por Remy, 2014).

Em 1977, Halstead e O'Rourke foram pioneiros no conceito da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE) na infecção pelo DENV. Eles mostraram que PBMCs de primatas apresentaram um aumento da infecção após a adição de anticorpos específicos para o DENV *in vitro*. Assim, foi levantada a hipótese de que complexos imunes entram preferencialmente em células mononucleares fagocíticas via receptor Fc, aumentando a fagocitose do vírus complexado. Acredita-se que esse aumento contribua com o agravamento da dengue, observada em infecções secundárias por sorotipos heterólogos. (Halstead & O'Rourke, 1977).

Anos depois, Dejnirattisai e colaboradores (2010) observaram que dentre os anticorpos monoclonais humanos específicos para todo o virion, 60% foi direcionado contra a prM com alta reatividade-cruzada para todos os sorotipos, indicando uma capacidade de neutralização incompleta, mas um efeito consistente de ADE. Os autores propõem que a prM não é totalmente clivada durante a maturação da partícula viral e dependendo da quantidade de prM que permanece na superfície viral, anticorpos anti-prM podem levar tanto à ADE, como à neutralização. No entanto, parece que quando muita prM está presente,

a resposta secundária de anticorpos não apresenta avidéz suficiente para a neutralização, induzindo ADE por virions imaturos. Alguns meses após este estudo, Beltramello e colaboradores (2010) observaram que todos os anticorpos contra as proteínas E e prM facilitaram a infecção quando em concentrações subneutralizantes. Anticorpos monoclonais anti-EDIII possuíram maior potencial de neutralização e foram tanto sorotipo específicos, quanto de reatividade-cruzada. Os anticorpos específicos para os domínios EDI/EDII e prM apresentaram menor capacidade de neutralização e maior de reação-cruzada.

### **1.2.1.3. Teoria do mimetismo molecular**

Estudos demonstraram que a infecção pelo DENV leva à produção de auto-anticorpos contra as plaquetas (Saito *et al.*, 2004), células endoteliais (Lin *et al.*, 2003) e moléculas envolvidas na coagulação (Falconar, 2007), uma vez que parecem apresentar mimetismo molecular com as proteínas NS1, prM e E do DENV, respectivamente.

Estudos demonstraram ainda, que os níveis séricos de auto-anticorpos anti-plaquetários e anti-células endoteliais são mais elevados em pacientes FHD/SCD comparados aos pacientes FD. Além disso, a imunoglobulina M (IgM) presente no soro de pacientes com FHD apresentou uma maior reatividade cruzada com plaquetas e células endoteliais do que imunoglobulina G (IgG). Experimentos de absorção revelaram que anticorpos anti-NS1 são os principais responsáveis pela reatividade cruzada (Lin *et al.*, 2008), sugerindo que estes auto-anticorpos poderiam estar associados à trombocitopenia e ao extravasamento de plasma. O alinhamento de sequências realizado para as proteínas E, prM, e NS1 mostrou diferentes percentuais de similaridade de sequência com moléculas associadas à coagulação como o fator X, fator XI e plasminogênio (Lin *et al.*, 2011). Embora os efeitos desses auto-anticorpos sobre os fatores de coagulação ainda não estejam claros, alguns estudos demonstraram que auto-anticorpos induzidos por DENV poderiam interferir na fibrinólise humana (Chuang *et al.*, 2011).

#### 1.2.1.4. Tempestade de citocinas e extravasamento vascular

A tempestade de citocinas refere-se à liberação exacerbada ou descontrolada de citocinas pró-inflamatórias e tem sido associada com uma ampla variedade de doenças infecciosas e não infecciosas. Na infecção pelo DENV uma das principais consequências postuladas devido a essa tempestade de citocinas é o extravasamento plasmático (Tisoncik *et al.*, 2012). Acredita-se que o extravasamento endotelial é uma característica da forma grave, notoriamente em um contexto de infecção secundária por um sorotipo heterólogo (Malavige & Ogg, 2013).

A permeabilidade vascular tem sido correlacionada com a presença de citocinas inflamatórias na circulação sanguínea, no entanto, ainda não é compreendido como ocorre o extravasamento plasmático. Citocinas pró-inflamatórias como MIF, MCP-1, IL-8 e HMGB-1 podem participar da hiperpermeabilidade vascular pelo rompimento das junções oclusivas e degradação do glicocálix (Ong *et al.*, 2012). Além disso, alta quantificação de TNF- $\alpha$  em amostras de soro de pacientes na fase aguda parece estar envolvido com ativação de células da microvasculatura levando-as à apoptose (Cardier *et al.*, 2005).

Citocinas como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-13, IL-7, GM-CSF, MIF, IL-10, juntamente com outras citocinas têm sido observadas em níveis elevados em pacientes FHD quando comparados pacientes FD (Chen *et al.*, 2006; Green *et al.*, 1999; de-Oliveira-Pinto *et al.*, 2012; Bozza *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012). Alguns estudos têm demonstrado que o MIF, IL-10, IL-6, MIP-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  tem valor no prognóstico de dengue grave (Malavige *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2008). Em crianças FHD e FD mostrou-se que níveis de IL-10 séricos foram mais elevados na fase de defervescência, justamente naqueles que progrediram para SCD (Butthep *et al.*, 2012). Portanto, além de citocinas pró-inflamatórias, citocinas imunossupressoras também parecem participar significativamente na patogênese da dengue grave. Muitas citocinas que são associadas com a doença grave são predominantemente produzidas por monócitos, macrófagos e outras populações de células, sendo assim, monócitos e células dendríticas têm sido definidas como importantes fontes dessas

citocinas (Jayratne *et al.*, 2012; Guilarde *et al.*, 2008). No entanto, não se sabe como os altos níveis de infecção de monócitos e células dendríticas na dengue estariam associados com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Desta forma, dentre os mediadores solúveis envolvidos no aumento da permeabilidade em células endoteliais primárias, podemos mencionar: TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8/IL-8, IL-10, IL-12, MIF, HMGB1 (high-mobility group protein 1), CCL2/MCP-1 e metaloproteinases de matriz (revisado por Rothman, 2011) e proteínas como a NS1 secretada, em conjunto com anticorpos anti-NS1 e ativação do Sistema Complemento também podem estar envolvidos na alteração da permeabilidade vascular induzida pelo DENV durante este fenômeno (Avirutnan *et al.*, 2006).

#### **1.2.1.5. Teoria do pecado antigênico original**

Os linfócitos T possuem um papel crucial na resposta imunológica adaptativa. Durante a infecção, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> reconhecem pequenos peptídeos ligados a moléculas de HLA classe II e classe I, respectivamente. Ao reconhecerem os complexos peptídeos-HLA apresentados pelas APCs, os linfócitos T *naive* antígeno-específicos entram em processo de ativação celular. Para que isto ocorra, os linfócitos T *naive* requerem a ligação do TCR com o peptídeo-HLA e sinais co-estimulatórios adicionais provenientes de moléculas acessórias de superfície celular e citocinas. Após a ativação, os linfócitos T sofrem uma rápida expansão e diferenciação adquirindo um perfil efetor (revisado por Sant & McMichael, 2012; revisado por Remakus & Sigal, 2013).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> da linhagem não regulatória, são divididos em subpopulações funcionais, sendo os mais prevalentes os linfócitos T *helper* 1 (T<sub>H</sub>1), produtores preferencialmente de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ ; linfócitos T<sub>H</sub>2 que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; e linfócitos T<sub>H</sub>17 que produzem IL-17 (revisado por Faber *et al.*, 2014). De forma semelhante, os linfócitos TCD8<sup>+</sup> também são divididos em subpopulações funcionais. A subpopulação mais bem caracterizada é a Tc1, que apresenta um papel crucial no *clearance* de patógenos intracelulares. Estas células são capazes de liberar moléculas citotóxicas como granzima e perforina na fenda sináptica e de secretar citocinas como IFN- $\gamma$  e

TNF- $\alpha$ . Os linfócitos Tc2 apresentam perfil de citocinas que se assemelha com os linfócitos Th2 com a produção de IL-5 e IL-13, no entanto, apenas em uma extensão limitada de IL-4. Os linfócitos Tc9 podem produzir IL-9, IL-10 e apresentam baixos níveis de granzima B. Por fim, similarmente aos linfócitos Th17, as citocinas IL-6 ou IL-21, juntamente com TGF- $\beta$  determinam a diferenciação em linfócitos Tc17 produtores de IL-17 (revisado por Mittrucker *et al.*, 2014).

O principal mecanismo que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados combatem células infectadas é através da granuloexocitose que requer perforina e granzimas (Kagi *et al.*, 1994). Mediadores de morte celular como as granzimas são alocadas em grânulos e são responsáveis por uma efetiva ação na célula alvo, resultando em apoptose mediada, ou não, por caspase. A perforina, no entanto, apresenta a função de formação de poros na membrana plasmática das células-alvo por onde penetram as granzimas (revisado por Voskoboinik *et al.*, 2015). Além da exocitose dos grânulos, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem mediar a citotoxicidade das células alvos através de secreção de TNF- $\alpha$  ou através da ligação do FasL e TRAIL, que respectivamente se ligam aos receptores de morte na superfície das células alvo (Alejo *et al.*, 2006). É importante ressaltar que a morte mediada pela exocitose dos grânulos, assim como pelos ligantes de morte, não são exclusivos dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, mas também em células NK e em alguns linfócitos T CD4<sup>+</sup> (revisado por Marshall & Swain, 2011).

Com a eliminação do patógeno, o número de linfócitos T efetores morrem por apoptose. Cerca 5-10% dos que não sofrem apoptose se diferenciam em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória, que podem ser mantidos por toda a vida do indivíduo pela proliferação homeostática com o auxílio de citocinas como IL-7 e IL-15 (Farber *et al.*, 2014). Em humanos, linfócitos T de memória são classicamente diferenciadas pela expressão da isoforma CD45RO e pela falta de expressão da isoforma CD45RA (CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) (Farber *et al.*, 2014). É sabido que as células T CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> compreendem populações heterogêneas de subpopulações de células T de memória. Há quase 15 anos, Sallusto e colaboradores (1999) identificaram pela primeira vez esta heterogeneidade no sangue periférico humano com base na expressão no marcador de *homing* CCR7. Linfócitos T *naïve* uniformemente expressam CCR7,

o que reflete na sua predominante residência em órgãos linfoides secundários, enquanto que linfócitos T de memória são subdivididas em linfócitos T de memória central  $CCR7^+CD45RA^-$  ( $T_{MC}$ ), que trafegam para os tecidos linfoides, e linfócitos T de memória efetora  $CCR7^-CD45RA^-$  ( $T_{ME}$ ), que podem migrar para múltiplos sítios periféricos. Autores demonstram que células  $T_{MC}$  produzem mais IL-2 que células  $T_{ME}$ , que por sua vez produzem mais citocinas efetoras, e propõe que o modelo de diferenciação em células  $T_{MC}$  é um estágio intermediário de diferenciação entre células T naive em  $T_{ME}$  em sítios periféricos (Sallusto *et al.*, 2004). A capacidade efetora não é exclusiva das células  $T_{ME}$ , já que ambas as subpopulações produzem citocinas efetoras em resposta a viroses, antígenos e outros estímulos (Wang *et al.*, 2012; Pédrón *et al.*, 2011), embora as células  $T_{MC}$  apresentem uma grande capacidade proliferativa (Wang *et al.*, 2012).

Os epítomos de DENV de maior reconhecimento pelos linfócitos T são da proteína NS3. Além disso, as proteínas NS4b e NS5, juntamente com a NS3 foram recentemente caracterizadas como os epítomos imunodominantes após uma extensa análise de respostas de linfócitos T de indivíduos saudáveis da região endêmica do Sri-Lanka (Weiskopf *et al.*, 2013).

Diversos estudos sugerem que os linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  podem contribuir para a proteção contra a reinfeção homóloga ou heteróloga pelo DENV. Tem sido demonstrado que linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  humanos específicos ao DENV, proliferam, produzem IFN- $\gamma$  e lisam células alvo infectadas (Kurane *et al.*, 1989; Mathew *et al.*, 1996; Gagnon *et al.*, 1999), sugerindo que os linfócitos T sorotipo específicos são ativados e funcionais na infecção primária pelo DENV (Kurane *et al.*, 1989; Livingston *et al.*, 1995). Finalmente, estudos em modelo murino de infecção pelo DENV demonstraram que linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  contribuem para a proteção após o desafio com o DENV (Zompi *et al.*, 2012; Zellweger *et al.*, 2013).

Em 2003, um novo conceito chamado “pecado antigênico original” foi proposto para explicar como linfócitos T DENV específicas poderiam contribuir para a gravidade em casos de infecções secundárias. Mongkolsapaya e colaboradores usaram epítomos recém identificados, restritos ao HLA-A\*11 para estudar os linfócitos T durante a infecção aguda em crianças asiáticas. Para isso,

os autores analisaram PBMCs em diferentes dias de infecção na fase aguda. A resposta dos linfócitos T CD8 foi avaliada mediante a utilização de tetrâmeros de HLA classe I direcionados contra o antígeno da infecção prévia, ao invés de contra a infecção heteróloga subsequente. Desta forma, os autores propuseram que na infecção secundária, linfócitos T de memória específicas para o sorotipo da infecção primária seriam ativados. Uma resposta de baixa afinidade para o sorotipo heterólogo impede o desenvolvimento de linfócitos T específicos de maior afinidade, levando a imunopatologia, ao invés da eliminação viral (Mongkolsapaya *et al.*, 2003)

Desta forma, foi proposto que os linfócitos T de reatividade cruzada específicas para o sorotipo da infecção primária dominam a resposta durante uma infecção secundária heteróloga, fenômeno que foi denominado como "pecado antigênico original" (Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Ainda, há a hipótese de que as variantes de peptídeos derivados do sorotipo da infecção secundária podem induzir uma resposta que seja qualitativamente diferente da resposta induzida pelo antígeno original, tal como induzir um padrão diferente da produção de citocinas. Supõe-se que estas alterações nas respostas de linfócitos T ao sorotipo infectante podem contribuir para uma "tempestade de citocinas" durante a infecção secundária heteróloga e, assim, contribuir para a imunopatogênese da dengue grave (Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Diferenças na avidéz das células T também podem afetar no balanço da resposta de citocinas. Estímulos de baixa afinidade, como os peptídeos de reatividade-cruzada de diferentes sorotipos tem mostrado uma diminuição da regulação de IFN- $\gamma$  e um aumento da regulação na produção de TNF- $\alpha$  (Mangada & Rothman, 2005). A teoria do pecado antigênico original não é exclusiva, assim como a ADE, e os dois mecanismos podem ser complementares. A ADE permite uma alta carga viral, que concomitantemente com a apresentação antigênica pela abundância de macrófagos/monócitos infectados e reativação de linfócitos T de reatividade-cruzada. Estes linfócitos T, apresentando uma baixa afinidade, assim como um baixo nível de produção de IFN- $\gamma$ , podem sofrer apoptose, acompanhado de liberação de citocinas e dano tecidual (revisado por Remy, 2014).

No entanto, esta hipótese diverge com a observação de que as respostas de linfócitos T heterólogos não são sempre necessárias para produzir uma doença grave. Estudo recente demonstrou uma falta de temporalidade entre a resposta de linfócitos T CD8+ e o início do extravasamento capilar, sugerindo que os linfócitos T CD8 + não são responsáveis pelo desencadeamento do início do extravasamento capilar em crianças com FHD (Dung *et al.*, 2010). Estudos sugerem, ainda, que o pecado antigênico não prejudica significativamente a qualidade das respostas dos linfócitos T na população em geral (Weiskopf *et al.*, 2013). No entanto, uma menor polifuncionalidade da resposta pode estar associada com indivíduos que sofrem desfechos clínicos mais graves.

#### **1.2.1.6. Teoria do polimorfismo genético**

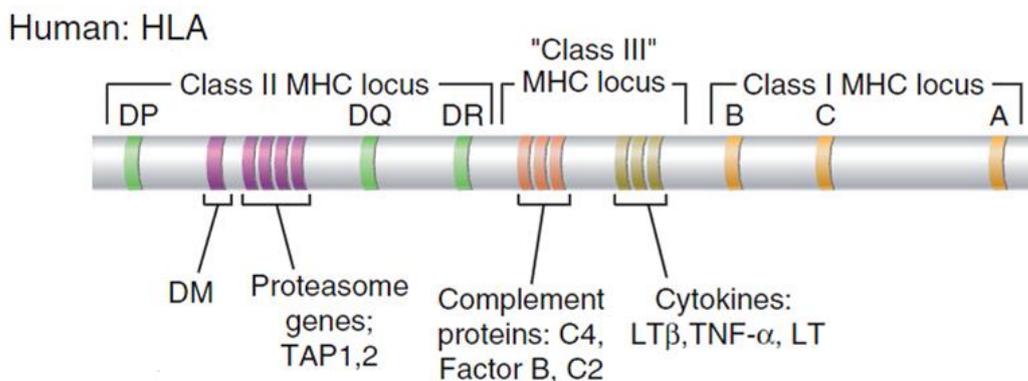
Tem sido proposto que características genéticas dos pacientes tenham importância no curso clínico da doença. De fato, muitos estudos de associação têm identificado um número de genes candidatos relacionados com infecção, por exemplo os *locus* de HLA classe I e II (Stephens *et al.*, 2002), receptores celulares para IgG, vitamina D, lectina de ligação à manose, grupo sanguíneo ABO (Kalayanoroj *et al.*, 2007), antígenos plaquetários humanos e o DC-SIGN (Lan & Hirayama, 2011).

##### **1.2.1.6.1. Antígeno Leucocitário Humano (HLA): Estrutura e função**

O sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA, *Human Leukocyte Antigen*) é constituído por glicoproteínas altamente polimórficas codificadas por genes localizados no braço curto do cromossomo 6, constituindo o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, *Major Histocompatibility Complex*). Este complexo é composto por um conjunto de moléculas presentes na superfície celular, em sua maioria, responsáveis pela apresentação antigênica para linfócitos T (revisado por Apostolopoulos *et al.*, 2008).

As moléculas de HLA são divididas em três subgrupos: HLA de classe I, II e III. O *locus* do MHC de classe I codifica proteínas heterodiméricas de ligação ao peptídeo, localizadas nos *loci* HLA-A, B e C, assim como as moléculas de processamento antigênico, como a TAP (*Transporter associated with Antigen*

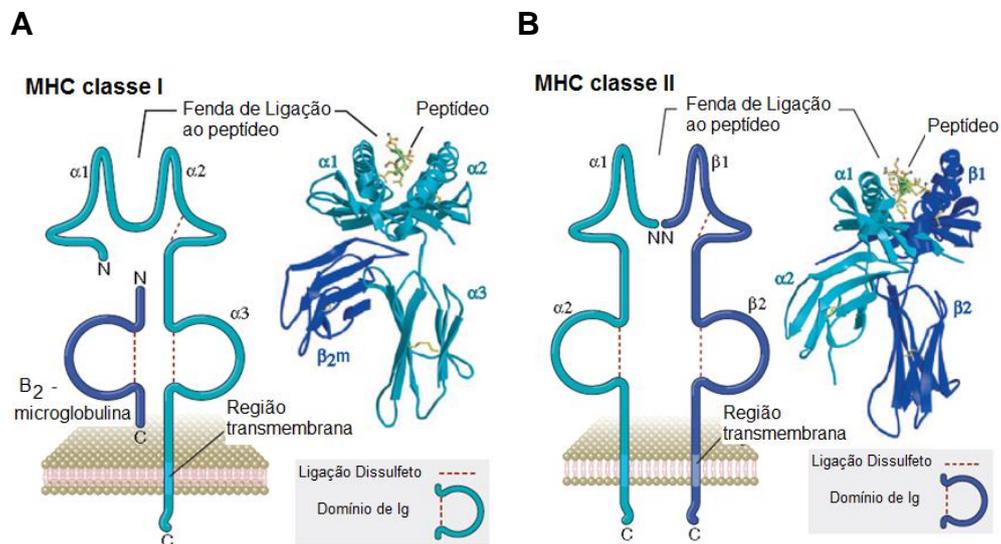
*Processing*) e tapasina. O *locus* do MHC de classe II também codifica proteínas heterodiméricas de ligação ao peptídeo, localizadas nos *loci* HLA-DR, DQ e DP, e as proteínas que modulam o carregamento de peptídeos para o MHC de classe II no compartimento endossomal, como HLA-DM. O *locus* do MHC de classe III codifica outros componentes imunes, como os do sistema complemento (C2, C4 e fator B), citocinas (TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ) e HSP70, conforme mostrado na figura 1.5. As proteínas do MHC de classe I são expressas em todas as células nucleadas, enquanto que as do MHC de classe II são observadas em apenas alguns tipos celulares, como células B, neutrófilos, células dendríticas e células do epitélio tímico, principalmente naquelas que atuam como células apresentadoras de antígeno (APC) (revisado por Adams & Luoma, 2013).



**Figura 1.5. Representação da região do genoma onde está localizado o complexo HLA.** Destacamos os *loci* MHC classes I, II e III e seus genes constituintes, onde o *locus* MHC classe I, codificam moléculas de apresentação antigênica, assim como o *locus* MHC classe II, além de proteínas acessórias para o processamento antigênico. O MHC classe III, não codifica moléculas envolvidas na apresentação, e sim, citocinas e componentes do complemento. **Fonte:** Adaptado de Abbas *et al.*, 2013. 7<sup>o</sup> ed.

Cada molécula de HLA tem uma fenda, ou sulco, extracelular no qual os peptídeos se encaixam, seguida de um par de domínios semelhantes as imunoglobulinas ancoradas na membrana celular por meio de domínios transmembranares e citoplasmático. Assim, as moléculas de MHC classe I consistem em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente; a cadeia  $\alpha$  (ou cadeia pesada) codificada pelo HLA e uma subunidade, não codificada pelo HLA, chamada de  $\beta_2$ -microglobulina, conforme mostrado na figura 1.6 - A. O tamanho da fenda é suficiente para ligar peptídeos contendo de 8 a 11 aminoácidos em uma conformação flexível e prolongada. As extremidades

da fenda de ligação são fechadas, impedindo a ligação de peptídeos maiores. Assim sendo, proteínas globulares nativas precisam ser “processadas” para gerar fragmentos pequenos, o suficiente para se ligarem às moléculas do HLA e para serem reconhecidas pelas células T (revisado por Adams & Luoma, 2013).



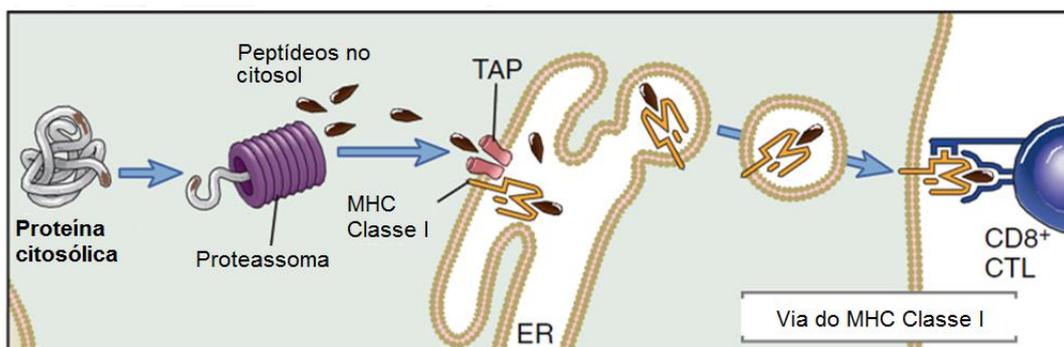
**Figura 1.6. Estrutura da molécula do MHC classe I e II.** O diagrama esquemático (à esquerda) ilustra as diferentes regiões das moléculas do MHC. **A**, as moléculas classe I são compostas por uma cadeia  $\alpha$  polimórfica ligada de forma não covalente à  $\beta_2$ -microglobulina não polimórfica. A cadeia  $\alpha$  é glicosilada. O diagrama em formato de fita (à direita) mostra a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-B27 ligada a um peptídeo, exibido por cristalografia de raio X. **B**, as moléculas classe II são compostas por uma cadeia  $\alpha$  polimórfica ligada de forma não covalente à cadeia  $\beta$  polimórfica. As duas cadeias são glicosiladas. O diagrama em formato de fita (à direita) mostra a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-DR1 ligada a um peptídeo, exibido por cristalografia de raio X. **Fonte:** Adaptado de Abbas *et al.*, 2013. 7<sup>o</sup> ed.

Os resíduos polimórficos dos HLA classe I estão confinados aos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , onde contribuem para as variações na ligação de peptídeos e no reconhecimento pelas células T dos diversos alelos de classe I. O segmento  $\alpha 3$  da cadeia se dobra para formar um domínio de Ig, cuja sequência de aminoácidos é mantida em todas as moléculas de HLA classe I. Esse segmento contém uma alça que serve de local de ligação para o CD8 (Adams & Luoma, 2013).

A  $\beta_2$ -microglobulina é codificada por um gene fora do HLA e interage de maneira não covalente com o domínio  $\alpha 3$  da cadeia  $\alpha$ . Assim, a molécula de HLA classe I totalmente montada e estável requer a presença dos 3 componentes do

heterodímero que consiste em uma cadeia  $\alpha$ ,  $\beta_2$ -microglobulina, e um peptídeo antigênico ligado a ela. A razão para isso é que, por um lado, a interação da cadeia  $\alpha$  com a  $\beta_2$ -microglobulina é estabilizada pela ligação de antígenos peptídicos à fenda formada pelos segmentos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , e por outro lado, a ligação do peptídeo fortalece a interação da  $\beta_2$ -microglobulina com a cadeia  $\alpha$ . A maioria dos indivíduos é heterozigoto para genes do HLA e poderiam expressar até seis diferentes moléculas de HLA classe I em cada célula, que contem cadeias  $\alpha$  codificadas por dois alelos dos genes HLA-A, HLA-B e HLA-C herdados (revisado por Adams & Luoma, 2013).

O primeiro passo para a ativação de células T CD8 é o reconhecimento através das moléculas de HLA de classe I. Os peptídeos ligados às moléculas de HLA classe I são normalmente citosólicos. O proteassoma degrada antígenos proteicos em pequenos peptídeos que são liberados no citosol. Os peptídeos são transportados do citosol para o retículo endoplasmático (RE) via transportador associado com o processamento antigênico pela TAP (TAP1 e TAP2). No RE, peptídeos se ligam nas moléculas de HLA classe I recém-sintetizadas formando um complexo multimérico que envolve TAP, tapasina, calreticulina, calnexina e ER60. Do RE, o complexo peptídeo-HLA classe I é transportado para superfície celular pela via secretória, no Complexo de Golgi, onde sofrerá diversas modificações pós-traducionais. Em seguida, o complexo peptídeo-MHC classe I é expresso na superfície celular, podendo desta forma, interagir com o receptor de antígeno da célula T (TCR) da célula T CD8+ (revisado por Neefjes *et al.*, 2011), conforme mostrado na figura 1.7.

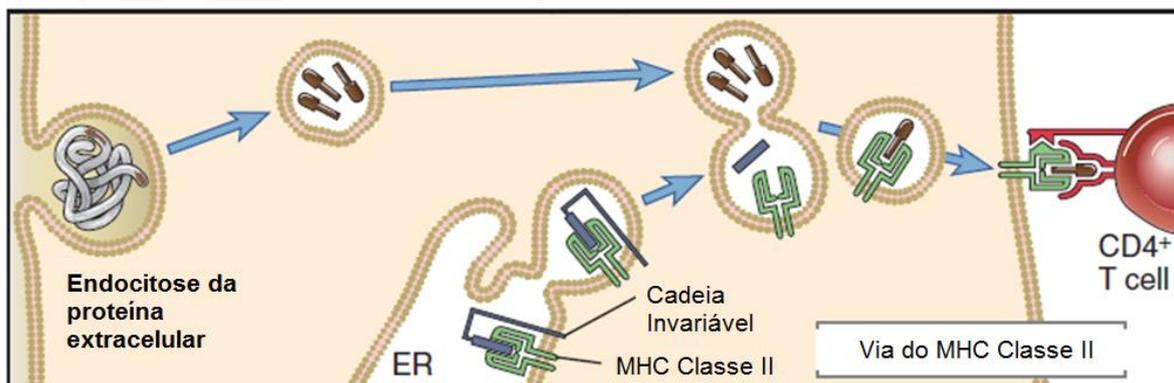


**Figura 1.7. Via do HLA Classe I de apresentação antigênica.** Os antígenos proteicos no citosol são processados por proteassomas, e os peptídeos são transportados ao retículo endoplasmático (RE), onde se ligam a moléculas do MHC classe I. **Fonte:** Adaptado de Abbas *et al.*, 2013. 7<sup>o</sup> ed.

As moléculas de HLA classe II são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ . Ao contrário das HLA classe I, ambas as cadeias são codificadas por genes do MHC. Os segmentos aminoterminais  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  das cadeias interagem para formar a fenda de ligação de antígenos, que é estruturalmente semelhante à fenda das moléculas de HLA classe I, conforme mostrado na figura 1.6 - B. Os resíduos polimórficos localizados nos segmentos  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  estão localizados na fenda e em torno dela. Nas HLA classe II de seres humanos, a maior parte do polimorfismo está na cadeia  $\beta$ . Nas HLA classe II, as extremidades da fenda são abertas, permitindo a ligação de peptídeos até 30 aminoácidos (revisado por Adams & Luoma, 2013).

A alça do segmento  $\beta 2$  das HLA classe II é o local de ligação para o CD4, semelhante ao local de ligação para o CD8 no segmento  $\alpha 3$  da cadeia pesada da molécula de HLA classe I (revisado por Apostolopoulos *et al.*, 2008). A molécula de HLA classe II completamente montada é um heterodímero que consiste em uma cadeia  $\alpha$ , uma cadeia  $\beta$  e um peptídeo antigênico a ela ligado. Semelhante as HLA de classe I, a expressão estável das HLA classe II na superfície da célula requer a presença dos três componentes do heterodímero (revisado por Apostolopoulos *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2012).

Proteínas extracelulares são normalmente apresentadas como peptídeos pelos HLA classe II. Estas proteínas são endocitadas pelas APCs em endossomas iniciais que se tornam endossomas/lisossomos tardios e são digeridos em pequenos fragmentos de peptídeos. As moléculas de HLA classe II são montadas no RE pela associação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  com a cadeia invariante. A cadeia invariante ocupa a fenda de ligação ao peptídeo, evitando a ligação do peptídeo. Além disso, a cadeia invariante transporta o heterodímero do HLA classe II no endossomo/lisossomo tardio. No endossomo/lisossomo, a cadeia invariante é degradada por proteases/catepsinas até o CLIP (peptídeo da cadeia invariante associado ao HLA classe II) que se mantém associado à molécula de HLA. O CLIP é removido do HLA classe II pelo HLA-DM e os peptídeos são, então, associados às HLA classe II. Esse complexo peptídeo-HLA classe II é transportado para a superfície celular onde interage com células T CD4 (revisado por Adams & Luoma, 2013) (Figura 1.8).

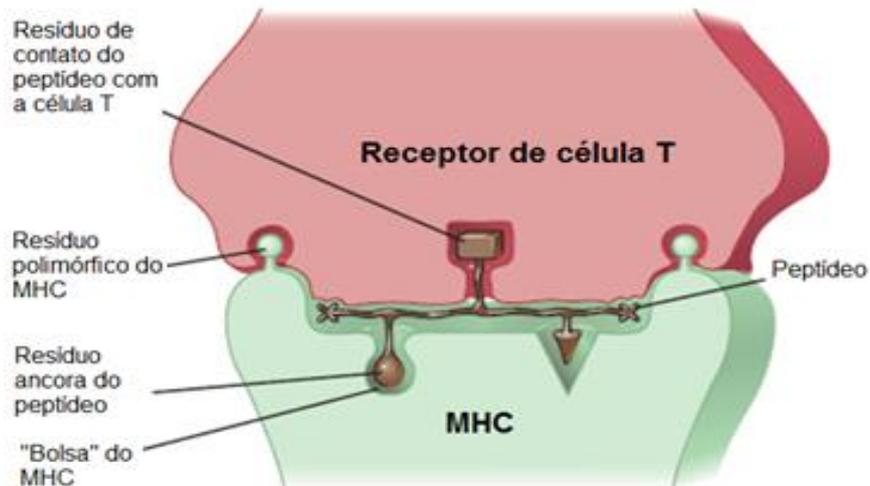


**Figura 1.8. Via do HLA Classe II de apresentação antigênica.** Antígenos proteicos extracelulares são endocitados para vesículas, onde os patógenos são processados e os peptídeos se ligam a moléculas MHC classe II. **Fonte:** Adaptado de Abbas *et al.*, 2013. 7<sup>o</sup> ed.

As moléculas do HLA demonstram uma especificidade muito ampla no que diz respeito à ligação aos antígenos, e a especificidade fina do reconhecimento dos antígenos reside principalmente nos receptores de antígenos dos linfócitos T, os TCR (do inglês, *T-cell receptor*). Cada molécula de HLA classe I ou classe II possui uma única fenda de ligação aos antígenos que liga um peptídeo por vez, mas que pode acomodar vários peptídeos diferentes (Neefjes *et al.*, 2011).

A ligação dos peptídeos às moléculas do HLA é feita por meio de uma interação não covalente mediada por aminoácidos presentes nos peptídeos e outros presentes na fenda do HLA. Os peptídeos se ligam às fendas do HLA em sua conformação estendida. Uma vez ligados, os peptídeos e as moléculas de água associadas enchem as fendas, formando um íntimo contato com os aminoácidos das lâminas  $\beta$  que formam a base, e as  $\alpha$ -hélices das paredes das fendas. Na maioria das moléculas de HLA, as lâminas  $\beta$  da base das fendas formam espécies de “bolsas”. Os aminoácidos de um peptídeo podem conter cadeias laterais que se encaixam nessas bolsas e se ligam a aminoácidos complementares do HLA, normalmente mediante ligações hidrofóbicas. Esses aminoácidos dos peptídeos são chamados de âncoras, pois são os maiores contribuintes para a estabilidade das ligações, ancorando o peptídeo à fenda. As âncoras dos peptídeos podem estar localizados no meio ou nas suas extremidades. Cada peptídeo que se liga ao HLA normalmente contém um ou duas âncoras, permitindo uma maior variabilidade na constituição dos outros

aminoácidos do peptídeo, aqueles que são reconhecidos pelas células T conforme mostrado na Figura 1.9. Nem todos os peptídeos usam âncoras para se ligar às moléculas do HLA, especialmente às HLA classe II. Interações específicas dos peptídeos com as  $\alpha$ -hélices nas laterais das fendas também contribuem para a ligação dos peptídeos, formando pontes de hidrogênio ou interações com carga (pontes de sódio) (revisado por Apostolopoulos *et al.*, 2008).



**Figura 1.9. Reconhecimento do complexo peptídeo-HLA pela célula T.** Este esquema mostra uma molécula de MHC apresentando um peptídeo a uma célula T via TCR, no qual tem-se o reconhecimento de dois resíduos polimórficos do MHC e um resíduo do peptídeo. **Fonte:** Adaptado de Abbas *et al.*, 2013. 7º ed.

Como muitos aminoácidos na fenda e próximos a ela são polimórficos, os diversos alelos apresentam uma propensão para ligação de diferentes peptídeos. O TCR reconhece tanto o peptídeo antigênico quanto as moléculas do HLA, com o peptídeo sendo responsável pela especificidade fina do reconhecimento do antígeno e os resíduos do HLA se responsabilizando pela restrição das células T ao HLA. Uma parte do peptídeo ligado é exposta na parte superior da fenda, que é aberta, e as cadeias laterais dos aminoácidos dessa porção do peptídeo são reconhecidos pelo TCR das células T específicas. O mesmo TCR interage com os aminoácidos polimórficos das  $\alpha$ -hélices da molécula de HLA. Além disso, moléculas de HLA são extremamente polimórficas, e mais de mil variantes alélicas têm sido descritas nos *loci* A e B do HLA classe I. Grande parte desse polimorfismo está localizado na região de ligação ao peptídeo, e acredita-se que como resultado, cada variante se ligaria a um repertório único de peptídeos ligantes (revisado por Neefjes *et al.*, 2011).

Apesar do polimorfismo, as moléculas HLA classe I podem ser agrupadas, denominados **supertipos**, representando conjuntos de moléculas que compartilham a mesma especificidade de ligação a peptídeos. Cada supertipo pode ser descrito por um supermotivo que reflete o motivo âncora principal reconhecido pelas moléculas do supertipo correspondente. Por exemplo, moléculas do supertipo A02 compartilham a especificidade por peptídeos com resíduos hidrofóbicos alifáticos na posição 2 e na região C-terminal, enquanto que as moléculas do supertipo A03, reconhecem peptídeos com resíduos alifáticos ou pequenos na posição 2 e resíduos básicos na região C-terminal.

Apesar das diferenças em diversos esquemas de classificação, o conceito de supertipos de HLA têm sido efetivamente utilizado na caracterização e identificação no reconhecimento de epítomos-alvos promíscuos que são reconhecidos por linfócitos T em uma variedade de doenças (Ovsyannikova *et al.*, 2007; Burrows *et al.*, 2003; Trachtenberg *et al.*, 2003; Bihl *et al.*, 2007, Brander *et al.*, 2001; Bertoni *et al.*, 1997; Livingston *et al.*, 1999; Kawahima *et al.*, 1998). Os supertipos também têm sido utilizados como um componente em diversas abordagens e algoritmos para a predição de peptídeos candidatos e avaliados quanto a sua capacidade de ligação com alelos HLA classe I. Por fim, têm sido, ainda, examinados como variáveis em estudos com associação a doenças, taxas de sobrevivência e efeitos (Sidney *et al.*, 2008).

#### **1.2.1.6.1.1. Associação de alelos de HLA e Dengue**

Diferentes estudos têm destacado o envolvimento dos genes de HLA classe I e II com diferentes manifestações clínicas na infecção pelo DENV. O MHC é um componente central na resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento das formas graves da doença e estudos demonstram que algumas variantes das moléculas de HLA classe I e II estariam associadas com essas condições em diferentes populações. Dentre elas, destacamos que os alelos HLA-A\*31 e DRB1\*08 mostraram associação com susceptibilidade a SCD em pacientes durante uma infecção secundária na população do Sri Lanka (Malavige *et al.*, 2011). Na população mexicana, o alelo HLA-DR\*04 pode ser um fator genético na proteção contra FHD (LaFleur *et al.*, 2002). Já na população brasileira, tem sido demonstrado que os alelos HLA-A\*01 (Monteiro *et al.*, 2012)

e HLA-B\*44 (Alencar *et al.*, 2013) podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de FHD. Outras associações são mostradas na Quadro 1.1 e 1.2. Também tem sido demonstrado associações envolvendo supertipos de HLA. Vejbaesya e colaboradores (2015) sugerem que o supertipo B44, por possuir resposta a regiões altamente conservadas do proteoma do DENV, proteja contra FHD após infecções secundárias na população Tailandesa.

<b>Alelo</b>	<b>Associação</b>	<b>População</b>	<b>Referência</b>
HLA-A*01	Susceptibilidade	Brasileira	Monteiro <i>et al.</i> , 2012
	Susceptibilidade	Cubana	Paradoa Pérez <i>et al.</i> , 1987
HLA-A*02	Susceptibilidade	Tailandesa	Chiewsilp <i>et al.</i> , 1981
HLA-A*02:03	Resistência	Tailandesa	Stephens <i>et al.</i> , 2002
HLA-A*02:07	Susceptibilidade	Tailandesa	Stephens <i>et al.</i> , 2002
HLA-A*03	Resistência	Malaia	Appanna <i>et al.</i> , 2010
HLA-A*23	Resistência	Jamaicana	Brown <i>et al.</i> , 2011
	Susceptibilidade	Jamaicana	Brown <i>et al.</i> , 2011
	Susceptibilidade	Vietnamita	Loke <i>et al.</i> , 2001
HLA-A*24	Susceptibilidade	Siri Lanka	Malavige <i>et al.</i> , 2011
	Susceptibilidade	Vietnamita	Nguyen <i>et al.</i> , 2008
	Susceptibilidade	Cubana	Paradoa Pérez <i>et al.</i> , 1987
HLA-A*29	Susceptibilidade	Cubana	Sierra <i>et al.</i> , 2007
	Susceptibilidade	Siri Lanka	Malavige <i>et al.</i> , 2011
HLA-A*31	Susceptibilidade	Cingalesa	Malavige <i>et al.</i> , 2011
	Susceptibilidade	Cubana	Sierra <i>et al.</i> , 2007
HLA-A*33	Resistência	Vietnamita	Loke <i>et al.</i> , 2001
HLA-A*33:01	Resistência	Filipina	Mercado <i>et al.</i> , 2015
Supertipo HLA-A01	Susceptibilidade	Tailandesa	Vejnaesya <i>et al.</i> , 2015
Supertipo HLA-A02	Susceptibilidade	Tailandesa	Vejnaesya <i>et al.</i> , 2015
Supertipo HLA-A03	Susceptibilidade	Tailandesa	Vejnaesya <i>et al.</i> , 2015
HLA-B*07	Resistência	Brasileira	Alencar <i>et al.</i> , 2013
HLA-B*13	Resistência	Tailandesa	Chiewsilp <i>et al.</i> , 1981
HLA-B*15	Susceptibilidade	Cubana	Sierra <i>et al.</i> , 2007
HLA-B*18	Resistência	Malaia	Appanna <i>et al.</i> , 2010
HLA-B*35	Resistência	Mexicana	Falcon-Lezama <i>et al.</i> , 2009
	Susceptibilidade	Brasileira	Alencar <i>et al.</i> , 2013
HLA-B*44	Resistência	Tailandesa	Stephens <i>et al.</i> , 2002
HLA-B*46	Resistência	Tailandesa	Stephens <i>et al.</i> , 2002
HLA-B*50	Susceptibilidade	Brasileira	Alencar <i>et al.</i> , 2013
HLA-B*51	Susceptibilidade	Tailandesa	Stephens <i>et al.</i> , 2002
HLA-B*52	Susceptibilidade	Tailandesa	Stephens <i>et al.</i> , 2002
HLA-B*53	Susceptibilidade	Malaia	Appanna <i>et al.</i> , 2010
HLA-B*62	Resistência	Tailandesa	Stephens <i>et al.</i> , 2002
Supertipo HLA-B44	Resistência	Tailandesa	Vejnaesya <i>et al.</i> , 2015
HLA-C*01	Susceptibilidade	Cubana	Paradoa Pérez <i>et al.</i> , 1987
HLA-C*04	Susceptibilidade	Jamaicana	Brown <i>et al.</i> , 2011

**Quadro 1.1. Associação entre alelos HLA Classe I com Susceptibilidade/Resistência a formas graves da Dengue.** Associação, alelo associado à susceptibilidade ou resistência em desenvolver as formas graves da doença. População, populações com as quais foram realizados os estudos. Supertipos, grupos de alelos que apresentam antígenos estruturalmente similares.

<b>Alelo</b>	<b>Associação</b>	<b>População</b>	<b>Referência</b>
HLA-DQA1*05:01	Resistência	Brasileira	Cardozo <i>et al.</i> , 2014
HLA-DQB1*02	Resistência	Jamaicana	Brown <i>et al.</i> , 2011
HLA-DQB1*03	Resistência	Jamaicana	Brown <i>et al.</i> , 2011
HLA-DQB1*06	Resistência	Jamaicana	Brown <i>et al.</i> , 2011
HLA-DQB1*03:02	Susceptibilidade	Mexicana	Falcon-Lezama <i>et al.</i> , 2009
HLA-DQB1*06:11	Susceptibilidade	Brasileira	Cardozo <i>et al.</i> , 2014
HLA-DQB1*11	Resistência	Brasileira	Cardozo <i>et al.</i> , 2014
HLA-DR*13	Resistência	Brasileira	Alencar <i>et al.</i> , 2013
HLA-DRB1*04	Resistência	Mexicana	LaFleur <i>et al.</i> , 2002
HLA-DRB1*07	Resistência	Cubana	Sierra <i>et al.</i> , 2007
HLA-DRB1*08	Susceptibilidade	Mexicana	LaFleur <i>et al.</i> , 2002
	Susceptibilidade	Siri Lanka	Malavige <i>et al.</i> , 2011
	Susceptibilidade	Cingalesa	Malavige <i>et al.</i> , 2011
HLA-DRB1*09:01	Resistência	Vietnamita	Nguyen <i>et al.</i> , 2008
HLA-DRB1*12	Susceptibilidade	Siri Lanka	Malavige <i>et al.</i> , 2011
HLA-DRB5*01/02	Susceptibilidade	Jamaicana	Brown <i>et al.</i> , 2011

**Quadro 1.2. Associação entre alelos HLA Classe II com Susceptibilidade/Resistência a formas graves da Dengue.** Associação, alelo associado à susceptibilidade ou resistência em desenvolver as formas graves da doença. População, populações com as quais foram realizados os estudos. Supertipos, grupos de alelos que apresentam antígenos estruturalmente similares.

Estudos anteriores destacam que determinados alelos de HLA estão associados com o aumento ou a diminuição do risco de manifestações clínicas (Nguyen *et al.*, 2008; Loke *et al.*, 2001; Stephens *et al.*, 2002; Sierra *et al.*, 2007; Falcon-Lezama *et al.*, 2009; Appanna *et al.*, 2010; Malavige *et al.*, 2011). No entanto, estes estudos não determinam se o aumento do risco pode ser associado com uma resposta de linfócitos T hiper ativadas, ou, inversamente, se uma resposta aumentada de linfócitos T pode estar associada com um risco diminuído. As correlações de susceptibilidade à doença associando os alelos de HLA com respostas de linfócitos T mostraram que as resposta diminuída dos linfócitos T estaria associado com a susceptibilidade à doença (Weiskopf *et al.*, 2013). Uma análise detalhada de citocinas produzidas pelas células T específicas ao DENV revelou que as respostas mais fortes são, de fato, associadas a respostas de linfócitos T multifuncionais (Weiskopf *et al.*, 2013). Assim, pode ser possível que enquanto os linfócitos T têm um papel de proteção em associado ao HLA, a falta desta resposta pode contribuir para patogênese em certos indivíduos.

## 2 – JUSTIFICATIVA

A Dengue pode ser causada por quatro sorotipos (DENV-1 a 4), que compartilham 67-75% de homologia entre suas sequências. Uma imunidade protetora duradoura é gerada numa infecção primária por um destes sorotipos, embora não proteja contra outros sorotipos em infecções sequenciais. Desta forma, anticorpos heterólogos de reatividade cruzada (Halstead *et al.*, 2010) e células T de memória cruzada (Mongkolsapaya *et al.*, 2003) parecem contribuir efetivamente para a imunopatogênese da dengue (Srikiatkachorn & Green, 2010). No caso das células T, uma expansão de células T de memória cruzada pré-existentes em uma infecção secundária, mas de menor avidéz ao sorotipo infectante, dominam a resposta de células T específicas para este sorotipo. O resultado é uma menor eficiência no *clearance* viral e liberação excessiva de mediadores inflamatórios (Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Srikiatkachorn & Green, 2010). Além disso, uma associação envolvendo alelos do “*Human Leukocyte Antigen*” (HLA) de classe I e II têm sido reportados quanto à maior ou menor predisposição do paciente a desenvolver as formas graves da dengue (Nguyen *et al.*, 2008; Stephens *et al.*, 2002; Mercado *et al.*, 2015; Cardozo *et al.*, 2014; Alencar *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2012). O estudo de alelos tem impacto potencial no tipo e na eficiência da resposta imunológica desencadeada pelas células T. Além disso, são raros os estudos envolvendo pacientes agudos infectados pelo DENV. Desta forma, nos propomos a realizar análises de associação do HLA e formas clínicas da dengue e ainda, avaliação funcional e fenotípica das células T de pacientes. Consideramos que uma avaliação da frequência de alelos na população brasileira representa uma ferramenta valiosa para inclusive, identificar epítomos imunogênicos do DENV. Portanto, esperamos contribuir para o entendimento de uma resposta imunológica anti-DENV e conseqüentemente, contribuir com o conhecimento para o desenvolvimento de estratégias vacinais eficientes.

## 3 – OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo Geral

Identificar os HLA Classe I e II mais frequentes em uma determinada população brasileira associando-os ao desfecho clínico, funcionalidade e perfil de ativação celular dos linfócitos T de pacientes infectados por diferentes sorotipos na fase aguda da dengue.

### 3.2. Objetivo Específicos

- I. Identificar os HLA classe I e II mais frequentes na população de pacientes infectados pelo DENV oriundos do RJ e MS;
- II. Avaliar a associação dos HLA classe I e II com o desfecho clínicos dos pacientes na fase aguda da infecção;
- III. Avaliar a capacidade efetora dos linfócitos T de pacientes estimulados *in vitro* com antígeno total de DENV-2 isolado de um caso fatal de paciente brasileiro (0337/2008), quanto à secreção de IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B;
- IV. Avaliar o *status* de diferenciação dos linfócitos T de pacientes estimulados *in vitro* com antígeno total de DENV-2 (0337/2008); e
- V. Avaliar a associação dos HLA classe I e II com a funcionalidade e status de diferenciação dos linfócitos T de pacientes.

## 4 – METODOLOGIA

### 4.1. População de Estudo

Em nossa população de estudo foram incluídos 60 casos confirmados de pacientes infectados pelo DENV na fase aguda (2-9 dias após o início dos sintomas), durante surto pelos sorotipos DENV-1, 2 e 4 nos anos de 2010, 2011 e 2013, respectivamente, conforme indicado na Tabela 4.1. As amostras foram obtidas através de colaborações com (i) Hospital Rio-Laranjeiras, Rio de Janeiro, coordenado pelo Dr. Paulo Vieira Damasco; (ii) Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, coordenado pelo Dr. Fernando Bozza; (iii) Hospital Plantadores de Cana, Centro de Referência em Dengue em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, coordenado pelo Dr. Luís Jose de Souza, e (iv) Hospital-Dia Professora Esterina Corsini da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), coordenado pelo Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha.

**Tabela 4.1.** Detalhamento das diferentes epidemias utilizadas neste estudo.

Ano	Sorotipo Prevalente	Local	Colaboradores	Nº de Pacientes
2010	DENV-2	RJ e MS	Dr. Rivaldo Venâncio <sup>1</sup> e Dr. Luis José <sup>2</sup>	6
2011	DENV-1	RJ	Dr. Fernando Bozza <sup>3</sup> e Dr. Paulo Vieira <sup>4</sup>	24
2013	DENV-4	MS	Dr. Rivaldo Venâncio <sup>1</sup>	30

<sup>1</sup> Colaborador do Hospital-Dia Professora Esterina Corsini da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). <sup>2</sup> Colaborador do Hospital Plantadores de Cana, Centro de Referência em Dengue em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. <sup>3</sup> Colaborador do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), FIOCRUZ, Rio de Janeiro. <sup>4</sup> Colaborador do Hospital Rio-Laranjeiras, Rio de Janeiro.

Os pacientes foram entrevistados (Anexo B) e sua inserção no estudo foi realizada mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C). Esse projeto é parte do 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 (Anexo D).

## **4.2. Confirmação do Diagnóstico Laboratorial e Classificação Clínica dos Casos Confirmados**

A infecção pelo DENV foi confirmada através da pesquisa qualitativa de anticorpos IgM anti-DENV por ELISA de captura (PANBIO, Columbia, USA), detecção do antígeno viral NS1 por ELISA (Platelia<sup>TM</sup> Dengue NS1 Ag Kit – Bio-Rad Laboratories) e/ou detecção do RNA viral por RT-PCR. A confirmação do diagnóstico das amostras foi realizada por Nieli Rodrigues da Costa Faria, do Laboratório de Flavivírus (LabFla, IOC/Fiocruz), chefiado pela Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira. As amostras provenientes do INI/IPEC tiveram confirmação laboratorial sob responsabilidade do próprio Instituto.

O diagnóstico por detecção de NS1 foi realizado de três diferentes formas: a 1º seguiu protocolo do fabricante e a 2º e 3º, passou por modificações metodológicas estabelecidas pelo LabFla na tentativa de aumentar a sensibilidade de detecção da NS1. Assim, amostras séricas dos pacientes foram, de acordo com o 2º protocolo, pré-aquecidas a 100°C por 5 min ou de acordo com o 3º, incubadas com solução de 1,5M de glicina/ácido hidrolórico, pH 2,8 a 37°C por 1 hora. Seguindo o 3º protocolo, foi feita neutralização da reação pela adição de solução de 1,5 M de tris/ácido hidrolórico pH 9,7. No 2º e 3º protocolos, as reações tendem a promover a dissociação de complexos imunes formados entre a proteína NS1 e anticorpos heterólogos provenientes de infecções anteriores pelo DENV. A positividade de NS1 na coorte de pacientes da epidemia de 2013 aumentou significativamente após utilização dos protocolos modificados.

Foi também realizado o teste anti-DENV IgG, utilizando o kit Dengue Virus IgG DxSelect (EL1500G, Focus Diagnostics, Cypress, CA, USA), para verificar infecção prévia ou secundária. Pacientes com infecção primária foram aqueles com positividade para qualquer um dos três testes: IgM, NS1 e/ou sorotipo viral por RT-PCR, mas anti-DENV IgG negativo ou, em caso de anti-DENV IgG positivo, a taxa de IgM/IgG deveria ser >2,0. No caso de infecção secundária, os pacientes deverão ter positividade para qualquer um dos três testes: IgM, NS1 e/ou sorotipo viral por RT-PCR, mas com anti-DENV IgG positivo e taxa de IgM/IgG <2,0.

Após a confirmação laboratorial, os pacientes foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos pelo Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial de Saúde (TRS/OMS, 2009) em: (1) Febre do Dengue sem sinais de alarme (FD), caracterizado por náusea, vômitos, erupções cutâneas, mialgia, artralgia, cefaléia, leucopenia, prova do laço positivo sem sinais de hemorragia; (2) Febre do Dengue com sinais de alarme (FDSA), incluindo: dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido, letargia, agitação, hepatomegalia (aumento > 2cm), elevação das transaminases hepáticas e diminuição drástica da contagem de plaquetas; (3) Dengue Grave (Grave), caracterizado por extravasamento plasmático grave, podendo levar ao choque e acúmulo de fluidos acompanhado de desconforto respiratório, hemorragias graves e comprometimento de órgãos como fígado, coração, sistema nervoso central (com perda de consciência), dentre outros (Figura 4.1).



**Figura 4.1. Classificação dos casos de dengue e seus níveis de gravidade.** De acordo com a Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2009, a dengue é classificada em: Dengue com/sem sinais de Alarme e Dengue Grave. **Fonte:** Adaptado de *Dengue: Guideline for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, WHO, 2009.

Parâmetros laboratoriais, tais como: contagem de plaquetas, percentual de hematócrito, contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos, bem como dosagem das enzimas AST/TGO e ALT/TGP foram realizados pelos hospitais onde os pacientes foram atendidos.

#### **4.3. Isolamento e descongelamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)**

Foram utilizados cerca de 20 mL de sangue venoso periférico de pacientes, coletados em tubos com anticoagulante ACD (citrato de sódio 22g/L, ácido cítrico 8 g/L e dextrose 24,5 g/L) (BD Vacutainer®, catálogo #364606). As PBMCs foram separadas a partir de amostras de sangue através da realização do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque™ (d=1,077 g/ml; Sigma). O sangue foi inicialmente depositado sobre o gradiente e o conjunto, centrifugado a 400 g durante 30 minutos. Após centrifugação, o anel de PBMCs foi recuperado e lavado duas vezes em meio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Co.). A viabilidade das PBMCs foi avaliada após exclusão, por contagem, de células coradas com Azul de Trypan (Gibco, Invitrogen Co.). Aproximadamente 10<sup>6</sup> PBMCs foram ressuspensas em 1 mL de solução de congelamento (90% de SFB inativado [Gibco, Invitrogen Co., catálogo #12657-029] + 10% de DMSO (Sigma #108K01865)), armazenados inicialmente a -70°C durante 24h, e em seguida, no nitrogênio líquido. As alíquotas foram criopreservadas para posterior utilização.

As PBMCs criopreservadas foram descongeladas a 37°C, lavadas com meio RPMI-1640, marcadas com Azul de Trypan 0,4% e avaliadas quanto à viabilidade. As células foram mantidas com meio suplementado (RPMI 1640 com 10% SFB, 1% Pen Strep [Gibco, Invitrogen Co. #15140-122] e 1% HEPES [Gibco, Invitrogen Co. #15630-080]) à 37° e 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.4. Extração de DNA e Tipagem dos alelos dos HLA de Classe I e II dos pacientes infectados pelo DENV**

Estas metodologias foram realizadas em colaboração com o Laboratório de HLA e Criopreservação da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pela Dra. Juliana Oliveira, sob supervisão do Dr. Luís Cristóvão e Dr. Orlando da Costa Ferreira Jr.

A tipificação por PCR-SSO (reação em cadeia da polimerase com sondas de oligonucleotídeos sequência específicos) apresenta três etapas:

amplificação, desnaturação e hibridização do material genômico e, para isso, utiliza *kits* comerciais (One Lambda, Inc. - CA – USA).

Para a preparação das amostras, a amostra de DNA foi suspensa em água ultra-pura estéril, submetida ao agitador e adicionado 1 µl de água ultra-pura ao tubo de reação com controle negativo na placa de conjuntos de iniciadores, seguido da adição de Taq polimerase ao tubo, contendo uma mistura de desoxirribonucleotídeos e tampão. Em seguida, foi adicionado 9 µL desta mistura (desoxirribonucleotídeos, tampão e Taq polimerase) para o tubo de reação de controle negativo e adicionado a amostra de DNA ao tubo. Uma alíquota de 10 µl da mistura foi adicionada a cada tubo de reação, exceto no tubo de reação de controle negativo na placa de conjuntos de iniciadores. A placa foi acoplada ao termociclador e iniciado o programa de PCR. Após o término da PCR, foi realizada uma corrida eletroforética, utilizando 2 µL de DNA amplificado, para a confirmação da existência de produto de amplificação.

Após a amplificação, foram transferidos 5 µL de DNA amplificado para outra placa de PCR estéril. Foi adicionado tampão de desnaturação homogeneizado fornecido pelo fabricante. A placa foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo adicionado tampão de neutralização, também fornecido pelo fabricante e o material foi homogeneizado com auxílio de micropipeta. A placa foi incubada e deixada em contato com gelo seco picado.

Após a neutralização, foi adicionado tampão de hibridização e as sondas ligadas a microesferas (beads) em cada poço. A placa foi selada com tampa de silicone, homogeneizada com o auxílio do vórtex, aquecida a 60°C com o auxílio do termociclador por 15 minutos. Após o aquecimento, foi adicionado tampão de lavagem. A placa foi selada com tampa de silicone, homogeneizada com o auxílio do vórtex e centrifugada por 5 minutos a 2700 rpm. O sobrenadante foi descartado por versão de placa e foram repetidos os passos de lavagens e centrifugação por mais duas vezes. Após a centrifugação, foi adicionada solução SAPE (Streptavidina Conjugada com Ficoeritrina) nos poços, a placa foi selada e homogeneizada. A placa foi aquecida a 60°C com o auxílio do termociclador por 5 minutos. Após o aquecimento, foi adicionado tampão de lavagem, a placa foi selada com tampa de silicone, homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 2700 rpm. O sobrenadante foi descartado versão de placa e adicionado tampão

de lavagem em cada poço, o material foi transferido para uma placa ELISA e a leitura foi realizada no equipamento Luminex LABScan™ 100 (One Lambda Inc.). Os resultados dos sinais fluorescentes foram interpretados pelo software HLA Fusion, versão 3.4 (One Lambda Inc.).

#### 4.5. Análise de Associação dos alelos de HLA

A análise de associação dos alelos de HLA foi realizada utilizando a ferramenta de resposta a epítomos – RATE (do inglês, *Restrictor Analysis Tool for Epitopes*), disponibilizada no Banco de Dados de Epítomos Imunes IEDB ([http://iedb-rate.liai.org/no\\_prediction](http://iedb-rate.liai.org/no_prediction)) (Paul *et al.*, 2013). Para esta análise foram adicionados os alelos de HLA classe I e II presentes em nossa população de estudo, assim como a análise da resposta a ser avaliada, que em nosso caso foram classificação clínica, laboratorial, resposta de IFN- $\gamma$ , IL-2 e Granzima B, e variação na frequência de linfócitos T em diferentes *status* de diferenciação (Figura 4.2).

##### RATE (Restrictor Analysis Tool for Epitopes) - NO PREDICTION IN PROMISCUITY ALGORITHM

[Tool Help](#)

Enter data	
Allele data	<input type="button" value="Escolher arquivo"/> Nenhum arquivo selecionado
Response data	<input type="button" value="Escolher arquivo"/> Nenhum arquivo selecionado
Cutoff for response to be considered positive	<input type="text"/>
<input type="button" value="Submit"/> <input type="button" value="Reset"/>	

**Figura 4.2. Interface da ferramenta RATE.** Ferramenta onde realizamos a análise de associação de alelos de HLA. Disponibilizada para livre acesso no Banco de Dados de Epítomos Imunes (IEDB). Link: [http://iedb-rate.liai.org/no\\_predic](http://iedb-rate.liai.org/no_predic).

Para análises de associação envolvendo manifestações clínicas, padronizamos que pacientes classificados como FD seriam designados como 1, enquanto pacientes classificados como FDSA/Grave seriam designados como 2. Portanto, o *cutoff* para respostas serem consideradas positivas para esta análise foi igual a 2. De modo semelhante, ao avaliarmos parâmetros laboratoriais como plaquetas, consideramos nosso *cutoff* como sendo 150, uma vez que avaliamos pacientes divididos em grupos apresentando contagem de plaquetas superior ou inferior a 150 mil/mm<sup>3</sup>. Para avaliarmos os padrões de resposta de IFN- $\gamma$ , IL-2 e Granzima B, consideramos pacientes respondedores

ao antígeno total de DENV-2 como 2, enquanto os não respondedores como 1, sendo nosso *cutoff* igual a 2. Em relação à frequência de linfócitos T em diferentes *status* de diferenciação, consideramos frequências variáveis aquelas que apresentassem razão maior que 1,2 após divisão das mediandas das frequências observadas na condição de estímulo com antígeno total de DENV-2 e a condição de estímulo basal (meio). As que apresentaram razão menor ou que 1,2 foram classificadas como 1, enquanto as com razão maior a 1,2, foram classificadas como 2. Para esta análise, o *cutoff* utilizado também foi igual a 2 (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2.** *Cut off* das análises dos diferentes parâmetros na ferramenta RATE.

<b>Parâmetro</b>	<b>Cut off</b>
Classificação Clínica	2
Contagem de Plaquetas (mil/mm <sup>3</sup> )	150
Resposta de IFN- $\gamma$	2
Resposta de IL-2	2
Resposta de Granzima B	2
Frequência de subpopulações de Linfócitos T	2

Em seguida nos é fornecido pela própria ferramenta, os dados das análises, assim como as frequências dos alelos dentro de cada grupo avaliado (Figura 4.3). O RATE utiliza teste exato de Fisher e o valor de p apresenta a correção de Bonferroni.

Input data summary	
Allele file	Alelos.txt
Response file	Forma Clínica.txt
No. of peptides	1
No. of subjects	59
Cutoff for response to be considered positive	2.0
No. of alleles expressed by subjects	76
Total peptide-allele restriction examinations done	1 x 76 = 76
Re-formatted allele data	<input type="button" value="Allele data"/>
Re-formatted response data	<input type="button" value="Response data"/>
HLA restriction results	
<b>Concise results:</b>	
No. of peptide-allele combinations (in concise results)	5
Concise results	<input type="button" value="Concise results"/>
Complete results	<input type="button" value="Complete results"/>
<b>Identification of promiscuous alleles:</b>	
Epitope promiscuity assessment (This opens in a new tab and may take long to finish depending on the the data)	<input type="button" value="Promiscuity report"/>
Job id	1443719201

**Figura 4.3. Interface da região de resultados do RATE.** Os resultados são dados no formato de uma tabela no Excel contendo as associações de todos os alelos selecionados com as respostas avaliadas. Esta ferramenta está disponibilizada para livre acesso no Banco de Dados de Epítomos Imunes (IEDB). Link: [http://iedb-rate.liai.org/no\\_predic](http://iedb-rate.liai.org/no_predic).

#### 4.6. Predição de epítomos

A predição foi realizada com base em sequências completas da proteína NS3 dos 4 sorotipos do DENV, disponibilizadas no banco de dados de Flavivírus (FLAVIdB; [cvc.dfci.harvard.edu/flavi/](http://cvc.dfci.harvard.edu/flavi/)). Em seguida, aplicando a sequência FASTA da proteína NS3 de cada sorotipo, utilizamos a ferramenta de predição *Consensus* disponibilizada no Banco de Dados de Epítomos Imunes (IEDB; [www.iedb.org/](http://www.iedb.org/)) (Kim *et al.*, 2012). Na sessão de “Predição de Epítomos de Células T” (*T cell epitope prediction*), utilizamos primeiramente a subseção de “Capacidade de Ligação do Peptídeo ao MHC de Classe I” (*Peptide binding to MHC class I molecules*), onde adicionamos a sequência FASTA de cada sorotipo individualmente, frente aos alelos do HLA de Classe I mais frequentes em nossa coorte de pacientes. Desta forma, avaliamos o IC (Concentração Inibitória) 50nM, no qual: (i) IC<50 representa peptídeos com uma alta afinidade ao alelo

específico; (ii)  $50 < IC < 500$ , peptídeos com uma afinidade intermediária; e (iii)  $IC > 500$ , peptídeos com uma baixa afinidade ao alelo específico. Assim, demos preferência a escolha daqueles peptídeos com um  $50 < IC < 500$ .

Em seguida, foi gerado sequências de peptídeos através da aplicação das sequências FASTA da NS3 de cada sorotipo no gerador de peptídeos disponibilizado pela GenScript™ ([genescript.com/peptide\\_screening\\_tools.html](http://genescript.com/peptide_screening_tools.html)), no qual selecionamos o tamanho de 9-mer com sobreposição de 6 aminoácidos (60% do tamanho da sequência do peptídeo), o que originou uma série de sequências de peptídeos a serem avaliados quanto à sua imunogenicidade, conforme explicado a seguir.

Ainda na sessão de Predição de Epítomos de Células T” (*T cell epitope prediction*) do IEdB, na subseção “*T cell class I pMHC immunogenicity predictor*” avaliamos as sequências de peptídeos gerados a partir do gerador do GenScript™, no qual encontramos os valores de *score*. Quanto maior o *score*, maior será a imunogenicidade deste peptídeo. Após selecionarmos os peptídeos cujo  $IC_{50}$  fosse  $< 50$ , ou entre 50 e 500, na análise de capacidade de ligação e aqueles com *score* mais próximo de 1, selecionamos, preferencialmente, peptídeos que apresentassem essas duas características concomitantemente, no entanto, o valor de imunogenicidade foi priorizado.

#### 4.7. Determinação do grau de conservação

Avaliamos, em seguida, o grau de conservação dos peptídeos selecionados frente às sequências disponibilizadas da proteína NS3. Para isso, utilizamos o Alinhador Múltiplo de Sequências, disponibilizado no Banco de Dados de Flavivírus (FLAVIDB), no qual foram selecionadas todas as sequências da NS3 disponibilizadas no banco de dados, independente do sorotipo. Para a avaliação do grau de conservação, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Nº de sequências em que o peptídeo é localizado}}{\text{Nº total de sequencias dos sorotipos disponibilizadas no Banco de Dados}} \times 100$$

Desta forma, originamos 3 classes distintas de peptídeos: (i) os conservados, presentes nos quatro sorotipos; (ii) semi-conservados, presentes em dois ou três sorotipos distintos; e (iii) os sorotipo-específico, presente em apenas um sorotipo.

#### **4.8. Isolamento de DENV-2 e Crescimento de Massa Viral utilizando Células C6/36**

O isolamento e crescimento de massa viral da linhagem 0337/2008 do DENV-2 de caso fatal de paciente brasileiro, foi realizado por Nieli Rodrigues da Costa Faria, em colaboração com o Laboratório de Flavivírus (LabFla – IOC/FIOCRUZ). Para isso, células clone do mosquito *Aedes albopictus* (C6/36) foram mantidas em tubos de 1,5 x 16 cm, contendo 1,5 mL de meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA), com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) em estufa a 28°C. Após formação de monocamada, o meio foi substituído por igual volume de L-15 contendo 2% de SFB.

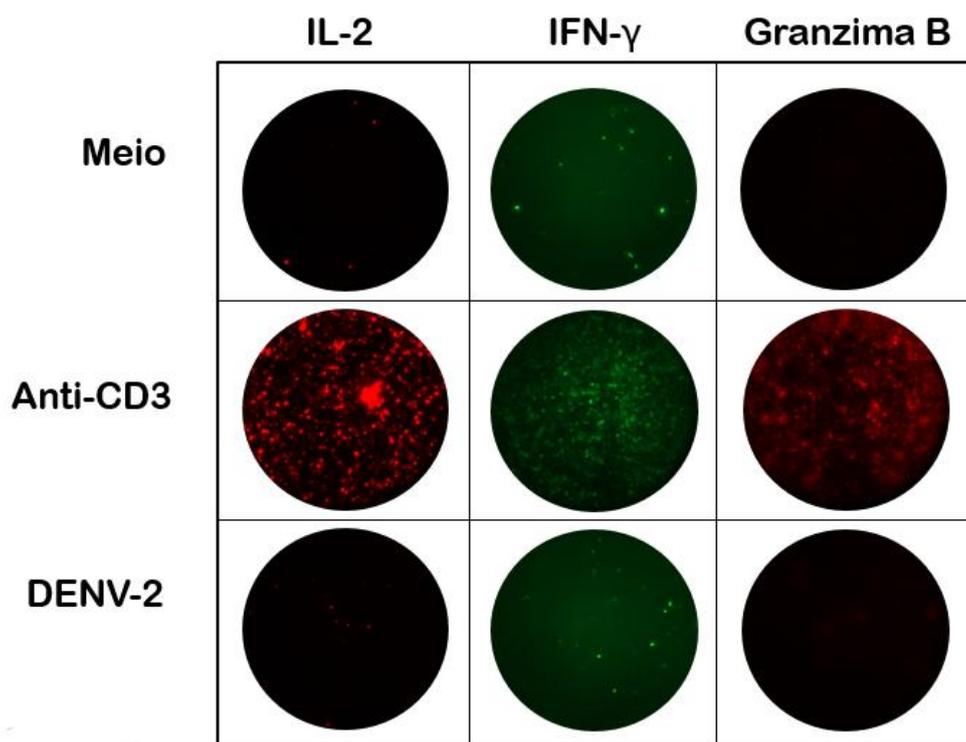
O isolamento do vírus foi feito a partir do soro do paciente que em seguida, foi adicionado na monocamada de células C6/36 cultivadas em meio L-15, acrescido de 10% SFB (Igarashi, 1978). O volume de 100µL da amostra de vírus isolado do paciente foi diluído 1:10 (50 µL da amostra + 450 µL meio L-15) antes de ser inoculado na monocamada de C6/36. Controles foram incluídos utilizando um determinado vírus de amostra já identificada como controle positivo ou células não-inoculadas como controle negativo. Após inoculação da amostra isolada de paciente, os tubos foram incubados à 28°C e observados diariamente por um período de 10 a 14 dias, em microscópio óptico invertido (Zeiss - Deutschland, Alemanha) com aumento de até 400 vezes. As passagens foram realizadas utilizando 25µL do sobrenadante de cultura com o isolado original na monocamada celular, ao invés da amostra original na diluição 1:10.

A titulação do inóculo viral foi realizada por diluição em série em placas de microtitulação e detectada por imunofluorescência, como já descrito (Miagostovich *et al.*, 1993; Reed & Muench, 1938). O título do Vírus foi calculado como 50 por cento da dose de infecção de cultura de tecidos (TCID<sub>50</sub>) (Schoepp & Beaty, 1984), resultando numa concentração de 5x10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, passagem #7.

#### 4.9. Ensaio de FluoroSpot para IFN- $\gamma$ /IL-2 e IFN- $\gamma$ /Granzima B

Conforme indicação do fabricante, e em ambiente estéril, a placa pré-sensibilizada com anticorpos de captura para as citocinas testadas, foi lavada 4 vezes com 200  $\mu$ L/poço de PBS estéril. Em seguida, 200  $\mu$ L de meio estéril contendo 10% de SFB foi adicionado por poço seguindo incubação por 30 minutos à temperatura ambiente para condicionamento da membrana. Posteriormente, o meio foi removido por versão de placa e adicionado 100  $\mu$ L/poço dos seguintes estímulos: (i) meio contendo anticorpo monoclonal anti-CD28A (0,1  $\mu$ g/mL, fornecido pelo kit); (ii) Anticorpo monoclonal anti-CD3-2, (diluição 1:1000, fornecido pelo kit) mais anti-CD28A (0,1  $\mu$ g/mL); e (iii) Antígeno total de DENV-2 0337/2008, na concentração 1:10 conjuntamente com o anti-CD28A (0,1  $\mu$ g/mL). Em seguida, foi adicionado 100  $\mu$ L/poço da suspensão de células ( $2-3 \times 10^5$  células/100  $\mu$ L/poço). A placa foi incubada por 20 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Em condições não estéreis, as células foram recuperadas antes e durante as 5 lavagens com 200  $\mu$ L/poço de PBS (Tópico 4.10, Metodologia). As células recuperadas foram mantidas em geladeira para posterior marcação extracelular por Citometria de Fluxo. Em seguida, foi adicionado 100  $\mu$ L/poço dos anticorpos de detecção 7-B6-1-FS-FITC (1:200) e IL2-II-Biotin (1  $\mu$ g/mL) diluídos em PBS contendo 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*, do inglês Albumina de Soro Bovino) seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi novamente lavada 5 vezes com 200  $\mu$ L/poço de PBS e foi adicionado 100  $\mu$ L/poço anti-FITC-Green (1:200) e SA-Red (1:200) diluídos em PBS-1% BSA, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. A partir desta etapa, a placa foi protegida em relação da exposição à luz. A placa foi lavada 5 vezes com 200  $\mu$ L/poço de PBS, e foi adicionado 50  $\mu$ L/poço do Amplificador de fluorescência (*Fluorescence enhancer*), seguido de incubação por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado por versão e o resíduo do Amplificador de fluorescência foi removido batendo firmemente a placa sobre um papel absorvente. Por fim, a membrana inferior foi removida e a placa posta para secar no escuro à temperatura ambiente até a leitura no equipamento ImmunoSpot S6UV Ultra (Plataforma de EliSpot – PDTIS-Fiocruz).



**Figura 4.4. FluoroSpot de Células Produtoras de Spots para IFN- $\gamma$ , IL-2 e Granzima B de PBMCs pacientes DENV+ frente a diferentes antígenos.** Imagem representativa dos spots formados a partir das PBMC de um paciente representativo cultivadas em meio, anticorpo anti-CD3 e antígeno DENV-2 (0337/2008), todos na presença de anticorpo anti-CD28, por 20 horas a 37 °C.

#### 4.10. Recuperação de Células da Metodologia de FluoroSpot

Após o período de incubação de 20h com os estímulos, as células foram recuperadas dos poços antes e durante as lavagens. As suspensões celulares foram cuidadosamente retiradas de cada poço da placa de Fluorospot e transferidas para minitubos de citometria. O mesmo procedimento foi realizado em cada uma das 5 lavagens da placa de Fluorospot, tomando-se muito cuidado para não comprometer a membrana. Em seguida, os minitubos foram centrifugados a 1300 rpm por 7 minutos a 4°C, seus sobrenadantes desprezados por versão de tubo e as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L/tubo de PBS. As suspensões celulares foram agrupadas em apenas um tubo de acordo com o paciente e com a condição de estímulo.

#### 4.11. Marcação Extracelular por Citometria de Fluxo

Para a realização da marcação extracelular, os minitubos contendo as células recuperadas foram centrifugados a 1300 rpm por 7 minutos a 4°C, o sobrenadante desprezado por versão de tubo e as células ressuspendidas com 200 µL/tubo de solução de bloqueio (PBS, 1% BSA, 0,1% Azida), seguido de incubação por 30 minutos à 4° C. Após o bloqueio, as células dos minitubos foram transferidas para os poços da placa de 96 poços para realização da marcação extracelular por citometria de fluxo. A placa foi centrifugada a 1300rpm, 7 minutos a 4° C e o sobrenadante foi desprezado por versão de placa. Em seguida, foi adicionado 20 µL/poço dos anticorpos monoclonais diluídos em solução de lavagem (PBS, 1% BSA, 0,1% Azida). Segue tabela abaixo com a combinação dos anticorpos monoclonais utilizados na marcação (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Combinação de anticorpos monoclonais para marcação extracelular por citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo	Diluição	Clone	Catálogo	Fabricante
CD3	Pacific Blue	1:100	HIT3a	300330	Biolegend
CD4	PECy7	1:100	OKT4	317414	Biolegend
CD8	PerCP	1:100	SK1	344708	Biolegend
CD62L	PE	1:25	LAM1-116	MHCD62L04	Caltag
CCR7	AF 647	1:20	4B12	560766	BD Pharmingen
CD45RO	APCCy7	1:50	UCHL1	304228	Biolegend

A placa foi incubada 30 minutos a 4° C. Após incubação, foi adicionado 100 µL/poço de solução de lavagem sobre as células diluídas com o mAb, e a placa foi centrifugada a 1300rpm, 7 minutos a 4° C e o sobrenadante foi desprezado por versão de placa. Esta lavagem foi realizada duas vezes. Em seguida, as células foram fixadas com 100 µL/poço de solução de paraformaldeído a 2% e incubadas por 20 minutos a 4° C. Após fixação, a placa foi centrifugada a 1300rpm, 7 minutos a 4° C e o sobrenadante foi desprezado por versão de placa. O *pellet* foi lavado duas vezes em solução de lavagem, ressuspendido com 200 µL de PBS 1x e transferido para tubos de citometria. As células foram mantidas a 4° C até a aquisição no FACS ARIA BD (Plataforma de Citometria – PDTIS - FIOCRUZ) e as análises feitas através do software FlowJo

7.6. A combinação dos marcadores para a diferenciação das subpopulações está representada na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Combinação de marcadores para diferenciação de subpopulações de linfócitos T

<b>Subpopulação</b>	<b>Marcadores</b>
Linfócito T naive	CD4/8 <sup>pos</sup> CD45RO <sup>neg</sup> CCR7 <sup>pos</sup> CD62L <sup>pos</sup>
Linfócito T de Memória Central	CD4/8 <sup>pos</sup> CD45RO <sup>pos</sup> CCR7 <sup>pos</sup> CD62L <sup>pos</sup>
Linfócito T de Memória Efetora/Efector	CD4/8 <sup>pos</sup> CD45RO <sup>pos</sup> CCR7 <sup>neg</sup> CD62L <sup>neg</sup>

#### 4.12. Análises Estatísticas

As diferenças entre os grupos de pacientes com relação aos dados demográficos, laboratoriais e clínicos foram feitas pelo Teste T não-paramétrico Mann-Whitney U e análises de correlação pela de Spearman. Para a análise dos dados obtidos pelo FluoroSpot foi utilizado o Teste não paramétrico pareado Wilcoxon. Para a Citometria de fluxo foi utilizado o Test T pareado. Para as associações dos alelos de HLA com a classificação clínica e dados laboratoriais, foi utilizada a análise RATE. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. O software utilizado para a análise foi The Prism 5 statistics (GraphPad, US).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV

Sessenta pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado em pelo menos um dos testes (Tópico 4.2, Metodologia) compõe a coorte de pacientes utilizados neste estudo. A classificação dos pacientes foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo Programa de Treinamento e Investigações de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial de Saúde (TRS/OMS, 2009). O primeiro grupo foi constituído por 36 pacientes com características de Febre do Dengue sem Sinais de Alarme (FD), caracterizados principalmente por febre, cefaléia, dor na região retro-orbital, mialgia, artralgia, anorexia, náusea e leucopenia. O segundo grupo foi composto por 22 pacientes com características de Febre do Dengue com Sinais de Alarme (FDSA), no qual dois pacientes graves foram incluídos no grupo, originando os FDSA/Grave (n=24). A proporção entre os sexos foi semelhante entre os três grupos. Em relação aos dias de doença que foram contados da data do aparecimento dos primeiros sinais/sintomas até a data da coleta da amostra de sangue, observou-se que o grupo FDSA/Grave é constituído por pacientes com mais tempo de apresentações clínicas comparado ao grupo FD ( $p=0.0076$ ) (Tabela 5.1). Pacientes FDSA apresentaram além dos sinais/sintomas da FD, dor abdominal e/ou vômito persistente, hemorragias e plaquetopenia. Treze dos 19 pacientes (68,4%) que compõe o grupo FDSA/Grave manifestaram hemorragias do tipo petéquias, epistaxe, gengivorragia, melena, hematúria e/ou metrorragia. Ainda no grupo FDSA/Grave, dois dos 17 (11,8%) pacientes apresentaram algum tipo de extravasamento vascular, como ascite, derrame pleural e/ou do pericárdico. Estes dados estão descritos na Tabela 5.1.

Em relação aos parâmetros laboratoriais, a plaquetopenia é a alteração hematológica mais frequente na infecção pelo DENV. Desta forma, foi observado que o grupo FDSA/Grave apresentou trombocitopenia mais acentuada comparado ao grupo FD ( $p=0.0012$ ), confirmando que a trombocitopenia é de fato um parâmetro de evolução de gravidade da doença (Tabela 5.1).

Na dengue, alterações como trombocitopenia, neutropenia e leucopenia com presença de linfócitos atípicos e aumento do hematócrito são frequentemente observadas. Em nossa coorte de pacientes não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes quanto ao número total de leucócitos nem na frequência de linfócitos T CD4 e T CD8. Não observamos alteração no percentual de hematócrito entre os grupos, embora vale ressaltar que a variação do hematócrito é dificultada, uma vez que em geral os pacientes são rapidamente submetidos à hidratação intravenosa (Tabela 5.1).

Em relação às transaminases hepáticas AST/TGO (Aspartato Aminotransferase/Transaminase Glutâmico-Oxalacética) e ALT/TGP (Alanina Aminotransferase/ Transaminase glutâmico-pirúvica), pacientes FDSA/Grave apresentaram aumento de ambas as transaminases em relação aos pacientes FD ( $p=0.0020$  para AST/TGO e  $p=0.02$  para ALT/TGP) (Tabela 5.1).

Em relação a confirmação de diagnóstico para dengue, o teste sorológico anti-Dengue IgM confirmou 67% (20/29) no grupo FD e 100% (23/23) do grupo FDSA/Grave. Quanto aos resultados do anti-Dengue IgG, 62,5% (15/24) confirmaram infecção secundária no grupo FD, enquanto que no grupo FDSA/Grave 95,6 % (22/23) foram positivos ao teste. Dentre o grupo FD, 52% (10/19) tiveram a confirmação da infecção através do teste imunoenzimático que avalia a presença de NS1 solúvel, enquanto que no grupo FDSA/Grave foram 55% (11/20). O sorotipo viral foi confirmado por RT-PCR em 29% (11/38) dos pacientes testados (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1.** Características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes infectados pelo DENV.

Características	Classificação		Valores de Referência
	FD <sup>n=36</sup>	FDSA/Graves <sup>n=24</sup>	
<b>Dados demográficos</b>			
Idade em anos <sup>a</sup>	40,2 ± 15,9	41,4 ± 18,1	
Sexo <sup>b</sup> , Fem <sup>b</sup>	18/36 (50)	14/24 (58,3)	
Dias de doença <sup>a,c</sup>	4,1 ± 2,4 <sup>n=33</sup>	6,3 ± 3,2 <sup>n=22</sup> *	
<b>Sinais clínicos e sintomas</b>			
Sangramento <sup>b, c</sup>	3/27 (33,33)	13/19 (68,4)	
Extravasamento plasmático <sup>b, e</sup>	0/30 (0)	2/17 (11,8)	
<b>Parâmetros laboratoriais</b>			
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> <sup>a</sup>	146,5 ± 52,7 <sup>n=30</sup>	90 ± 77,1 <sup>n=23</sup> *	150 a 400
Leucócitos x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> <sup>a</sup>	4431 ± 1657 <sup>n=29</sup>	4653 ± 2394 <sup>n=23</sup>	4000 a 11000
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> % <sup>a</sup>	34,1 ± 10,6 <sup>n=8</sup>	24,5 ± 9,8 <sup>n=6</sup>	
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup> <sup>a</sup>	1784 ± 908,6 <sup>n=8</sup>	1011 ± 539,9 <sup>n=5</sup>	
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> % <sup>a</sup>	21,4 ± 3,4 <sup>n=8</sup>	19,1 ± 2,5 <sup>n=6</sup>	
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup> <sup>a</sup>	1081 ± 420,1 <sup>n=8</sup>	842,5 ± 406,9 <sup>n=5</sup>	
TGO U/L	62,7 ± 44,5 <sup>n=12</sup>	225,9 ± 162,4 <sup>n=18</sup> *	15 a 37
TGP U/L	80,67 ± 43,9 <sup>n=12</sup>	176,4 ± 112,0 <sup>n=18</sup> *	30 a 60
NS1 positivo <sup>b</sup>	10/19 (52,6)	11/20 (55)	
anti-Dengue IgM <sup>b</sup>	20/29 (67)	23/23 (100)	
anti-Dengue IgG <sup>b</sup>	15/24 (62,5)	22/23 (95,6)	
DENV-1:DENV-2:DENV-4	17:4:15	7:2:15	

FD, Febre do Dengue. SA, Sinal de Alarme. Dados expressos em Média ± Desvio Padrão ou n/total (%)<sup>a</sup>; Dias de doença<sup>c</sup>, corresponde ao dia do início dos sintomas até o momento em que o paciente foi entrevistado; Sangramentos<sup>d</sup>, inclui petéquias, epistaxe, gengivorragia, melena, hematúria e/ou metrorragia. Extravasamento plasmático, inclui sinais como ascite, derrame pleural e/ou do pericárdio. Os sorotipos foram identificados pelo ensaio de RT-PCR. Os dados apresentados fazem referência aqueles confirmados e a prevalência do sorotipo viral nas epidemias. Valores de referência, valores controle utilizados para a realização de hemogramas completos (Fonte: Failace & Fernandes. Hemograma: Manual de Interpretação. 6 ed. 2003). As diferenças estatísticas entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de Mann Whitney U. O \* representa valores de p<0.05 entre pacientes FD *versus* FDSA/Grave. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento, Livre e Esclarecido. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, Sistema Plataforma Brasil número CAAE 13318113.7.3001.0021.

## **5.2. Correlação entre os parâmetros laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV**

Para avaliar possíveis associações entre os parâmetros laboratoriais relacionados ao desfecho clínico dos pacientes, realizamos análises de correlação de Spearman entre os dados. Na Tabela 5.2, as plaquetas foram correlacionadas inversamente com dias de doença e transaminases, enquanto que diretamente com linfócitos totais.

Como o esperado, as transaminases hepáticas ALT/TGO e AST/TGP foram fortemente correlacionadas entre si, assim como com o número absoluto de linfócitos T CD4 e CD8. Esses dados indicam que dias de doença, contagem de plaquetas e as dosagens de AST/TGO e ALT/TGP são parâmetros potenciais no prognóstico da dengue.

**Tabela 5.2.** Correlação entre os dados laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV.

	Plaquetas	Dias de Doença	AST/TGO	ALT/TGP	Leucócitos Totais	Linfócitos Totais	Monócitos %	Linfócitos T CD4+	Linfócitos TCD8+
<b>Plaquetas</b>	-								
<b>Dias de Doença</b>	<b>r(-)0,2876 p=0,0428 n=50</b>	-							
<b>AST/TGO</b>	<b>r(-)0,5832 p=0,0007 n=30</b>	ns <sup>n=28</sup>	-						
<b>ALT/TGP</b>	<b>r(-)0,4159 p=0,0222 n=30</b>	ns <sup>n=28</sup>	<b>r(+),9194 p&lt;0,0001 n=30</b>	-					
<b>Leucócitos Totais</b>	ns <sup>n=52</sup>	ns <sup>n=49</sup>	ns <sup>n=30</sup>	ns <sup>n=30</sup>	-				
<b>Linfócitos Totais</b>	<b>r(+),4922 p=0,0015 n=39</b>	<b>r(-)0,5187 p=0,0008 n=38</b>	<b>r(-)0,5655 p=0,0049 n=23</b>	<b>r(-)0,5808 p=0,0037 n=23</b>	<b>r(+),3853 p=0,0154 n=39</b>	-			
<b>Monócitos %</b>	ns <sup>n=26</sup>	<b>r(+),5345 p=0,0059 n=25</b>	<b>r(+),4419 p=0,0395 n=22</b>	ns <sup>n=22</sup>	ns <sup>n=26</sup>	ns <sup>n=25</sup>	-		
<b>Linfócitos T CD4+</b>	ns <sup>n=13</sup>	<b>r(-)0,6467 p=0,0231 n=12</b>	ns <sup>n=10</sup>	ns <sup>n=10</sup>	<b>r(+),8281 p=0,0005 n=13</b>	ns <sup>n=11</sup>	ns <sup>n=9</sup>	-	
<b>Linfócitos TCD8+</b>	ns <sup>n=13</sup>	<b>r(-)0,6502 p=0,0221 n=12</b>	ns <sup>n=10</sup>	ns <sup>n=10</sup>	<b>r(+),9381 p&lt;0,0001 n=13</b>	ns <sup>n=11</sup>	ns <sup>n=9</sup>	<b>r(+),8352 p=0,0004 n=13</b>	-

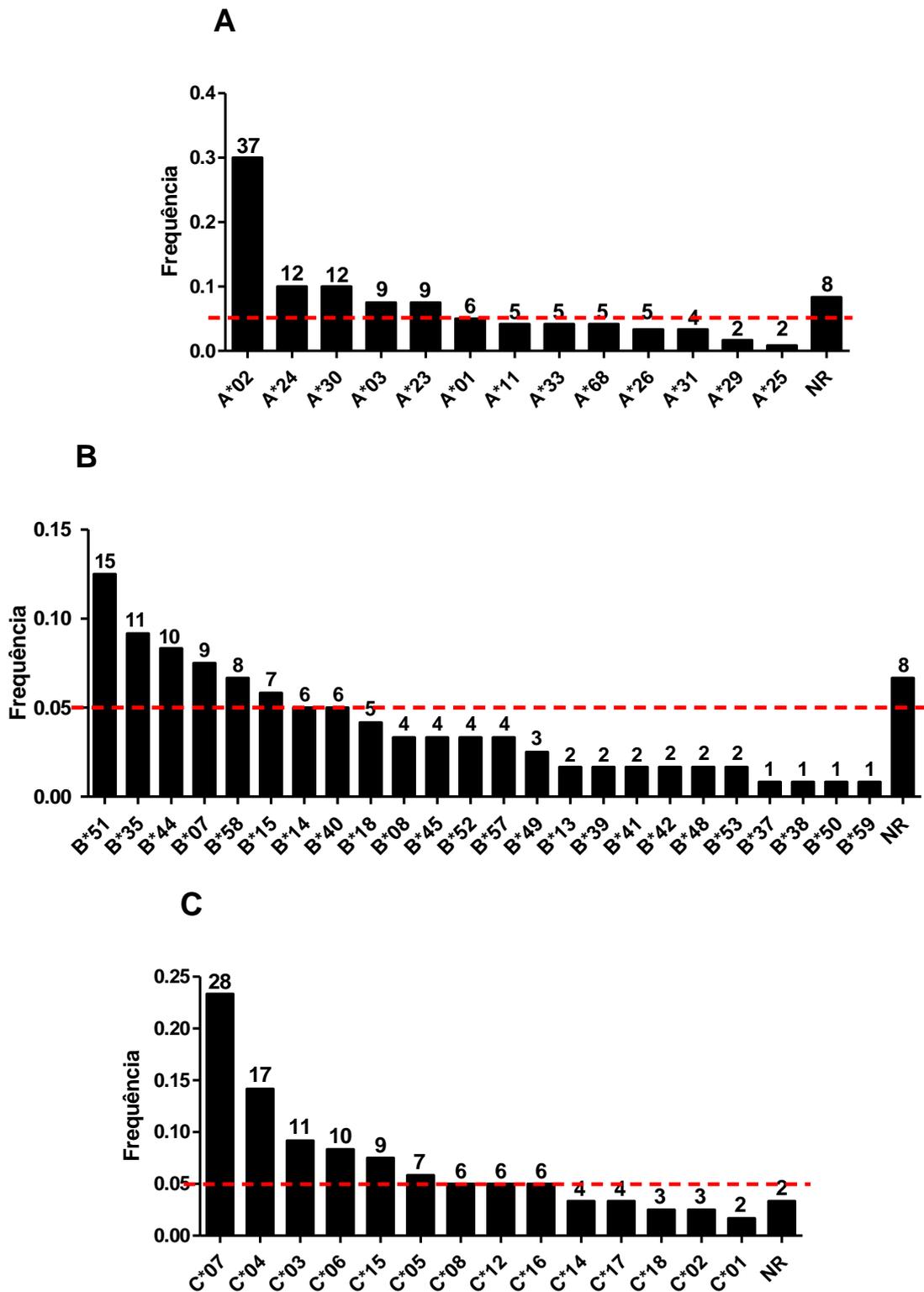
Ns, não significativo. N, número de pares analisados. Realizado correlação de Spearman. Valores de p <0.05 foram considerados significativos. Verdes correspondem correlação direta, vermelhos, inversa.

### 5.3. Frequência gênica dos alelos de HLA Classe I e HLA Classe II dos pacientes

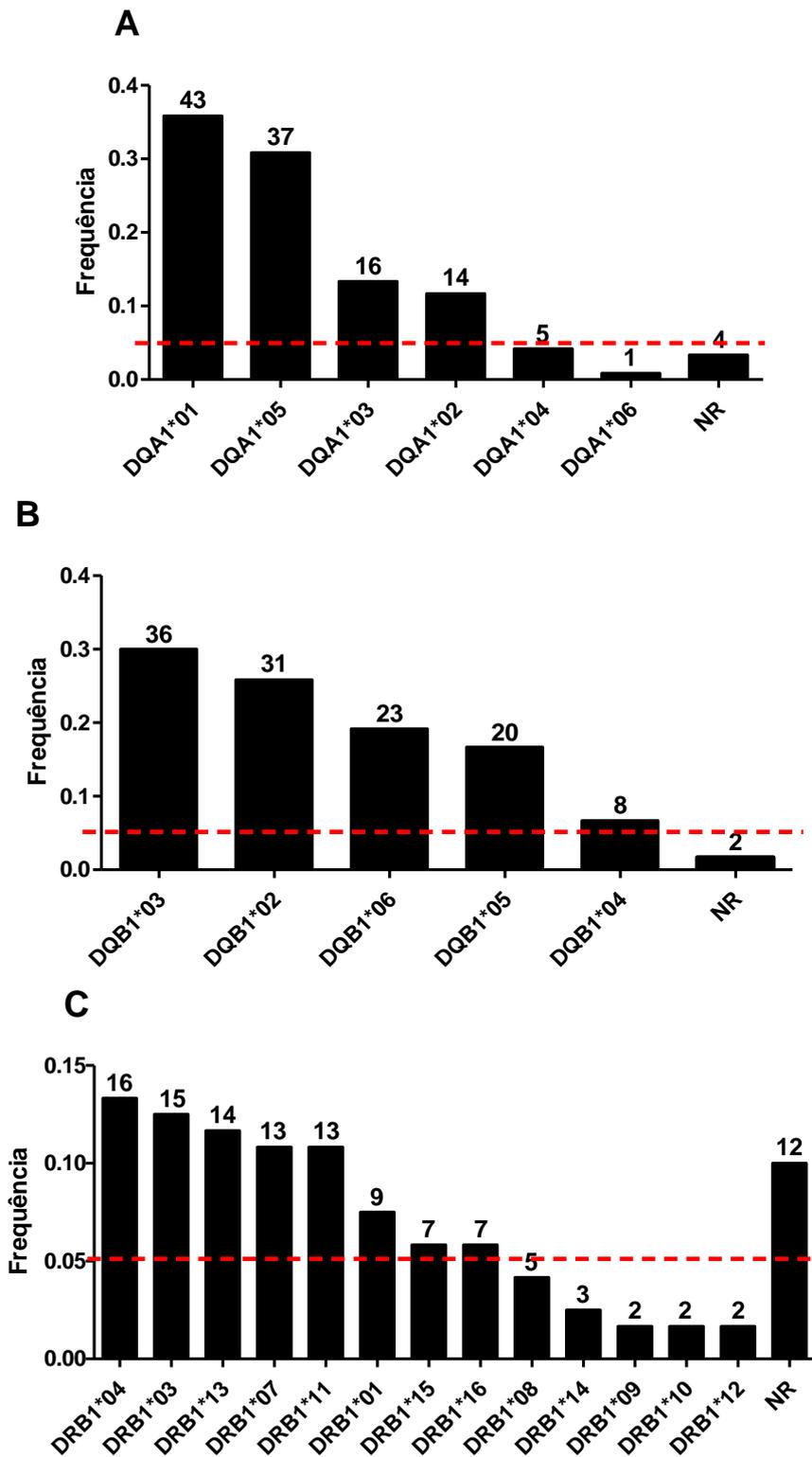
Como descrito no tópico 1.2.1.2.1 da Introdução, os genes HLA de classe I incluem os HLA-A, B e C e os de classe II, HLA-DQA1, DQB1 e DRB1. Como parte de nossos objetivos, avaliamos os genes HLA de classe I e II dos pacientes relacionando-os primeiro ao desfecho clínico, e em seguida a capacidade dos linfócitos T desses indivíduos responderem ao antígeno viral DENV-2, tanto pela produção de citocinas quanto pela diferenciação dessas células.

Os alelos com frequência acima de 5% foram considerados os mais frequentes (Nguyen *et al.*, 2008) na nossa população de estudo. Dentre os alelos HLA-A, os mais frequentes foram HLA-A\*02, \*30, \*24, \*03, \*23 e \*01 (Figura 5.1 – A); dentre os HLA-B, HLA-B\*51, \*35, \*44, \*15, \*07, \*58 e \*40 (Figura 5.1 – B); e dentre os HLA-C, HLA-C\*07, \*04, \*03, \*06, \*15, \*08 e \*05 (Figura 5.1 – C).

Em relação aos alelos HLA classe II, dentre os HLA-DQA1, os mais frequentes foram HLA-DQA1\*01, 05, 03 e 02 (Figura 5.2 – A); dentre os HLA-DQB1, DQB1\*03, \*02, \*06, \*05 e \*04 (Figura 5.2 – B); e dentre HLA-DRB1, os HLA-DRB1\*13, \*04, \*03, \*07, \*11, \*01, \*15 e \*16 (Figura 5.2 – C).



**Figura 5.1. Frequência gênica dos 120 alelos HLA Classe I em pacientes-DENV+.** Em **A**, alelos HLA-A, **B**, alelos HLA-B e em **C**, alelos HLA-C. Barras correspondem à frequência de cada alelo e o valor acima de cada barra corresponde ao número de vezes que o alelo foi observado. Linha vermelha pontilhada determina os alelos com frequência acima de 5%, considerados como os mais frequentes (0.05). NR, não teve amostras suficientes para ser realizado.



**Figura 5.2. Frequência gênica dos 120 alelos HLA Classe II em pacientes-DENV+.** Em **A**, alelos HLA-DQA1, **B**, alelos HLA-DQB1 e em **C**, alelos HLA-DRB1. Barras correspondem à frequência de cada alelo e o valor acima de cada barra corresponde ao número de vezes que o alelo foi observado. Linha vermelha pontilhada determina os alelos com frequência acima de 5%, considerados como os mais frequentes (0.05). NR, não teve amostras suficientes para ser realizado.

#### 5.4. Associação entre alelos de HLA Classe I e II com as formas clínicas e contagem de plaquetas

No item 1.2.1.2.1.1 da Introdução, organizamos os quadros 1.1 e 1.2 que resumem brevemente dados da literatura nos quais os alelos HLA classe I e II vem sendo associados à susceptibilidade ou resistência à infecção pelo DENV. Na tentativa de realizar uma análise similar, selecionamos apenas os pacientes com os alelos HLA mais frequentes (acima de 0,05) e agrupamos esses pacientes de acordo com a forma clínica, em FD e FDSA/Grave, e em seguida, de acordo com a contagem de plaquetas, aqueles com contagem acima e abaixo de 150 000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (>150mil versus <150mil, respectivamente), considerando que a plaquetopenia tem um valor preditivo muito bem estabelecido por diversos autores. Para isto, realizamos análise através da ferramenta RATE (Restrictor Analysis Tool for Epitopes) disponibilizada livremente ([http://iedb-rate.liai.org/no\\_prediction](http://iedb-rate.liai.org/no_prediction)).

Inicialmente, RATE foi desenhado para análises de predição de peptídeos de alta afinidade em determinados HLA, mas segundo os próprios autores do artigo (Paul *et al*, 2015), essa ferramenta também pode ser adaptada para análises de associação de frequência de alelos de HLA e outros parâmetros. O RATE utiliza teste exato de Fisher e o valor de p já faz a consideração da correção de Bonferroni. Numa primeira análise pelo RATE, observamos associação entre pacientes FDSA/Graves que foram preferencialmente portadores do alelo HLA-A\*03 (A+R+) comparado aos pacientes FD (A+R-). Em contraste, pacientes FD portadores do alelo HLA-B\*15 (A+R-) foram mais frequentes do que aqueles FDSA/Graves portadores do mesmo alelo (A+R+) (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3.** Associação entre alelos HLA classe I e classificação clínica.

FD vs. FDSA/Grave	A+R+	A-R+	A+R-	A-R-	OR	Pvalor
HLA-A*03	7	17	2	33	0,679	0,024
HLA-B*15	0	24	7	28	0	0,034

A+, pacientes portadores do alelo avaliado. A-, pacientes portadores de alelos diferentes daquele avaliado. R+, pacientes classificados como FDSA/Grave. R-, pacientes classificados como FD. OR, odds ratio. O p valor foi obtido pela análise utilizando o teste Exato de Fisher seguido de correção de Bonferroni.  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

O mesmo tipo de análise foi realizado para a contagem de plaquetas. Segundo nossos dados, pacientes com contagem inferior a 150 000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (R-) são aqueles portadores dos alelos HLA-B\*35 (A+R-) e HLA-C\*04 (A+R-). Em contraste,

pacientes com contagem acima de 150 000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (R+) são aqueles portadores do alelo HLA-DQA1\*02 (A+R+) e HLA-DRB1\*07 (A+R+), dados mostrados na Tabela 5.4.

**Tabela 5.4.** Associação entre alelos HLA classe I e II e contagem de plaquetas.

> 150 mil vs. < 150 mil	A+R+	A-R+	A+R-	A-R-	OR	P valor
HLA-B*35	0	18	9	25	0	0,020
HLA-C*04	1	17	11	23	0,123	0,040
HLA-DQA1*02	7	11	4	30	0,477	0,033
HLA-DRB1*07	7	11	3	31	0,657	0,022

A+, pacientes portadores do alelo avaliado. A-, pacientes portadores de alelos diferentes daquele avaliado. R+, pacientes com contagem de plaquetas superior a 150 mil (>150 mil). R-, com contagem de plaquetas inferior a 150 mil (<150 mil). OR, odds ratio. O *p* valor foi obtido pela análise utilizando o teste Exato de Fisher seguido de correção de Bonferroni. *P* < 0,05 foram considerados significativos.

### 5.5. Associação de Haplótipos de HLA classe I e II com as formas clínicas

A partir das associações individuais de cada alelo de HLA classe I e II, avaliamos também a presença de possíveis haplótipos envolvidos na resistência ou susceptibilidade à gravidade da dengue. Sendo assim, uma vez que o alelo A\*03 mostrou-se associado ao desenvolvimento da forma FDSA/Grave (Tabela 5.3) e os alelos B\*35 e C\*04 mostraram-se associados com a contagem de plaquetas inferior a 150 mil (Tabela 5.4), buscamos avaliar possíveis associações do haplótipo: A\*03/B\*35/C\*04, A\*03/B\*35, A\*03/C\*04 ou B\*35/C\*04 com o quadro clínico. De acordo com as nossas análises, não observamos qualquer associação significativa entre essas possíveis combinações de alelos envolvidas com a gravidade. No entanto, observamos que o haplótipo A\*03/C\*04 foi visto em um paciente FD, mas com contagem de plaquetas inferior a 150 mil. Ainda, o haplótipo B\*35/C\*04 foi observado em dois pacientes FDSA/Grave e seis FD, todos com contagem de plaquetas inferior a 150 mil.

De forma semelhante, o alelo B\*15 mostrou-se associado ao desenvolvimento de FD (Tabela 5.3) e os alelos DQA1\*02 e DRB1\*07 mostraram-se associados com contagens de plaquetas superior a 150 mil (Tabela 5.4). Desta forma, buscamos avaliar possíveis associações dos haplótipos: B\*15/DQA1\*02/DRB1\*07, B\*15/DQA1\*02, B\*15/DRB1\*07 ou DQA1\*02/DRB1\*07 com a forma branda da doença. As análises de associação demonstraram que o paciente KF01 com a forma clínica FD e contagem de plaquetas inferior a 150 mil apresentou o haplótipo

B\*15/DQA1\*02/DRB1\*07. O haplótipo DQA1\*02/DRB1\*07 foi observado em 5 pacientes FD, 4 deles apresentando contagem de plaquetas superior a 150 mil. A tabela descritiva contendo todos os alelos de HLA classe I e II dos pacientes avaliados está como anexo A.

## 5.6. Associação dos Supertipos HLA-A e HLA-B com formas clínicas e contagem de plaquetas

A classificação dos alelos HLA-A e B em supertipos foi baseada no estudo de Sidney e colaboradores (2008). Todos os alelos foram inicialmente apresentados com o código NMDP (Programa Norte-Americano de Doadores de Medula, do inglês *National Marrow Donor Program*). Nós decodificamos esse código em números, através da ferramenta de busca disponibilizada pelo site do Programa Nacional de Doadores de Medula ([bioinformatics.bethematchclinical.org/](http://bioinformatics.bethematchclinical.org/)). Assim, os alelos de HLA-A foram classificados em 6 supertipos A (A01, A01A03, A01A24, A02, A03 e A24) e o HLA-B em 7 supertipos B (B07, B08, B27, B44, B50, B62 e B68).

Em relação aos supertipos A, observamos associação entre o supertipo A03 e contagem de plaquetas inferior a 150 mil e entre o supertipo A24 com contagem de plaquetas superior a 150 mil (Tabela 5.5). Não foi observada associação entre os supertipos A e a classificação clínica, nem dos supertipos B com a classificação clínica ou contagem de plaquetas.

**Tabela 5.5.** Associação entre supertipos de HLA classe I e contagem de plaquetas.

> 150 mil vs. < 150 mil	A+R+	A-R+	A+R-	A-R-	OR	P valor
Supertipo A03	3	15	21	13	0,124	0,003
Supertipo A24	10	8	8	26	0,406	0,030

A+, pacientes portadores do supertipo avaliado. A-, pacientes portadores de supertipos diferentes daquele avaliado. R+, pacientes com contagem de plaquetas superior a 150 mil (>150 mil). R-, com contagem de plaquetas inferior a 150 mil (<150 mil). OR, odds ratio. O *p* valor foi obtido pela análise utilizando o teste Exato de Fisher seguido de correção de Bonferroni. *P* < 0,05 foram considerados significativos.

## 5.7. Predição de epítomos

Tem sido demonstrado que células T CD8+ reconhecem mais frequentemente e vigorosamente as proteínas NS3, NS4B e NS5 do DENV, enquanto que as proteínas do capsídeo, envelope e igualmente NS3 são alvos dominantes das células T CD4+ (Simons et al., 2005; Duangchinda et al., 2010; Weiskopt et al., 2011; Rivino et al.,

2013; Weiskopf et al., 2013). Desta forma, a proteína NS3 dos quatro sorotipos do DENV, assim como os alelos de HLA classe I acima de 5% de frequência em nossa coorte de pacientes foram selecionados para a predição de peptídeos (Tópico 5.3, Resultados).

Vinte peptídeos distintos foram selecionados com as seguintes características: 9 aminoácidos de comprimento (9-mer), Score próximo a 1 indicando alta imunogenicidade dos peptídeos, SMM IC50, no qual valores de SMM IC50 <50 nM representam aqueles de alta afinidade, enquanto que entre 50<x<500 de afinidade intermediária. Esta análise resultou na predição de dois peptídeos conservados presentes nos quatro sorotipos DENV; onze peptídeos semi-conservados, comuns a dois ou três sorotipos do DENV e sete peptídeos sorotipo específicos (Tabela 5.6). O grau de conservação foi dado a partir da localização do peptídeo em todas as sequências dos diferentes peptídeos disponibilizados no Banco de Dados de Flavivírus (FLAVIdB - [cvc.dfc.harvard.edu/flavi/](http://cvc.dfc.harvard.edu/flavi/)). Só foram considerados peptídeos que apresentassem conservação maior ou igual a 95% nas sequências da NS3 disponibilizadas no FLAVIdB.

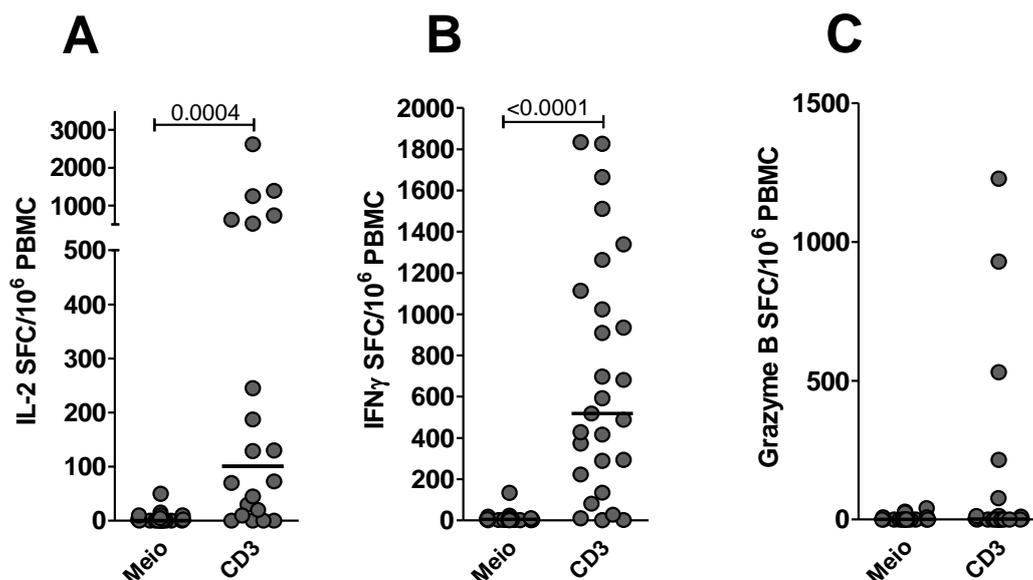
**Tabela 5.6.** Peptídeos preditos a partir da proteína não estrutural NS3.

	Peptídeos	Tamanho <sup>a</sup>	Posição		Score <sup>d</sup>	SMM IC50(nM) <sup>e</sup>	Alelos	% Conservação <sup>f</sup>
			Começo <sup>b</sup>	Fim <sup>c</sup>				
1	KTVWFVPSI	9	358	366	0.28301	74,05-337,37	A*02, A*30 e B*58	99.72%. Todos os sorotipos.
2	RRGDLPVWL	9	538	546	0.17634	58.64-245	C*07	99,64%. Todos os sorotipos.
3	IMDEAHFTD	9	283	291	0.29798	104.60-278.72	A*02 e C*07	98.20%. DENV-1, 2 e 3.
4	QRRGRIGRN	9	457	465	0.28542	28.98	C*07	99.76%. DENV-1, 2 e 4.
5	MGEAAAIFM	9	307	315	0.32752	67.08-457.67	A*02, B*35 e C*07	99.66%. DENV-1, 3 e 4.
6	VVAAEMEEA	9	226	234	0.12727	186.02	A*02	99.93%. DENV-2, 3 e 4.
7	NMDVEIWTK	9	577	585	0.48114	107.94-226.55	C*07	99.53%. DENV-1 e 3.
8	IIPALFEPE	9	505	513	0.21319	268.87	A*02	99.70%. DENV-1 e 3.
9	NDWDFVTT	9	400	408	0.30460	99.81	C*07	99.77%. DENV-2 e 3.
10	RRGRIGRNP	9	457	465	0.26448	87.33-158.98	C*07	95%. DENV-2 e 4.
11	RYLPAIVRE	9	202	210	0.21370	47.55	C*07	95.58%. DENV-1 e 2.
12	TDGPERVIL	9	436	444	0.25866	109.19	C*07	99.52%. DENV-3 e 4.
13	GDLPVWLSY	9	541	549	0.12793	310.58	C*07	98.71%. DENV-1 e 4.
14	SDRRWCFDG	9	559	567	0.34559	230.23	C*07	99.39%. DENV-1.
15	SGHEWVTFD	9	346	354	0.41153	90.19	C*07	97.02%. DENV-2.
16	ILTDGEERV	9	433	441	0.27691	128.27	A*02	98.96%. DENV-2.
17	NSGNEWITD	9	346	354	0.44550	115.66-444.81	C*07	93.50%. DENV-3.
18	VQKEGVFHT	9	40	48	0.22031	96.28	A*02	99.07%. DENV-3.
19	TGFDWITDY	9	346	354	0.44702	38.12-367.77	B*35 e C*07	100%. DENV-4.
20	TQAERIGEP	9	166	174	0.37623	171.61	A*02	97.67%. DENV-4.

Os peptídeos foram preditos por meio da ferramenta de predição *consensus* disponível no Banco de Dados de Epitopos Imunes (IEDB). Todos os peptídeos foram preditos a partir da sequência de aminoácidos da proteína não estrutural NS3 do DENV. Tamanho <sup>a</sup>, número de aminoácidos que compõe o peptídeo. Começo <sup>b</sup> e Fim <sup>c</sup>, localização do peptídeo na sequência de aminoácido da proteína NS3. Score <sup>d</sup>, representa a imunogenicidade dos peptídeos. SMM IC50 <sup>e</sup>, representa a capacidade de ligação do peptídeo aos seus alelos específicos. % Conservação, grau de conservação, que foi dado a partir da localização do peptídeo em todas as sequências dos diferentes peptídeos disponibilizados no Banco de Dados de Flavivírus (FLAVIdb).

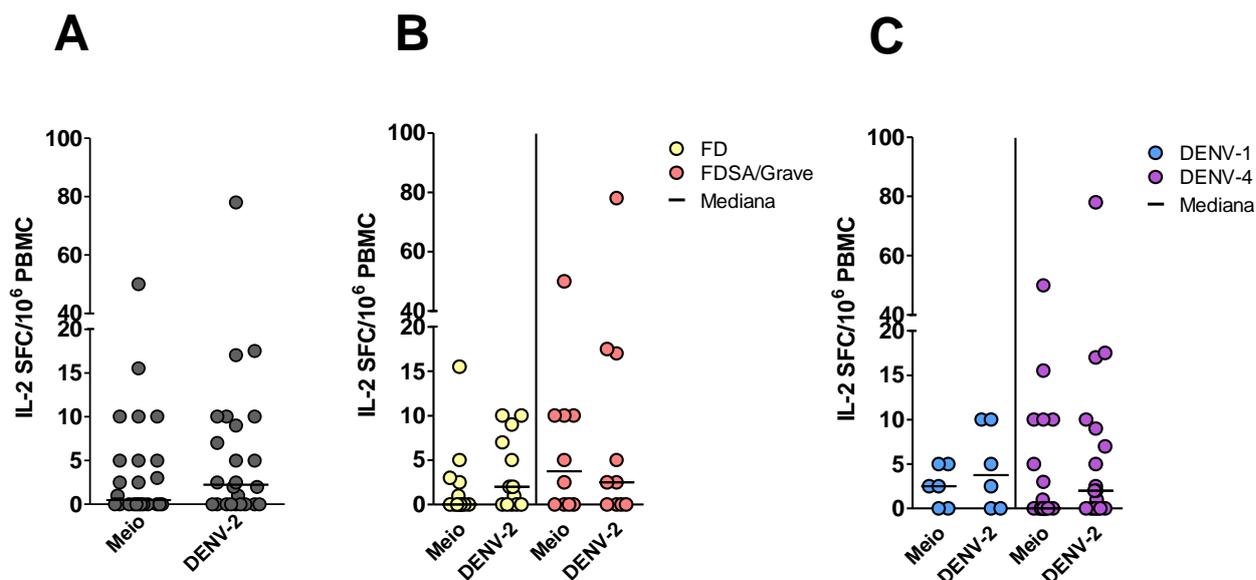
## **5.8. Avaliação da resposta aos diferentes estímulos, incluindo a antígeno total de DENV-2 (0337/2008) das PBMCs de pacientes por FluoroSpot**

Todos os ensaios de FluoroSpot foram realizados na presença de meio e anticorpo monoclonal anti-CD28, no qual avaliamos a capacidade de estimulação basal das células dos pacientes e ainda, da mistura dos anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28, como nosso controle positivo de estimulação, no qual é verificada a capacidade efetora das células dos pacientes frente a um estímulo policlonal. Conforme demonstrado na Figura 5.3, independente da forma clínica dos pacientes, 80% (16 de 20) deles responderam ao estímulo policlonal anti-CD3 + anti-CD28 em relação ao estímulo basal meio de cultura + anti-CD28, quanto ao número de células formadoras de spots (SFCs) para IL-2 (A), de forma significativa ( $p = 0,0004$ ). Ainda, 89% (24 de 27) dos pacientes responderam ao IFN- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ) (B) e 43% (10 dos 23) responderam a Granzima B (C), mas de forma não-significativa, ao estímulo policlonal comparado ao estímulo basal. Portanto, esses resultados indicam que uma grande maioria dos pacientes apresentam um *status* imunológico competente, com células respondedoras ao estímulo policlonal à resposta para o IL-2 e IFN- $\gamma$ , mas não à Granzima B.



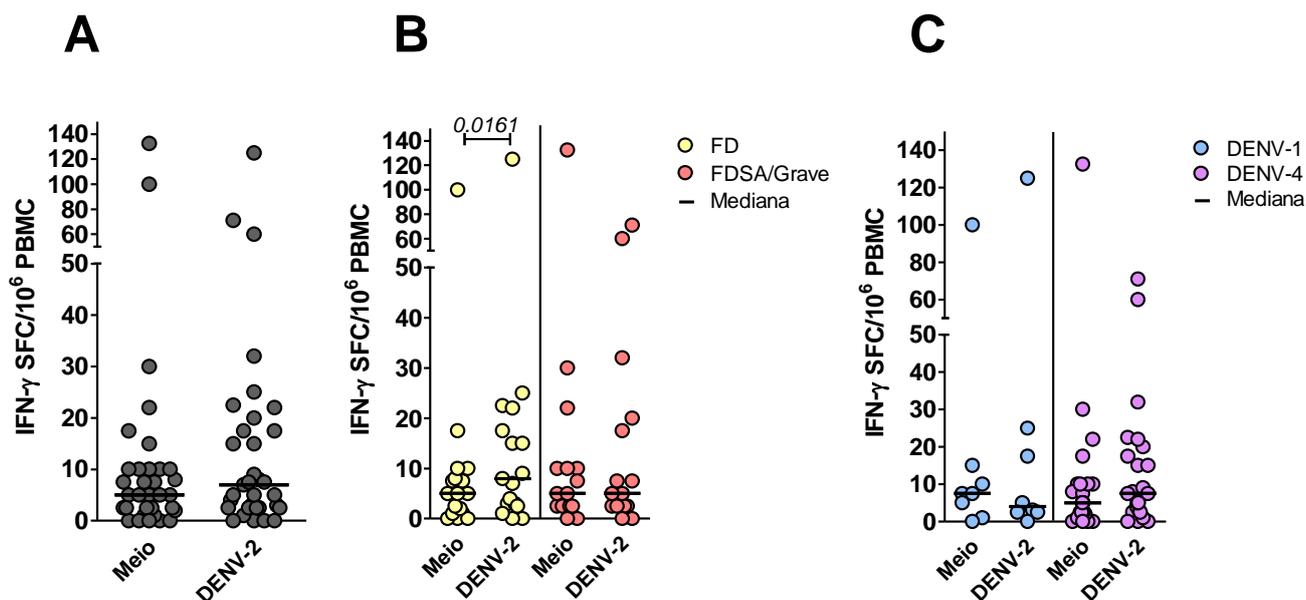
**Figura 5.3. Células Formadoras de “Spots” (SFC) para IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B em células de pacientes-DENV+ após estímulo policlonal com anti-CD3.** Nos eixos horizontais são identificadas as condições de cultivo celular: estimulação basal em meio na presença de anticorpo monoclonal anti-CD28 (1 ug/ml); estimulação policlonal na presença da mistura de anticorpos monoclonais anti-CD3 (1:1000) e anti-CD28 (1 ug/ml). Em A, B e C foram representados gráficos de todos os pacientes-DENV+ nos quais a estimulação das células foi feita com estímulo policlonal comparado ao basal quanto às SFC para IL-2 (n=20) (A), IFN- $\gamma$  (n=27) (B) e Granzima B (n=20) (C). Barras horizontais representam a mediana. Teste não-paramétrico Wilcoxon Matched Pairs (Graph Prism 6.0) foi usado e valores de  $P < 0.05$  foram considerados significativos.

Na Figura 5.4 temos os dados do SFC para IL-2 no qual podemos observar em A que embora 37,5% dos pacientes, independente da forma clínica ou sorotipo viral infectante, responderam ao antígeno DENV-2 comparado a condição basal de estimulação, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em seguida, avaliamos se agrupando os pacientes de acordo com a forma clínica existiria alguma diferença. Em B verificamos que 46% (6/13) dos pacientes FD, enquanto apenas 20% (2/10) dos pacientes FDSA responderam ao antígeno DENV-2 comparado ao basal, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 5.7). Ainda, em relação ao sorotipo viral infectante, observamos que 67% (4/6) dos pacientes-DENV-1 e 28% (5/18) dos pacientes DENV-4 respondem ao antígeno DENV-2 comparado ao basal, mas novamente essa diferença não foi significativa estatisticamente (C) (Tabela 5.8).



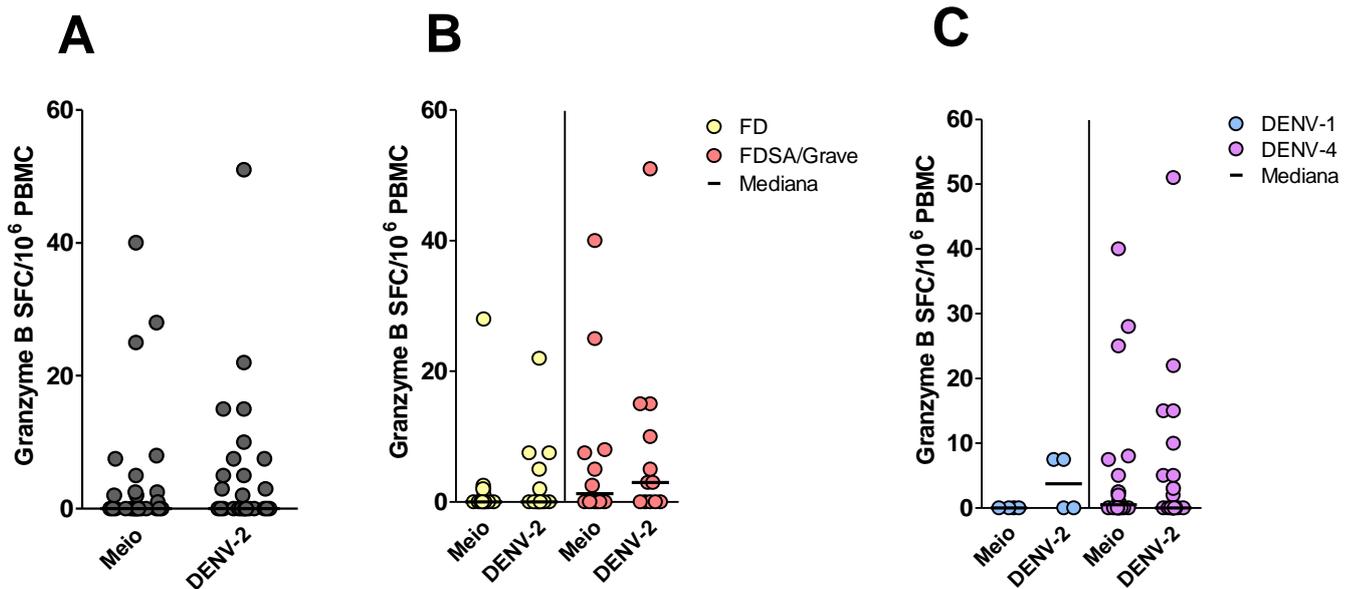
**Figura 5.4. Células Formadoras de “Spots” (SFC) para IL-2 em células de pacientes-DENV+ após diferentes estímulos.** Nos eixos horizontais são identificadas as condições de cultivo celular: estimulação basal em meio na presença de anticorpo monoclonal anti-CD28 (1 ug/ml); estimulação policlonal na presença da mistura de anticorpos monoclonais anti-CD3 (1:1000) e anti-CD28 (1 ug/ml) e estimulação antígeno específico na presença de Ag total DENV-2 (1:10) e anti-CD28 (1 ug/ml). Dados de SFC para IL-2 frente ao antígeno DENV-2 comparado ao basal em que foram agrupados todos os pacientes (n=23) (A), de acordo com a forma clínica (B) e quanto ao sorotipo viral infectante (C). Foram testados pacientes na forma clínica FD (n=13) e na forma clínica FDSA (n=10). Nenhum paciente na forma Grave foi testado. Em relação ao sorotipo viral infectante, DENV-1 (n= 6) e DENV-4 (n= 17). Barras horizontais representam a mediana. Teste não-paramétrico Wilcoxon Matched Pairs (Graph Prism 6.0) foi usado e valores de  $P < 0.05$  foram considerados significativos.

A mesma forma de análise foi feita para SFC de IFN- $\gamma$ . Na Figura 5.5 podemos observar em A que 39% dos pacientes, independente da forma clínica ou sorotipo viral infectante, responderam ao antígeno DENV-2 comparado a condição basal de estimulação, essa diferença não foi estatisticamente significativa. De acordo com a forma clínica, em B verificamos que 41% (7/17) dos pacientes FD respondem ao antígeno DENV-2 comparado ao basal, e essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p = 0,0161$ ). Quarenta % (6/15) dos pacientes FDSA respondem ao antígeno DENV-2, mas sem significância estatística em relação a condição basal (Tabela 5.7). Em relação ao sorotipo viral infectante, observamos que 37,5% (3/8) dos pacientes-DENV-1 e 40% (10/25) dos pacientes DENV-4 responderam ao antígeno DENV-2 comparado ao basal, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas (C) (Tabela 5.8).



**Figura 5.5. Células Formadoras de “Spots” (SFC) para IFN- $\gamma$  em células de pacientes-DENV+ após diferentes estímulos.** Nos eixos horizontais são identificadas as condições de cultivo celular: estimulação basal em meio na presença de anticorpo monoclonal anti-CD28 (1 ug/ml); estimulação policlonal na presença da mistura de anticorpos monoclonais anti-CD3 (1:1000) e anti-CD28 (1 ug/ml) e estimulação antígeno específico na presença de Ag total DENV-2 (1:10) e anti-CD28 (1 ug/ml). Dados de SFC para IFN- $\gamma$  frente ao antígeno DENV-2 comparado ao basal em que foram agrupados todos os pacientes (n=32) (A), de acordo com a forma clínica (B) e quanto ao sorotipo viral infectante (C). Foram testados pacientes na forma clínica FD (n=17) e na forma clínica FDSA (n=15). Nenhum paciente na forma Grave foi testado. Em relação ao sorotipo viral infectante, DENV-1 (n= 8) e DENV-4 (n= 24). Barras horizontais representam a mediana. Teste não-paramétrico Wilcoxon Matched Pairs (Graph Prism 6.0) foi usado e valores de  $P < 0.05$  foram considerados significativos.

Por fim, a análise foi feita para SFC de Granzima B. Na Figura 5.6 podemos observar em A que 23% dos pacientes, independente da forma clínica ou sorotipo viral infectante, respondam ao antígeno DENV-2 comparado a condição basal de estimulação, essa diferença não foi estatisticamente significativa. De acordo com a forma clínica, em B verificamos que 21% (3/14) dos pacientes FD e 25% (3/12) dos pacientes FDSA respondem ao antígeno DENV-2 comparado ao basal (Tabela 5.7). Essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Em relação ao sorotipo viral infectante, 50% (2/4) dos pacientes-DENV-1 e 18% (4/22) dos pacientes DENV-4 respondem ao antígeno DENV-2 comparado ao basal, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas (C) (Tabela 5.8).



**Figura 5.6. Células Formadoras de “Spots” (SFC) para Granzima B em células de pacientes-DENV+ após diferentes estímulos.** Nos eixos horizontais são identificadas as condições de cultivo celular: estimulação basal em meio na presença de anticorpo monoclonal anti-CD28 (1 ug/ml); estimulação policlonal na presença da mistura de anticorpos monoclonais anti-CD3 (1:1000) e anti-CD28 (1 ug/ml) e estimulação antígeno específico na presença de Ag total DENV-2 (1:10) e anti-CD28 (1 ug/ml). Dados de SFC para IFN- $\gamma$  frente ao antígeno DENV-2 comparado ao basal em que foram agrupados todos os pacientes (n=26) (A), de acordo com a forma clínica (B) e quanto ao sorotipo viral infectante (C). Foram testados pacientes na forma clínica FD (n=14) e na forma clínica FDSA (n=12). Nenhum paciente na forma Grave foi testado. Em relação ao sorotipo viral infectante, DENV-1 (n= 4) e DENV-4 (n= 22). Barras horizontais representam a mediana. Teste não-paramétrico Wilcoxon Matched Pairs (Graph Prism 6.0) foi usado e valores de  $P < 0.05$  foram considerados significativos.

**Tabela 5.7.** Número de células formadoras de “Spots” de IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B dos pacientes DENV+ frente aos diferentes estímulos de acordo com a forma clínica do paciente-DENV+

	Número de Células Formadoras de Spots (SFCs) por 10 <sup>6</sup> PBMCs								
	IL-2			IFN- $\gamma$			Granzima B		
	Meio	$\alpha$ CD3	DENV-2	Meio	$\alpha$ CD3	DENV-2	Meio	$\alpha$ CD3	DENV-2
<b>FD</b>									
AFS	-	-	-	7	-	<b>17</b>	0	-	<b>7</b>
DV-21	0	-	<b>10</b>	100	-	125	-	-	-
GCS	2	1250	<b>5</b>	1	935	<b>3</b>	0	7	0
MCFV	-	-	-	7	1262	<b>25</b>	0	530	<b>7</b>
LJL	5	-	0	0	-	0	-	-	-
JGS	15	245	9	8	487	3	28	2	22
SSS	3	738	<b>7</b>	5	592	4	2	77	2
ZS	-	-	-	17	517	22	2	0	<b>5</b>
NML	-	-	-	10	-	15	0	-	0
AGS	0	-	<b>10</b>	10	-	0	-	-	-
ENA	1	73	0	0	680	<b>7</b>	1	1	0
LBO	0	0	1	0	80	1	0	0	0
DCM	0	30	0	1	1825	<b>8</b>	0	3	0
LEHB	0	1388	<b>2</b>	5	1663	<b>22</b>	0	10	0
HRBS	0	0	0	2	222	2	0	0	0
KF	0	129	<b>2</b>	2	697	<b>15</b>	2	10	0
AF	0	45	0	5	1510	9	0	0	0
<b>Mediana</b>	0	101	2	5	688	8	0	2,5	0
<b>[25-75%]</b>	[0-3]	[22-866]	[0-8]	[1-9]	[495-1448]	[3-20]	[0-2]	[0-10]	[0-6]
<b>Resp.</b>			<b>46,1%</b>			<b>41%</b>			<b>21,4%</b>
<b>FDSA</b>									
GBS	10	624	17	22	908	32	40	929	51
CA	50	2620	78	132	1832	71	8	1227	3
CS	0	187	<b>5</b>	2,5	1337	2	-	-	-
ES	0	70	0	0	134	0	7	12,5	10
ABS	10	525	2,5	10	372	2	5	215	<b>15</b>
RC	10	130	17,5	2	427	<b>20</b>	-	-	-
LSF	-	-	-	7	292	<b>17</b>	2	12,5	<b>5</b>
NRP	-	-	-	30	-	<b>60</b>	25	-	15
DV-09	2	0	0	5	1	2	0	0	0
DV-10	0	0	<b>2</b>	10	10	2	-	-	-
HAA	0	20	0	2	416	<b>7</b>	0	0	0
MTC	5	10	0	2	289	<b>5</b>	0	0	0
LSSC	-	-	-	0	27	<b>7</b>	0	0	<b>3</b>
RDTN	-	-	-	5	1112	5	0	0	0
ELA	-	-	-	10	1022	0	0	0	0
<b>Mediana</b>	4	100	2,5	5	394	5	1	0	3
<b>[25-75%]</b>	[0-10]	[8-550]	[0-17]	[2-10]	[107-394]	[2-20]	[0-8]	[0-215]	[0-14]
<b>Resp.</b>			<b>20%</b>			<b>40%</b>			<b>25%</b>

FD, Febre do Dengue. SA, Sinais de Alarme. Resp., Respondedores. Os pacientes foram divididos de acordo com a classificação clínica (OMS, 2009). Valores em negrito correspondem aos pacientes respondedores ao antígeno. O critério utilizado para a caracterização dos respondedores foi que o valor de SFCs frente ao antígeno DENV-2 ser no mínimo duas vezes maior que o observado nas condições sem estimulação (Meio). Foram adicionados CD28 em todas as condições de teste. Traços (-) representam condições não testadas. Respondedores (%) representam a frequência de respondedores dentro do n testado. As condições de estímulo consistiram em: meio com anti-CD28 (1 ug/ml) para a condição não estimulada; Ag total DENV-2 (1:10) com anti-CD28 (1 ug/ml), para o estímulo teste; ou, anti-CD3 (1:1000) com anti-CD28 (1 ug/ml), como o estímulo policlonal.

**Tabela 5.8.** Número de células formadoras de “Spots” de IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B dos pacientes DENV+ frente aos diferentes estímulos de acordo com o sorotipo viral infectante do paciente-DENV+

Número de Células Formadoras de Spots (SFCs) por 10 <sup>6</sup> PBMCs									
	IL-2			IFN- $\gamma$			Granzima B		
	Meio	$\alpha$ CD3	DENV-2	Meio	$\alpha$ CD3	DENV-2	Meio	$\alpha$ CD3	DENV-2
<b>DENV-1</b>									
AFS	-	-	-	7	-	17	0	-	7
DV-21	0	-	10	100	-	125	-	-	-
DV-42	5	-	10	15	-	5	-	-	-
GCS	2	1250	5	1	935	3	0	7	0
MCFV	-	-	-	7	1262	25	0	530	7
LJL	5	-	0	0	-	0	-	-	-
DV-09	2	0	0	5	1	2,5	0	0	0
DV-10	0	0	2	10	10	2,5	-	-	-
<b>Mediana</b>	2	0	4	7	472	4	0	7	4
<b>[25-75%]</b>	[0-5]	[0-1250]	[0-10]	[2-14]	[3-1181]	[2-23]	[0-0]	[0-530]	[0-7,5]
<b>Resp.</b>			<b>67%</b>			<b>37,5%</b>			<b>50%</b>
<b>DENV-2</b>									
ASB	10	525	2	10	372	2	5	215	15
AGS	0	-	10	10	-	0	-	-	-
CA	50	2620	78	132	1832	71	8	1227	3
CS	0	187	5	2	1337	2	-	-	-
ES	0	70	0	0	134	0	7,5	12	10
GBS	10	624	17	22	908	32	40	929	51
JGS	15,5	245	9	8	487	3	28	2	22
LFS	-	-	-	7	292	17	2	12	5
NML	-	-	-	10	-	15	0	-	0
NRP	-	-	-	30	-	60	25	-	15
RC	10	130	17	2	427	20	-	-	-
SSS	3	738	7	5	592	4	2	77	2
ZS	-	-	-	17	517	22,5	2	0	5
ENA	1	73	0	0	680	7	1	1	0
LBO	0	0	1	0	80	1	0	0	0
DCM	0	30	0	1	1825	8	0	3	0
LEHB	0	1388	2	5	1663	22	0	10	0
HRBS	0	0	0	2	222	2,5	0	0	0
KF	0	129	2	2	697	15	2	10	0
AF	0	45	0	5	1510	9	0	0	0
HAA	0	20	0	2	416	7	0	0	0
MTC	5	10	0	2	289	5	0	0	0
LSSC	-	-	-	0	27	7	0	0	3
RDTN	-	-	-	5	1112	5	0	0	0
ELA	-	-	-	10	1022	0	0	0	0
<b>Mediana</b>	0	129	2	5	555	7	0	1,5	0
<b>[25-75%]</b>	[0-10]	[25-574]	[0-9]	[2-10]	[292-1169]	[2,5-19]	[0-6]	[0-12]	[0-6]
<b>Resp.</b>			<b>28%</b>			<b>40%</b>			<b>18%</b>

Resp., Respondedores. Os pacientes foram divididos de acordo com o sorotipo prevalente da epidemia nas quais foram coletadas as amostras. Valores em negrito correspondem aos pacientes respondedores ao antígeno. O critério utilizado para a caracterização dos respondedores foi que o valor de SFCs frente ao antígeno DENV-2 ser no mínimo duas vezes maior do que o observado nas condições de não estimulação (Meio). Foram adicionados CD28 em todas as condições de teste. Traços (-) representam condições não testadas. Respondedores (%) representam a frequência de respondedores dentro do n testado. As condições de estímulo consistiram em: meio com anti-CD28 (1 ug/ml) para a condição não estimulada; Ag total DENV-2 (1:10) com anti-CD28 (1 ug/ml), para o estímulo teste; ou, anti-CD3 (1:1000) com anti-CD28 (1 ug/ml), como o estímulo policlonal.

### 5.9. Associação entre alelos de HLA e resposta de IL-2, IFN- $\gamma$ e Granzima B dos pacientes DENV+ frente aos estímulos DENV-2 Ag e anti-CD3 por FluoroSpot

Ao avaliarmos a associação dos alelos de HLA classe I e II com a capacidade dos pacientes infectados com o DENV de serem responsivos ou não ao antígeno total de DENV-2, observamos associação do alelo HLA-C\*03 com pacientes que foram responsivos ao Ag DENV-2 quanto à liberação de Granzima B ( $p=0.015$ ) (Tabela 5.9).

**Tabela 5.9.** Associação entre alelos HLA e a liberação de Granzima B frente a estímulo com Ag DENV-2 em pacientes infectados pelo DENV

Resp. vs. Não Resp.	A+R+	A-R+	A+R-	A-R-	OR	P valor
HLA-C*03	4	2	2	17	0,17	0,015

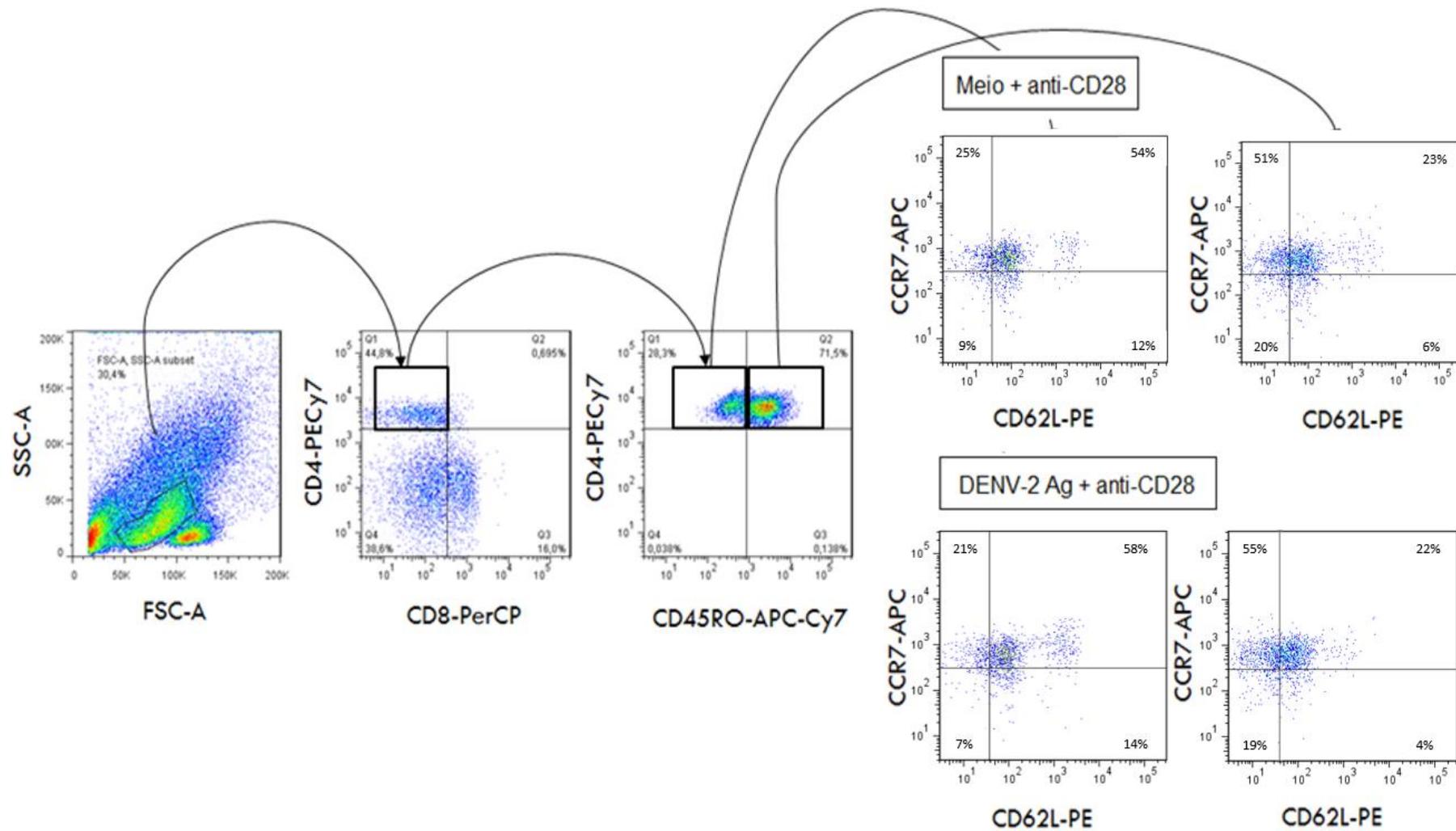
A+, pacientes portadores do alelo avaliado. A-, pacientes portadores de alelos diferentes daquele avaliado. R+, pacientes respondedores ao Ag total do DENV-2. R-, pacientes não respondedores ao Ag Total de DNEV-2. OR, odds ratio. O  $p$  valor foi obtido pela análise utilizando o teste Exato de Fisher seguido de correção de Bonferroni.  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

### 5.10. Avaliação do status de diferenciação dos linfócitos T após diferentes estímulos, incluindo antígeno total de DENV-2 (0337/2008), recuperadas do Fluorospot, por Citometria de Fluxo

Como explicado no tópico 3.10 da Metodologia, foi realizada a fenotipagem dos linfócitos T recuperados da metodologia de Fluorospot após a etapa de estimulação com meio, estímulo policlonal anti-CD3 e com Ag total DENV-2. Todas as condições com a adição do co-estímulo anti-CD28. A estratégia de *gate*, tanto para linfócitos T CD4+, quanto para T CD8+, foi realizada conforme mostrado na Figura 5.7. Desta forma, foi observado uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4+ naive ( $CD45RO^{neg}CCR7^{pos}CD62L^{pos}$ ) quando comparadas as condições de estímulo com anti-CD3 e meio (Meio:  $68,5 \pm 11$  vs anti-CD3:  $66,4 \pm 10$ ;  $p=0,0465$ ), assim como um aumento na frequência de linfócitos T CD4+ de memória efetora/ efector ( $CD45RO^{pos}CCR7^{neg}CD62L^{neg}$ ) quando comparadas as condições de estímulo com DENV-2 Ag e meio (Meio:  $11,7 \pm 6$  vs DENV-2:  $15,3 \pm 7,6$ ;  $p=0,0024$ ). O mesmo não foi observado para o

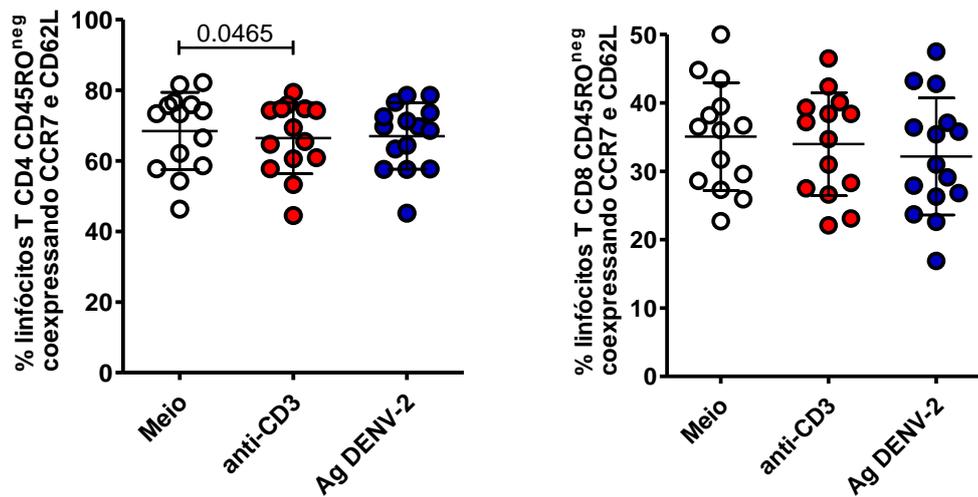
perfil de memória central (CD45RO<sup>pos</sup>CCR7<sup>pos</sup>CD62L<sup>pos</sup>) quando comparadas as condições de estímulo, conforme mostrado na Figura 5.8.

Quando avaliamos a frequência dos perfis de linfócitos T CD8+, observamos um aumento na frequência de linfócitos T CD8 de memória efetora/efetor (CD45RO<sup>pos</sup>CCR7<sup>neg</sup>CD62L<sup>neg</sup>) quando comparadas as condições de estímulo com anti-CD3 e meio (Meio: 23,8 ± 6,5 vs anti-CD3: 25,9 ± 5,5;  $p=0,0436$ ). Não foi observado diferença nas frequências dos perfis de linfócitos T CD8+ naive (CD45RO<sup>neg</sup>CCR7<sup>pos</sup>CD62L<sup>pos</sup>) e de memória central (CD45RO<sup>pos</sup>CCR7<sup>pos</sup>CD62L<sup>pos</sup>) quando comparadas as condições de estímulo. Dados mostrados na Figura 5.8.

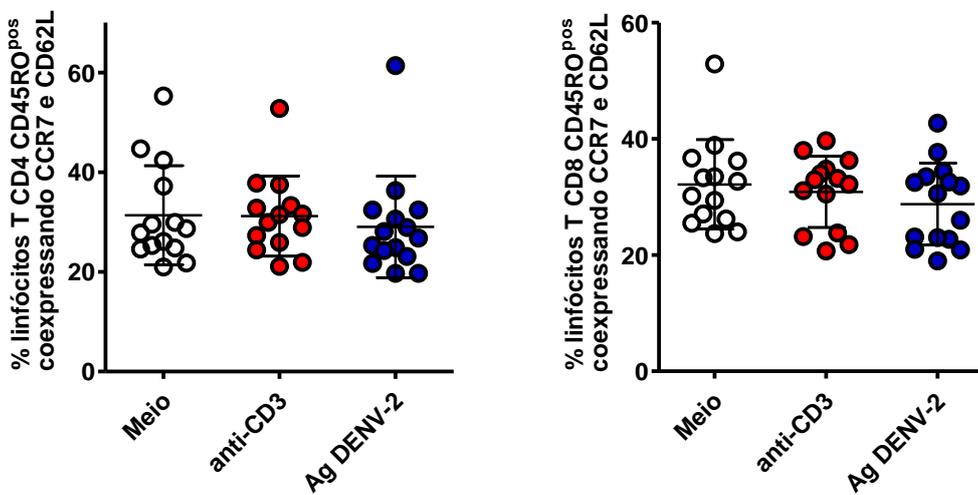


**Figura 5.7. Estratégia de gate.** Inicialmente foi selecionado o gate de linfócitos dentre o total de PBMCs. Em seguida, foi observada a dupla marcação CD4 e CD8 e selecionado o gate de linfócitos T CD4+, onde neste, foi observada a marcação de CD45RO. Por fim, foram originados 2 diferentes gates: o CD45RO+ e RO-. Em cada um deste, foi observada a co-marcação de CCR7 e CD62L, comparadas de acordo com a condição de estímulo prévio. A mesma estratégia foi utilizada para os linfócitos T CD8+. Para esta análise foi utilizado o software FlowJo.

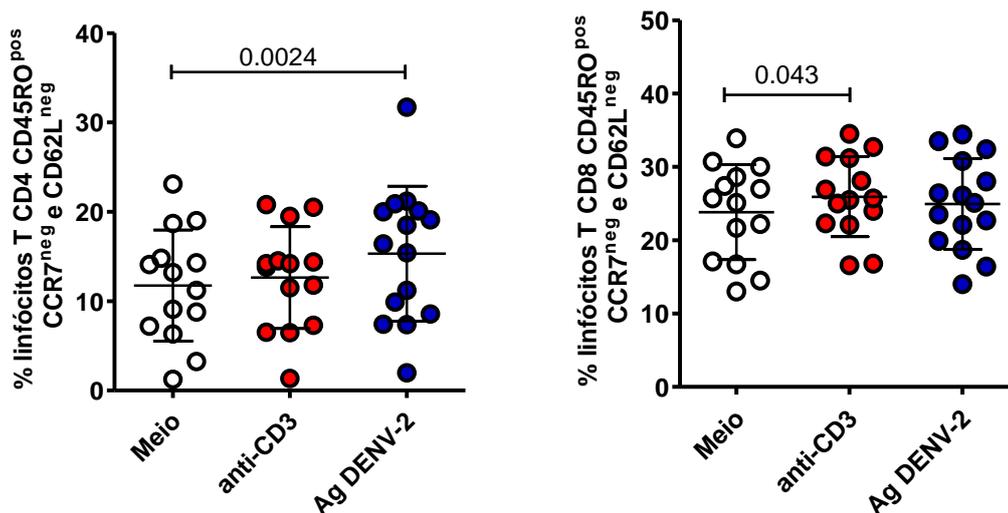
A



B



C



**Figura 5.8.** Frequência de Células T CD4 e CD8+ de perfil Naive (CD45RO<sup>neg</sup> CCR7<sup>pos</sup>CD62L<sup>pos</sup>) em A, de perfil Memória Central (CD45RO<sup>pos</sup> CCR7<sup>pos</sup>CD62L<sup>pos</sup>) em B, e de perfil Efetor ou Memória Efetora (CD45RO<sup>pos</sup> CCR7<sup>neg</sup>CD62L<sup>neg</sup>) em C, recuperadas após condições de estimulação com anti-CD28 (1 ug/ml) (pontos brancos), anti-CD3 (1:1000) + anti-CD28 (pontos vermelhos) ou com Ag total DENV-2 (1:10) + anti-CD28 (1 ug/ml) (pontos azuis) em Pacientes DENV+ (n=14). Barras horizontais representam a média ± desvio padrão. Teste não-paramétrico Paired T test (Graph Prism 6.0) foi usado e valores de P < 0.05 foram considerados significativos.

### 5.11. Correlação entre os status de diferenciação de linfócitos T com a contagem de spots de IL-2, IFN- $\gamma$ ou Granzima B após estímulo com antígeno total de DENV-2 (0337/2008) em pacientes

Para avaliar possíveis associações entre os *status* de diferenciação dos linfócitos T e padrão de liberação de IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B destas células após o estímulo com o DENV-2 Ag, realizamos a análise de correlação entre estes parâmetros. No entanto, não foi observado nenhuma associação entre os perfis de linfócitos T com o número de SFCs de IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B.

### 5.12. Associação entre alelos HLA classe I e II com a variação na frequência de células com *status* de diferenciação distintos após estímulo com antígeno total de DENV-2

Primeiramente, classificamos as frequências celulares como variáveis, aquelas que apresentassem uma razão entre as frequências nas condições de estímulo com DENV-2 e na condição de meio, maior que 1,2. Ao associarmos a variação dos perfis de diferenciação dos linfócitos T após estímulo com antígeno total de DENV-2 (DENV-2 Ag) com diferentes alelos de classe I e II, observamos que o alelo B\*58 está relacionado com a não variação na frequência de linfócitos T CD4+ de memória efetora (CDR45RO<sup>pos</sup> CCR7<sup>neg</sup> CD62L<sup>neg</sup>) após estimulação com Ag Total de DENV-2 (Dados na Tabela 5.10). Em relação aos linfócitos TCD8+, não foi observado nenhuma associação entre os perfis de diferenciação e os alelos.

**Tabela 5.10.** Associação entre alelos HLA e a frequência de perfis de diferenciação de pacientes infectados pelo DENV

Variável vs. Não Variável.	A+R+	A-R+	A+R-	A-R-	OR	Pvalor
HLA-B*58	0	7	3	2	0,0	0,045

A+, pacientes portadores do alelo avaliado. A-, pacientes portadores de alelos diferentes daquele avaliado. R+, pacientes com variação na frequência maior que 1,2 após estimulação com Ag Total de DENV-2. R-, com variação na frequência menor que 1,2 após estimulação com Ag Total de DENV-2. OR, odds ratio. O *p* valor foi obtido pela análise utilizando o teste Exato de Fisher seguido de correção de Bonferroni. *P* < 0,05 foram considerados significativos.

## 6 – DISCUSSÃO

Nosso estudo foi composto de 60 pacientes provenientes de três epidemias ocorridas nos anos de 2010, 2011 e 2013. Cada uma dessas epidemias foi caracterizada pela prevalência de um determinado sorotipo viral. Assim, em 2010 a prevalência foi do DENV-2, em 2011 DENV-1, e em 2013 DENV-4. A escolha desse painel de pacientes infectados por diferentes sorotipos se deu, inicialmente, com o objetivo de avaliar tanto a resposta celular específica, como a resposta celular cruzada, uma vez que utilizaríamos antígeno viral proveniente do DENV-2. De forma interessante, esse painel epidêmico em que há diferentes prevalências de sorotipos e também de formas clínicas, nos permitiu, ainda que de forma preliminar, correlacionar e associar sorotipos e formas clínicas com a frequência gênica de moléculas de MHC HLA de classe I e II e com a resposta celular T dos pacientes.

Relembrando, dentre os fatores envolvidos na fisiopatologia da dengue, o sorotipo viral é um deles. Fried e colaboradores (2010) observaram que o DENV-2 parece estar associado com FHD grau I quando comparado com DENV-1. Em relação a análise de infecções secundárias, eles observaram que DENV-2 e 3 eram duas vezes mais relacionados com FHD do que o DENV-4. No entanto, Yung e colaboradores (2015) avaliaram diferenças entre manifestações clínicas, parâmetros laboratoriais e risco de desenvolvimento da forma grave da dengue com o sorotipo viral. Os autores discutem o risco potencial de pacientes infectados pelo DENV-1 a desenvolver a forma grave quando comparados a pacientes infectados pelos DENV-2 ou DENV-3, indicando diferença na virulência do sorotipo viral (Yung *et al.*, 2015).

Nossa equipe publicou em 2012 um estudo com pacientes oriundos do Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro durante as epidemias de 2007-2008, com prevalência dos sorotipos DENV-2 e DENV-3. Nesta epidemia, 45,2% pacientes foram classificados como FD e 54,8% como FDSA/Grave (de-Oliveira Pinto *et al.*, 2012). Em outro estudo do nosso grupo, durante as epidemias de 2010-2011 nos mesmos estados brasileiros, ocorreu predominância dos sorotipos DENV-1, 2 e 3, e foi observado 56% de pacientes FD, 24% FDSA e 20% Grave (Torrentes-Carvalho *et al.*, 2014). Mais recentemente, em estudo ainda não publicado pelo

nosso grupo, durante epidemia de 2013 com prevalência de DENV-4, dos 181 pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado, 125 pacientes foram classificados como FD (70%), 54 como FDSA e apenas 2 casos graves (30%). Portanto, comparando-se as três epidemias realizadas nos mesmos estados, a incidência da forma clínica FD foi maior nos pacientes infectados pelo DENV-4 (70%) comparado aos demais sorotipos (DENV-2 e -3, 45,2% e DENV-1, -2 e -3, 56%). Thomas e colaboradores em seu estudo realizado com pacientes infectados pelo DENV-4, observaram que 67,3% dos pacientes apresentaram a forma clínica dengue sem complicações, 17,1% com gravidade intermediária, e 15,8% com a forma grave (Thomas *et al.*, 2014), confirmando que a infecção pelo DENV-4 é caracterizada por formas clínicas brandas da doença.

Em relação aos parâmetros laboratoriais, dos 60 pacientes avaliados o grupo FDSA/Grave apresentou trombocitopenia mais acentuada, com significância estatística, comparado ao grupo FD. Ainda, a contagem de plaquetas foi correlacionada inversamente com dias de doença, confirmando que a trombocitopenia é de fato um parâmetro laboratorial importante no acompanhamento da evolução clínica de gravidade da dengue. Contudo, estudos indicam que a contagem de plaquetas raramente é associada ao aparecimento de hemorragias na FD, mas parece contribuir ao aparecimento de manifestações hemorrágicas em casos em que há maiores complicações, com extravasamento plasmático e choque (Srikiatkachorn & Green, 2010). Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a trombocitopenia associada ao DENV, dentre eles a diminuição da produção de novas plaquetas devido à infecção de células progenitoras ou estromais, consumo aumentado de plaquetas em consequência da ativação do sistema complemento, presença de anticorpos anti-NS1, anti-prM e anti-E que formam complexos-imunes com antígenos virais presentes na superfície de plaquetas levando a um aumento a fagocitose e lise de plaquetas e ainda, comprometimento de moléculas relacionadas a coagulação (revisado por Azeredo *et al.*, 2015) por meio de complexos imunes contendo antígeno de DENV presentes na superfície de plaquetas, o que leva a um mecanismo de aumento da destruição plaquetária. Sendo assim, trombocitopenia e disfunção plaquetária são comumente observadas nos casos de dengue e são parâmetros importantes a serem observados para acompanhamento da evolução clínica do paciente.

Outro parâmetro laboratorial importante é a contagem de leucócitos. Estudos mostram que no início da doença, tanto por infecções primárias quanto secundárias, ocorre leucopenia, concomitantemente com uma linfocitopenia, mas com aumento de linfócitos T atípicos, que poderiam estar relacionados ao processo de supressão da medula óssea durante a fase aguda da dengue (Jameel *et al.*, 2012). No entanto, em nossos pacientes, não observamos diferença estatística entre a contagem absoluta de leucócitos, nem em relação ao percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> entre os grupos FD e FDSAGrave, provavelmente devido à nossa coorte ser formada por pacientes infectados por sorotipos distintos.

O envolvimento hepático na dengue também é bastante comum e geralmente se manifesta pela hepatomegalia e/ou pelo aumento das transaminases (Lee *et al.*, 2012). Além disso, hepatomegalia e dor ou sensibilidade no fígado são sintomatologias consideradas como sinais de alarme (OMS, 2009). Na dengue grave, a ocorrência de insuficiência hepática fulminante tem sido causa de morte em crianças (Roy *et al.*, 2013). As lesões hepáticas na dengue podem estar relacionadas a efeitos diretos do vírus ou indiretamente pela ativação da resposta imune antiviral do hospedeiro no tecido hepático onde a existência de antígenos virais já foi demonstrada (Póvoa *et al.*, 2014), levando ao comprometimento circulatório, acidose metabólica, hipóxia por hipotensão e/ou derrame vascular (Itha *et al.*, 2005). Em nosso estudo, pacientes FDSA/Grave apresentaram aumento de ambas as transaminases (ALT e AST) em relação aos pacientes FD. Nas análises de correlação entre os parâmetros laboratoriais, observamos que as transaminases foram inversamente correlacionadas com a contagem de plaquetas, ressaltando que a contagem de plaquetas e as dosagens de AST/TGO e ALT/TGP são parâmetros potenciais no prognóstico da dengue. Desta forma, corroboramos trabalhos anteriores que indicam que trombocitopenia acentuada e presença de níveis elevados das transaminases, constituem parâmetros potenciais ao prognóstico da dengue.

Além desses parâmetros, estudos vem demonstrando uma associação da frequência gênica de determinados alelos das moléculas de HLA classe I e II em pacientes infectados naturalmente pelo DENV com susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento das formas graves da dengue. Embora

atualmente um número importante de dados já tenha sido publicado sobre o tema, cabe ressaltar que a frequência gênica desses alelos é altamente variável entre as diferentes populações mundiais. Portanto, a associação entre susceptibilidade/resistência às formas graves com determinados alelos de HLA de uma determinada população, pode não ser confirmada em outras. Ainda, no Brasil são poucos estudos envolvendo esse tema. Até o momento, apenas 4 estudos foram realizados na população brasileira (Alencar *et al.*, 2013; Polizel *et al.*, 2004; Cardozo *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2012). Polizel e colaboradores (2004) observaram associação da frequência do HLA-DQ1 em pacientes FD oriundos do Paraná quando comparados aos controles. Monteiro e colaboradores (2012) observaram associação entre o alelo A\*01 com a FHD, enquanto que o alelo A\*31 foi associado a resistência em pacientes oriundos do Rio de Janeiro. Alencar e colaboradores (2013) em uma coorte de 187 pacientes de Pernambuco, observaram que o alelo B\*44 foi associado com o aumento da susceptibilidade à FHD em resposta a infecção pelo DENV-3, enquanto que os alelos B\*07 e DR\*13 foram associados com resistência à infecção secundária por DENV-3. Mais recentemente, Cardozo e colaboradores (2014) observaram em uma coorte de 95 pacientes infectados pelo DENV-3 no Paraná, que o alelo DQB1\*06:11 poderia ser um fator de susceptibilidade à infecção, enquanto que os alelos DRB1\*11 e DQA1\*05:01, atuariam como fatores de resistência.

Como parte de nossos objetivos, foram genotipados os *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1 de 59 pacientes com dengue do Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro. Os alelos considerados mais frequentes foram aqueles com frequência gênica acima de 5% (Nguyen *et al.*, 2008). Dentre os alelos HLA-A, os mais frequentes foram HLA-A\*02, \*30, \*24, \*03, \*23 e \*01; dentre os HLA-B, HLA-B\*51, \*35, \*44, \*15, \*07, \*58 e \*40; e dentre os HLA-C, HLA-C\*07, \*04, \*03, \*06, \*15, \*08 e \*05. Em relação aos alelos HLA classe II, dentre os HLA-DQA1, os mais frequentes foram HLA-DQA1\*01, 05, 03 e 02; dentre os HLA-DQB1, DQB1\*03, \*02, \*06, \*05 e \*04; e dentre HLA-DRB1, os HLA-DRB1\*13, \*04, \*03, \*07, \*11, \*01, \*15 e \*16. Estudo envolvendo pacientes de uma epidemia de DENV-3 em Recife, Pernambuco (Alencar *et al.*, 2013), mostrou frequências de alelos de HLA classe I e II semelhantes às observadas em nosso trabalho.

Comparamos nossas frequências às disponibilizadas no Banco de Dados de Frequências Alélicas (AFND, do inglês *Allele Frequency Net Database*) ([www.allelefrequencies.net/](http://www.allelefrequencies.net/)) (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015). De acordo com os dados disponibilizados pelo REDOME do Rio de Janeiro (n=139322), os alelos mais frequentes foram HLA-A\*02 (0,2482); B\*35 (0,1092); B\*44 (0,1152); DRB1\*01 (0,1031); DRB1\*04 (0,1169); DRB1\*07 (0,1380); DRB1\*11 (0,1171); DRB1\*13 (0,1401) e DRB1\*15 (0,1072). De modo semelhante, em relação aos dados disponibilizados pelo REDOME do Mato Grosso do Sul (n=95667), observamos que os alelos mais frequentes foram HLA-A\*02 (0,2533); A\*24 (0,1022); B\*35 (0,1185); B\*44 (0,1025); DRB1\*04 (0,1136); DRB1\*07 (0,1201); DRB1\*11 (0,1123) e DRB1\*13 (0,1286). Os dados de frequências obtidos em nossa população de estudo foram semelhantes aos observados nos dois estados, portanto, representam as observadas no território brasileiro.

De acordo com nossas análises de associação, o alelo A\*03 foi associado a maior susceptibilidade ao desenvolvimento da FDSA/Grave, enquanto que o alelo B\*15, estaria mais associado a FD. Em relação a trombocitopenia, os alelos B\*35 e C\*04 seriam mais frequentes naqueles pacientes com contagem de plaquetas inferior a 150 mil/mm<sup>3</sup>, enquanto que os alelos DQA1\*02 e DRB1\*07 estariam associados aos pacientes com contagem de plaquetas superior a 150 mil/mm<sup>3</sup>. Em Cuba, dados de Paradoa Pérez e colaboradores (1987) observaram que o alelo A\*01 estava fortemente associado ao desenvolvimento da FHD, enquanto que o A\*29 estava associado a resistência à FHD em uma coorte de 82 pacientes. Ainda em Cuba, Sierra e colaboradores (2007) avaliaram 120 pacientes e observaram que os alelos A\*31 e B\*15 foram associados com susceptibilidade à FHD e que os alelos DRB1\*04 e DRB1\*07 foram associados com resistência à FHD. LaFleur e colaboradores (2002) também observaram associação do alelo DRB1\*04 com resistência à FHD em 47 pacientes mexicanos. Contrariamente ao observado por Sierra e colaboradores (2007), o alelo B\*15 na nossa população de estudo foi associado a forma branda. Em nosso estudo o DRB1\*07 foi associado a pacientes com contagem de plaquetas superior a 150 mil/mm<sup>3</sup>, portanto, relacionado a um perfil mais branda da doença. Alguns dados são comparáveis aos nossos, mas outros, não apresentam similaridade. A frequência gênica desses alelos de HLA variam

consideravelmente em cada região geográfica e, portanto, a influência desses genes na dengue deve ser avaliada por região. Ainda, é sugerido que estudos envolvendo o papel de alelos de HLA na dengue tenham que levar em consideração o sorotipo e o tipo de infecção (Alencar *et al.*, 2013). Por fim, análises desses alelos em alta resolução poderia explicar diferenças observadas entre os estudos.

Genes do HLA classe I são extremamente polimórficos e podem codificar milhares de alelos, resultando em variantes funcional- e estruturalmente distintos. Essa característica polimórfica afeta diretamente a sequência de aminoácidos específicos que formam as bolsas (A-F) e que vão acomodar peptídeos na fenda de ligação presente na molécula de HLA classe I. Desta forma, a sequência de peptídeos antigênicos ligados as diferentes moléculas de HLA classe I identificam grupos de alelos ou supertipos que apresentam sequências comuns na apresentação de pequenos peptídeos ou supermotivos antigênicos compartilhando estruturas similares (Sidney *et al.*, 2008). Recentemente, Vejbaesya e colaboradores (2015) analisaram associações com supertipos de HLA classe I em 440 crianças tailandesas hospitalizadas. Os autores observaram que o supertipo B44 estava relacionado à resistência a FHD em infecções secundárias, enquanto que os supertipos A02 e A01/03 foram associados com a forma FD comparado aos controles. Nós também realizamos a análise de supertipos na nossa população de estudo. O alelo HLA-A\*03 foi o mais frequente entre o grupo de pacientes expressando o supertipo A03, enquanto que os alelos HLA-A\*23 e A\*24 foram mais frequentes no supertipo A24. Ainda, o supertipo A03 foi associado a pacientes com contagem de plaquetas inferior a 150 mil/mm<sup>3</sup>, enquanto que o supertipo A24 foi associado àqueles com contagem de plaquetas superior a 150 mil/mm<sup>3</sup>. Portanto, não vimos semelhança entre nossos dados e os dados da população do estudo da população tailandesa. Baseando-se em todas as análises de associação feitas em nossa população, chegamos à conclusão de que os alelos HLA-B\*15, DQA1\*02, DRB1\*07 e o supertipo A24 estariam associados a um bom prognóstico clínico, enquanto que os HLA-A\*03, B\*35, C\*04 e o supertipo A03 estariam associados a um mau prognóstico. De forma interessante, um paciente FD e contagem de plaquetas inferior a 150 mil apresentou o haplótipo

B\*15/DQA1\*02/DRB1\*07 e 5 pacientes FD, 4 deles apresentando contagem de plaquetas superior a 150 mil e apresentaram o haplótipo DQA1\*02/DRB1\*07 o que sugere que estes alelos podem, de fato, estar envolvidos com o desfecho da doença.

No caso da dengue, é detectado uma imunidade parcial de reatividade-cruzada contra sorotipos heterólogos através da resposta de linfócitos T CD8 em infecções secundárias (Green & Rothman, 2006), que podem estar relacionados com a apresentação antigênica via HLA classe I de epítomos conservados entre os 4 sorotipos. Sendo assim, foi observado que o supertipo A24 tem como alvo sequencias variáveis do proteoma do DENV que não são conservadas entre os sorotipos (Hertz *et al.*, 2011). A associação encontrada em nossa população envolvendo este supertipo estaria relacionada com uma característica de doença branca, ou seja, relacionado a um bom prognóstico, Uma vez que o alelo representante de maior frequência do supertipo A24 em nossa população de estudo foi o A\*24, contrariamente ao caráter protetor associado a plaquetas observado em nosso estudo, um estudo observou que respostas de linfócitos T HLA-A\*24 específico apresentou baixa frequência e magnitude de resposta após serem estimuladas com *pool* de peptídeos DENV-específicos (Weiskopf *et al.*, 2013). Além disso, este alelo estaria relacionado com susceptibilidade à forma grave da dengue na população da Jamaica (Brown *et al.*, 2011), do Vietnã (Loke *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2008) e do Sri Lanka (Malavige *et al.*, 2010).

Em estudos como estes que visam definir frequências alélicas de HLA em uma determinada população e ainda, associar essas frequências a resistência/susceptibilidade à forma grave da dengue ou de qualquer outra doença, geram dados diferentes e algumas vezes, discordantes como mostramos quadros 1.1 e 1.2, e como foi brevemente discutido no parágrafo anterior. Isso se deve em parte, a utilização de diferentes metodologias de tipagem alélica com variação de resolução, além de fatores externos como os ambientais, étnicos e epidemiológicos que limitam uma comparação global entre os dados (Vejbæysa *et al.* 2015). Os dados obtidos neste trabalho representam uma tentativa de melhorar o entendimento da associação de moléculas de HLA na dengue e também, de definir peptídeos imunogênicos como perspectiva de continuação

deste projeto. Esses dados precisam ser confirmados e para isso pretendemos aumentar o número de análises.

O papel dos linfócitos T no controle da dengue tem sido demonstrado por vários grupos que correlacionam a resposta efetora celular T com a expressão de certas moléculas de HLA (Malavige *et al.*, 2011; Stephens *et al.*, 2002; Loke *et al.*, 2001; Appanna *et al.*, 2010). Para as respostas restritas ao HLA do MHC de classe I, tem sido demonstrado que diferentes variantes alélicas estão associadas com diferentes magnitudes da resposta anti-DENV e que alelos de HLA associados ao aumento do risco ao desenvolvimento das formas graves são associados com uma resposta de linfócitos T CD8 menos efetora (Weiskopf *et al.*, 2013). De forma similar, certos alelos de HLA do MHC de classe II foram descritos como protetores das formas graves (Alagarasu *et al.*, 2013; Cardozo *et al.*, 2014).

A caracterização de epítomos do DENV específicos para linfócitos T CD8 tem sido realizada, quase que exclusivamente, utilizando peptídeos sintéticos com sequências obtidas a partir de algoritmos que fazem a predição mediante a capacidade de ligação do peptídeo às moléculas de MHC classe I (Weiskopf *et al.*, 2013) ou testando *pools* de peptídeos sobrepostos organizados em matrizes. Epítomos específicos para linfócitos TCD8+ originados de patógenos são geralmente organizados em hierarquias baseadas na magnitude da resposta. A imunodominância refere-se à capacidade de restrição de linfócitos T específicos a um número limitado de epítomos oriundos de um antígeno proteico complexo. A imunodominância depende de múltiplas etapas, dentre elas a captação do antígeno e seu processamento proteolítico gerando peptídeos apresentados pelas APCs, variações específicas individuais do repertório do TCR que afetam a seleção do complexo peptídeo-MHC e ainda, a forma como esse antígeno é liberado que é diferente numa infecção natural ou em caso de imunizações (Baumgartner & Malherbe, 2011). Através de ferramentas de bioinformática é possível realizar uma predição de epítomos das células T considerando a força de interação entre peptídeos, no nosso caso, predominantemente expressos em regiões conservadas do DENV, e o tipo de molécula de MHC, mas não considera etapas precedendo o processamento e transporte antigênico ou a interação entre o complexo MHC II-peptídeo e o TCR (Bryson *et al.*, 2010). Os epítomos imunodominantes não são, necessariamente, os mais protetores (Remakus *et al.*,

2012) nos ensaios *in vitro* e a relação entre especificidade e reatividade-cruzada pode ser significativa no balanço de uma resposta imunopatogênica e imunoprotetora na infecção pelo DENV (Piazza *et al.*, 2014).

Tem sido descrito que a proteína não estrutural NS3 contém o maior número de epítipo imunogênicos (31% do total) quando comparada às outras 9 proteínas do DENV (Duangchinda *et al.*, 2010; Vaughan *et al.*, 2010; Weiskopf *et al.*, 2013; Rivino *et al.*, 2013). Sendo assim, nossa predição de peptídeos restritos ao HLA classe I aos linfócitos T CD8 foi realizada utilizando sequências da proteína NS3, e a partir daí obtivemos 20 peptídeos distintos, os quais dois eram conservados presentes nos quatro sorotipos; onze semi-conservados, comuns a dois ou três sorotipos e sete peptídeos sorotipo específicos. Piazza e colaboradores (2014) observaram, de modo semelhante à nossa predição, que o epítipo NS3<sub>558-368</sub> se mantinha conservado entre os quatro sorotipos e que o epítipo NS3<sub>358-368</sub> apresentava variabilidade entre os sorotipos do DENV, mas as alterações foram limitadas ao DENV-1, em que uma serina (S) foi substituído por uma alanina (A) na região C-terminal. Interessantemente, os autores observaram que a resposta de células T CD8 foi completamente abolida aos peptídeos do DENV-1. Ainda que vários estudos recentes tenham expandido consideravelmente o conhecimento sobre epítopos específicos ao DENV para linfócitos T, ainda há uma escassez de informação relacionada a correlação da resposta induzida por estes peptídeos com imunoproteção.

Uma extensa análise de respostas de células T a partir de um grande grupo de indivíduos soropositivos para dengue, mostrou que as respostas de células T DENV-específicas de maior magnitude eram multifuncionais e dirigidas a HLAs associados com maior resistência à forma grave da dengue (Weiskopf *et al.*, 2013). Células T polifuncionais vem sendo demonstrada como altamente protetora em muitas infecções virais (Akondy *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2009). No entanto, como discutido anteriormente, numa infecção heteróloga por qualquer um dos sorotipos do DENV, as células T de memória específicas da infecção anterior podem produzir altos níveis de citocinas pro-inflamatórias, mas por serem de menor avidéz, não atuam efetivamente no *clearance* viral (Dong *et al.*, 2007). Portanto, buscamos avaliar a capacidade de resposta das células T de pacientes

infectados naturalmente pelos sorotipos DENV-1 ou -4 ao antígeno total DENV-2 quanto à produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B.

Avaliando a capacidade de liberação de IL-2 pelos linfócitos T dos pacientes, independente da forma clínica ou do sorotipo, não observamos diferença estatística entre a resposta ao estímulo DENV-2 e a condição basal. Jeewandara e colaboradores (2015) realizaram ELISA de sobrenadante de cultura de células de pacientes após estímulo com peptídeos da região NS3 e observaram níveis insignificantes de produção de IL-2. Weiskopf e colaboradores (2013) não observaram diferença na frequência de células produtoras de IL-2, ou de IL-2/IFN- $\gamma$  e IL-2/TNF- $\alpha$  após estímulos com peptídeos específicos e conservados em indivíduos soropositivos.

Quanto à liberação de IFN- $\gamma$ , independente da forma clínica ou do sorotipo, também não observamos diferenças estatísticas entre a resposta ao antígeno DENV-2 quando comparada a condição basal de estímulo. No entanto, em relação à forma clínica, observamos que os pacientes FD, mas não os FDSA, apresentaram maior resposta de IFN- $\gamma$  quando comparados com a condição basal. Estudo demonstra que a frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  após estímulo com o DENV-4 é significativamente maior no grupo subclínico (Hatch *et al.*, 2011), sugerindo que o IFN- $\gamma$  possa estar envolvido em uma resposta protetora e conseqüentemente, relacionado com características mais brandas da doença. No entanto, Jeewandara e colaboradores (2015) observaram que pacientes hospitalizados apresentaram frequência de respostas de IFN- $\gamma$  semelhante aos pacientes com infecção branda/subclínica. Em relação ao sorotipo infectante, não observamos diferença na porcentagem de respondedores ao DENV-2 Ag quando comparados com a condição de estimulação basal. Porém, Hatch e colaboradores (2011) demonstraram que a frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  respondedoras ao DENV-4 foi maior no grupo subclínico quando comparados ao grupo sintomático. Portanto, os resultados existentes são contraditórios em relação aos níveis de IFN- $\gamma$ . Alguns demonstram níveis elevados na doença grave, enquanto outros, níveis diminuídos. Provavelmente, o tempo da coleta da amostra durante a fase aguda da infecção poderia interferir na interpretação dos dados. Neste contexto, estudo em pacientes na fase aguda mostrou que os níveis de IFN- $\gamma$  eram maiores em pacientes com SCD no dia que

antecede o início da fase crítica (Butthep *et al.*, 2012). É questionado, ainda, se os altos níveis de IFN- $\gamma$  observados na fase febril da infecção são oriundos dos linfócitos T, uma vez que linfócitos T DENV-específicas não são detectadas ou são vistas em baixa frequência durante a infecção aguda (Malavige & Ogg, 2013).

Quanto à Granzima B, independente da forma clínica ou do sorotipo, não observamos diferença estatística entre a resposta ao DENV-2 Ag quando comparada a condição basal. Em geral, os spots produzidos por este marcador de citotoxicidade não apresentam bordas definidas, tendo características enevoadas, o que dificulta a leitura pelo equipamento e interpretação dos dados. No entanto, apesar do reconhecimento de poucos spots, os tamanhos variavam entre 154 e 1 (1E-3 Sq.mm), revelando uma variação no padrão de liberação deste marcador. Estudos demonstram que células T NS3 DENV-específicas de pacientes com infecção branda/subclínica prévia, produzem com maior frequência a Granzima B, enquanto que os hospitalizados apresentam células T NS3-específicas são coprodutoras de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  ou apenas de TNF- $\alpha$  (Jeewandara *et al.*, 2015).

Além disso, buscamos avaliar possíveis associações dos alelos de HLA classe I e II com os pacientes ditos “Respondedores” ou “Não-Respondedores” de acordo com os parâmetros estabelecidos anteriormente de capacidade de produção de IL-2, IFN- $\gamma$  ou Granzima B. Assim, observamos que pacientes que expressam o alelo HLA-C\*03 são aqueles que respondem mais ao antígeno total de DENV-2 com produção de Granzima B comparado aqueles que não expressam o alelo. Estudos demonstram que este alelo pode possuir um impacto importante na ligação de receptores KIR inibitórios e funções primárias de células NK (van Teijlingen *et al.*, 2014), o que pode estar relacionado com maior resposta ao antígeno de DENV-2, uma vez que células NK também apresentam características citotóxicas com liberação de Granzima B. Portanto, linfócitos T expressando granzima B são mais propensos a ter efeitos citotóxicos do que células T que são duplo positivas para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Romero *et al.*, 2007), apresentando, desta forma, um papel efetor maior no *clearance* da infecção pelo DENV e fazendo deste um marcador relevante para a análise da capacidade imunológica em diferentes manifestações clínicas.

Considerando que uma resposta multifuncional pode estar envolvida com um melhor desfecho clínico (Weiskopf *et al.*, 2013), 5 dos 17 pacientes FD (29,4%) analisados em nosso estudo três respondem para IFN- $\gamma$  e IL-2, dois para IFN- $\gamma$  e Granzima B. No caso dos pacientes FDSA 2 dos 15 (13%) pacientes tiveram resposta para 2 parâmetros simultaneamente, IFN- $\gamma$  e Granzima B. Essa avaliação, apesar de não ser estatística, pode sugerir que uma resposta multifuncional auxilia no quadro de doença branda, no entanto, mais experimentos devem ser realizados para corroborar essa hipótese. Além disso, é possível que haja um envolvimento do IFN- $\gamma$  com um melhor desfecho clínico uma vez que pacientes FD apresentaram níveis aumentados desta citocina quando comparados a condição de estímulo basal, o que não foi observado para pacientes FDSA/Grave. Essa hipótese será avaliada utilizando um maior número de pacientes FDSA e Graves.

Por fim, outra limitação do estudo foi a utilização do antígeno total, uma vez que esse antígeno necessita de um processamento e apresentação antigênica o que pode ter limitado nossa detecção de resposta, ao passo que uma estimulação utilizando peptídeos apresentaria um processo mais rápido e específico de resposta. Portanto, mediante aos dados obtidos após estímulo com antígeno total de DENV-2 em pacientes previamente infectados com DENV-1 ou DENV-4, não observamos significância estatística quanto a liberação de IL-2, IFN- $\gamma$  e Granzima B. Não descartamos a ideia de reatividade cruzada, uma vez que nossos grupos DENV-1 e DENV-4 foi constituído por um número de pacientes em cada grupo muito diferente, portanto, achamos que não comparáveis do ponto de vista estatístico. Portanto, uma análise maior de pacientes infectados pelo sorotipo DENV-1 e também DENV-2 e DENV-3 será realizado na continuação deste trabalho.

De forma interessante, observamos um aumento da frequência de linfócitos T CD4 de perfil memória efetora/efetor na condição de estimulação com antígeno total DENV-2/anti-CD28 em relação ao meio/anti-CD28, mas o mesmo não foi visto para os linfócitos T CD8. Precisaríamos aumentar nosso n amostral para avaliar o impacto dos dias de infecção na geração dessas subpopulações considerando que a cinética e o limiar de ativação das subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 variam.

Continuando nossas análises de associação com os alelos gênicos de HLA, observamos que a ausência do alelo HLA-B\*58 está relacionado a maior frequência de subpopulações de linfócitos T CD4 de perfil memória efetora/efetor após estimulação com Ag Total de DENV-2. Portanto, nossos dados contribuem com achados da literatura em que a predominância de determinados alelos estejam envolvidos com uma resposta de maior magnitude, e, portanto, uma resposta do tipo mais imunoprotetora.

Neste estudo, utilizamos pacientes infectados por diferentes sorotipos do DENV, classificados em FD ou FDSA e ainda, naqueles com contagem superior ou inferior a 150 mil plaquetas/mm<sup>3</sup>. Sugerimos inicialmente que os alelos mais frequentes HLA-B\*15, DQA1\*02, DRB1\*07 e o supertipo A24 estariam associados a um bom prognóstico clínico, enquanto que os HLA-A\*03, B\*35, C\*04 e o supertipo A03 estariam associados a um mau prognóstico. Os alelos mais frequentes em nossos pacientes estão de acordo com os dados do REDOME. A resposta das células T dos pacientes quanto à produção de IFN- $\gamma$ , mas não de IL-2 e granzima B, frente ao antígeno DENV-2 foi maior apenas nos pacientes FD. Não detectamos alguma associação da produção de IFN- $\gamma$  e alelos de HLA, mas os linfócitos T de pacientes HLA-C\*03 parecem secretar mais granzima B frente ao antígeno DENV-2 do que pacientes expressando outros alelos. Por fim, pacientes portadores do alelo HLA-B\*58 parecem ter sido aqueles com maior frequência de linfócitos T CD4 efetores/memória efetores frente ao antígeno DENV-2. Portanto, alelos de HLA classe I e II devem ser considerados como um fator importante tanto na resistência/susceptibilidade a forma grave da dengue, como na geração de uma resposta imune efetora protetora.

## 7 – CONCLUSÃO

- I. Trombocitopenia acentuada e aumento das transaminases hepáticas são indicadores importantes de prognóstico clínico na dengue;
- II. Os alelos de HLA classe I e classe II mais frequentes em nossa população de estudo estão de acordo com os dados do REDOME;
- III. Os alelos HLA-B\*15, DQA1\*02, DRB1\*07 e o supertipo A24 estariam associados a um bom prognóstico clínico, enquanto que os HLA-A\*03, B\*35, C\*04 e o supertipo A03 estariam associados a um mau prognóstico em nossa população de estudo;
- IV. A produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T frente a antígeno de DENV-2 estaria envolvida com um bom prognóstico da dengue;
- V. Pacientes portadores do alelo HLA-C\*03 seriam aqueles indutores de uma resposta mais citotóxica frente aos antígenos DENV-2;
- VI. Pacientes portadores do alelo HLA-B\*58 seriam aqueles indutores de uma menor resposta celular T CD4 efetora/memória efetora frente ao antígeno DENV-2;
- VII. Alelos de HLA classe I e II devem ser considerados como um fator potencial no prognóstico clínico de pacientes e também como fator preditivo do tipo de resposta imune efetora.

## 8 – PERSPECTIVAS

1. Aumentar o número amostral de pacientes em epidemias futuras considerando a variedade de sorotipos virais e formas clínicas;
2. Avaliar a resposta de linfócitos T de pacientes infectados pelo DENV quanto à produção de citocinas e granzima B e também, quanto a expressão de marcadores de ativação celular, frente aos peptídeos selecionados pela ferramenta de predição do IEDB;
3. Realizar um estudo longitudinal comparativo da resposta de linfócitos T de pacientes infectados pelo DENV na fase aguda e na fase de convalescência quanto à produção de citocinas e granzima B e também, quanto a expressão de marcadores de ativação celular, frente aos peptídeos selecionados pela ferramenta de predição do IEDB;
4. Avaliar a frequência alélica dos genes de HLA classe I e II com métodos de alta resolução.

## 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., Lichtman, A. H. e Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier. Rio de Janeiro. 7th edition. 2013.
- ABE, A. H. M., Marques, S. M., e Costa, P. S. S. **Dengue em crianças: da notificação ao óbito**. *Rev Paul Pediatr*. 30: 263-271. 2012.
- ADAMS, E. J. e LUOMA, A. M. **The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules**. *Annu Rev Immunol*. 31:529-61. 2013. Review.
- AKONDY, R. S., Monson, N. D., Miller, J. D. *et al*. **The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response**. *J Immunol*. 183(12):7919–30. 2009.
- ALAGARASU, K., Mulay, A. P., Sarikhani, M. *et al*. **Profile of human leukocyte antigen class I alleles in patients with dengue infection from Western India**. *Hum Immunol*. 74(12):1624-8. 2013.
- ALEJO, A., Ruiz-Argüello, M. B., Ho, Y. *et al*. **A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(15):5995-6000. 2006.
- ALENCAR, L. X. E, de-Mendonça, U. B., Nascimento, E. J. M. *et al*. **HLA-B\*44 Is Associated with Dengue Severity Caused by DENV-3 in a Brazilian Population**. *J Trop Med*. 2013:648475. 2013.
- APOSTOLOPOULOS, V., Lazoura, E. e Yu, M. **MHC and MHC-like molecules: structural perspectives on the design of molecular vaccines**. *Adv Exp Med Biol*. 640:252-67. 2008. Review.
- APPANNA, R., Ponnampalavanar, S., Lum Chai See, L. e Sekaran, S. D. **Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population**. *PLoS One*. 5(9):13029. 2010.
- AVIRUTNAN, P., Punyadee, N., Noisakran, S. *et al*. **Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement**. *J Infect Dis*. 193(8):1078-88. 2006.
- BALMASEDA, A., Hammond SN, Pérez MA, *et al*. **Assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua**. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 73:1059-1062. 2005.
- BARRETO, M. L. e TEIXEIRA, M. G. **Dengue fever: a call for local, national, and international action**. *Lancet*. 372(9634):205. 2008.
- BAUMGARTNER, C. K. e Malherbe, L. P. **Antigen-driven T-cell repertoire selection during adaptive immune responses**. *Immunol Cell Biol*. 89(1):54-9. 2011.

- BELTRAMELLO, M., Williams, K. L., Simmons, C. P. *et al.* **The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity.** *Cell Host Microbe.* 8(3):271-83. 2010.
- BERTONI, R., Sidney, J., Fowler, P. *et al.* **Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis.** *J Clin Invest.* 100(3):503-13. 1997.
- BHATT, S., Gething, P. W., Brady, O. J. *et al.* **The global distribution and burden of dengue.** *Nature.* 496(7446):504-7. 2013.
- BIHL, F., Narayan, M., Chisholm, J.V. 3rd. *et al.* **Lytic and latent antigens of the human gammaherpesviruses Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Epstein-Barr virus induce T-cell responses with similar functional properties and memory phenotypes.** *J Virol.* 81(9):4904-8. 2007.
- BOZZA, F. A., Cruz, O. G., Zagne, S. M. *et al.* **Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity.** *BMC Infect Dis.* 8:86. 2008.
- BRANDER, C., O'Connor, P., Suscovich, T. *et al.* **Definition of an optimal cytotoxic T lymphocyte epitope in the latently expressed Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus kaposin protein.** *J Infect Dis.* 184(2):119-26. 2001.
- BROWN, M. G., Salas, R. A., Vickers, I. E. *et al.* **Dengue HLA associations in Jamaicans.** *West Indian Med J.* 60(2):126-31. 2011.
- BRYSON, C. J., Jones, T. D. e Baker, M. P. **Prediction of immunogenicity of therapeutic proteins: validity of computational tools.** *BioDrugs.* 24(1):1-8. 2010.
- BURROWS, S. R., Elkington, R. A., Miles, J. J. *et al.* **Promiscuous CTL recognition of viral epitopes on multiple human leukocyte antigens: biological validation of the proposed HLA A24 supertype.** *J Immunol.* 171(3):1407-12. 2003.
- BUTTHEP, P., Chunchakan, S., Yoksan, S. *et al.* **Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever.** *Pediatr Infect Dis J.* 31(12):e232-8. 2012.
- CARDIER, J. E., Mariño, E., Romano, E. *et al.* **Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue.** *Cytokine.* 30(6):359-65. 2005.
- CARDOZO, D. M., Moliterno, R. A., Sell, A. M. *et al.* **Evidence of HLA-DQB1 Contribution to Susceptibility of Dengue Serotype 3 in Dengue Patients in Southern Brazil.** *J Trop Med.* 2014:968262. 2014.
- CHEN, J. P., Lu, H. L., Lai, S. L. *et al.* **Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively**

- inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate.** *J Immunol.* 177(5):3185-92. 2006.
- CHEN, R. e VASILAKIS, N. **Dengue-quo tu et quo vadis?** *Viruses.* 3:1562-1608. 2011.
- CHEN, R. F., Liu, J. W., Yeh, W-T. *et al.* **Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 44:43–50. 2005.
- CHIEWSILP, P., Scott, R. M. e Bhamarapavati, N. **Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever.** *Am J Trop Med Hyg.* 30(5):1100-5. 1981.
- CHUANG, Y. C., Lei, H. Y., Lin, Y. S. *et al.* **Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation.** *J Immunol.* 187(12):6483-90. 2011.
- DE ALWIS, R., Smith, S. A., Olivarez, N. P. *et al.* **Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(19):7439-44. 2012.
- DE AZEREDO, E. L., Monteiro, R. Q., de-Oliveira-Pinto, L. M. **Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators.** *Mediators Inflamm.* 2015:313842. 2015. Review.
- DE LA GUARDIA, C., & LLEONART, R. **Progress in the Identification of dengue virus entry/fusion inhibitors.** *BioMed research international.* 2014.
- DEJNIRATTISAI, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N. *et al.* **Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans.** *Science.* 328(5979):745-8. 2010.
- DE-OLIVEIRA-PINTO, L. M., Gandini, M., Freitas, L. P. *et al.* **Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1 $\beta$  and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107(1):48-56. 2012.
- DONG, T., Moran, E., Vinh Chau, N. *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.* 2(12):e1192. 2007.
- DUANGCHINDA, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S. *et al.* **Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:16922–7. 2010.
- DUNG, N. T., Duyen, H. T., Thuy, N. T. *et al.* **Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue.** *J Immunol.* 184(12):7281-7. 2010.
- FAILACE, R. **Hemograma - Manual De Interpretação.** 5<sup>a</sup> ed. *Artmed.* 2003.
- FALCONAR, A. K. **Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design.** *Clin Vaccine Immunol.* 14(5):493-504. 2007.

- FALCÓN-LEZAMA, J. A., Ramos, C., Zuñiga, J. et al. **HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever.** *Acta Trop.* 112(2):193-7. 2009
- FALGOUT, B., Chanock, R., & Lai, C. J. **Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a.** *Journal of virology.* 63(5):1852-1860. 1989.
- FARBER, D. L., Yudanin, N. A. e Restifo, N. P. **Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis.** *Nat Rev Immunol.* 14(1):24-35. 2014. Review.
- FARIA, N. R., Nogueira, R. M., de Filippis, A. M. et al. **Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010.** *PLoS Negl Trop Dis.* 7(3):e2095. 2013.
- FLAMAND, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. **Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion.** *Journal of virology.* 73(7):6104-6110. 1999.
- FRIED, J. R., Gibbons, R. V., Kalayanarooj, S. 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.* 4(3):e617. 2010.
- GAGNON, S. J., Ennis, F. A. e Rothman, A. L. **Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones.** *J Virol.* 73(5):3623-9. 1999.
- GAN, V. C., Lye, D. C., Thein, T. L., Dimatatac. F., Tan, A. S. e Leo, Y. **Implications of Discordance in World Health Organization 1997 and 2009 Dengue Classifications in Adult Dengue.** *PLOS ONE.* 60946(8). 2013.
- GONZÁLEZ-GALARZA, F. F., Takeshita, L. Y., Santos, E. J. et al. **Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations.** *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D784-8. 2015.
- GREEN, S. e ROTHMAN, A. **Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever.** *Curr Opin Infect Dis.* 19(5):429-36. 2006. Review.
- GREEN, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S. et al. **Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity.** *J Med Virol.* 59(3):329-34. 1999.
- GUBLER, D. J. **Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status.** *In Novartis foundation symposium.* 277:3. 2006.
- GUBLER, D. J. **Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.** *Trends Microbiol.* 10(2):100-3. 2002.

- GUILARDE, A. O., Turchi, M. D., Siqueira, J. B. Jr. *et al.* **Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response.** *J Infect Dis.* 197(6):817-24. 2008.
- GUZMAN, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H. *et al.* **Dengue: a continuing global threat.** *Nat Rev Microbiol.* 8(12):S7-16. 2010. Review.
- GUZMAN, M. G. e KOURI, G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges.** *J Clin Virol.* 27(1):1-13. Review. 2003.
- GUZMAN, M. G., Kouri, G. P., Bravo, J. *et al.* **Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study.** *Am J Trop Med Hyg.* 42(2):179-84. 1990.
- HALSTEAD, S. B. e O'ROURKE, E. J. **Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody.** *J Exp Med.* 146(1):201-17. 1997.
- HALSTEAD, S. B., Mahalingam, S., Marovich, M. A. *et al.* **Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes.** *Lancet Infect Dis.* 10(10):712-22. 2010. Review.
- HALSTEAD, S. B., Streit, T. G., Lafontant, J. G. *et al.* **Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission.** *Am J Trop Med Hyg.* 65(3):180-3. 2001.
- HAMMON, W. M., Rudnick, A. e Sather, G. E. **Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand.** *Science.* 131(3407):1102-3. 1960.
- HATCH, S., Endy, T. P., Thomas, S. *et al.* **Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection.** *J Infect Dis.* 203(9):1282-91. 2011.
- HENCHAL, E. A. e PUTNAK, J. R. **The dengue viruses.** *Clinical microbiology reviews.* 3:376-396. 1990.
- HERTZ, T., Nolan, D., James, I. *et al.* **Mapping the landscape of host-pathogen coevolution: HLA class I binding and its relationship with evolutionary conservation in human and viral proteins.** *J Virol.* 85(3):1310-21. 2011.
- IGARASHI, A. **Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses.** *J Gen Virol.* 40(3):531-44. 1978.
- ITHA, S., Kashyap, R., Krishnani, N. *et al.* **Profile of liver involvement in dengue virus infection.** *Natl Med J India.* 18(3):127-30. 2005.
- JAMEEL, T., Mehmood, K., Mujtaba, G. *et al.* **Changing haematological parameters in dengue viral infections.** *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 24(1):3-6. 2012.
- JAYARATNE, S. D., Atukorale, V., Gomes, L. *et al.* **Evaluation of the WHO revised criteria for classification of clinical disease severity in acute adult dengue infection.** *BMC Res Notes.* 5:645. 2012.

- JEEWANDARA, C., Adikari, T. N., Gomes, L. *et al.* **Functionality of dengue virus specific memory T cell responses in individuals who were hospitalized or who had mild or subclinical dengue infection.** *PLoS Negl Trop Dis.* 9(4):e0003673. 2015.
- KAGI, D., Ledermann, B., Bürki, K. *et al.* **CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity.** *Eur J Immunol.* 24(12):3068-72. 1994.
- KALAYANAROOJ, S., Gibbons, R. V., Vaughn, D., *et al.* **Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections.** *J Infect Dis.* 195:1014–1017. 2007.
- KALAYANAROOJ, S., Vaughn, D. W, Nimmannitya, S. *et al.* **Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness.** *Journal of Infectious Diseases.* 176:313-321. 1997.
- KAWASHIMA, I., Tsai, V., Southwood, S. *et al.* **Identification of gp100-derived, melanoma-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes restricted by HLA-A3 supertype molecules by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells.** *Int J Cancer.* 78(4):518-24. 1998.
- KIM, Y., Ponomarenko, J., Zhu, Z. *et al.* **Immune epitope database analysis resource.** *Nucleic Acids Res.* (Web Server issue):W525-30. 2012.
- KUHN, R. J., Zang, W., Rossman, M. G. *et al.* **Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, mutation and fusion.** *Cell.* 108(5):717-725. 2002.
- KUMAR, Y., Liang, C., Bo, Z. *et al.* **Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF.** *PLoS Negl Trop Dis.* 6(11):e1887. 2012.
- KURANE, I., Meager, A. e Ennis, F. A. **Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity.** *J Exp Med.* 170(3):763-75. 1989.
- LAFLEUR, C., Granados, J., Vargas-Alarcon G. *et al.* **HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever.** *Hum Immunol.* 63(11):1039-44. 2002.
- LAN, N. T. P. e HIRAYAMA, K. **Host genetic susceptibility to severe dengue infection.** *Trop Med Health.* 39: 73–81. 2011.
- LEE, E., Weir, R. C. e Dalgarno, L. **Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein.** *Virology.* 232(2):281-90. 1997.
- LEE, L. K., Gan, V. C., Lee, V. J. *et al.* **Clinical relevance and discriminatory value of elevated liver aminotransferase levels for dengue severity.** *PLoS Negl Trop Dis.* 6(6):e1676. 2012.
- LIBRATY, D. H., Young, P. R., Pickering, D. *et al.* **High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate**

**with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever.** *The Journal of Infectious Diseases.* 186:1165–8. 2002.

LIN, C. F., Lei, H. Y., Shiau, A. L. *et al.* **Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage.** *J Med Virol.* 69(1):82-90. 2003.

LIN, C. F., Wan, S. W., Chen, M. C. *et al.* **Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model.** *Lab Invest.* 88(10):1079-89. 2008.

LIN, Y. S., Yeh, T. M., Lin, C. F. *et al.* **Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis.** *Exp Biol Med (Maywood).* 236(5):515-23. 2011.

LINDENBACH, B. D. e RICE, C. M. **Molecular biology of flaviviruses.** *Advances in virus research.* 59: 23-61. 2003.

LIVINGSTON, B. D., Crimi, C., Fikes, J. *et al.* **Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules.** *Hum Immunol.* 60(11):1013-7. 1999.

LIVINGSTON, P. G., Kurane, I., Dai, L. C. *et al.* **Dengue virus-specific, HLA-B35-restricted, human CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. Recognition of NS3 amino acids 500 to 508 by CTL clones of two different serotype specificities.** *J Immunol.* 154(3):1287-95. 1995.

LOKE, H., Bethell, D. B., Phuong, C. X. *et al.* **Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword?** *J Infect Dis.* 184(11):1369-73. 2001.

MALAVIGE, G. N. e OGG, G. S. **T cell responses in dengue viral infections.** *J Clin Virol.* 58(4):605-11. 2013. Review.

MALAVIGE, G. N., Jeewandara, C., Alles, K. M. *et al.* **Suppression of virus specific immune responses by IL-10 in acute dengue infection.** *PLoS Negl Trop Dis.* 7(9):e2409. 2013.

MALAVIGE, G. N., Rostron, T., Rohanachandra, L. T. *et al.* **HLA class I and class II associations in dengue viral infections in a Sri Lankan population.** *PLoS One.* 6:e20581. 2011.

MANGADA, M. M. e ROTHMAN, A. L. **Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes.** *J Immunol.* 175(4):2676-83. 2005.

MARSHALL, N. B. e Swain, S. L. **Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity.** *J Biomed Biotechnol.* 2011:954602. 2011. Review.

MARTINEZ-TORRES, E., Polanco-Anaya, A. C. e Pleites-Sandoval, E. B. **Why and how children with dengue die?** *Revista cubana de medicina tropical.* 60(1):40-47. 2008.

MATTHEW, A., Kurane, I., Rothman, A. L., Zeng, L. L., Brinton, M. A. e Ennis, F. A. **Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue**

- virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a.** *J Clin Invest.* 98(7):1684-91. 1996.
- MERCADO, E. S., Espino, F. E., Perez, M. L. *et al.* **HLA-A\*33:01 as protective allele for severe dengue in a population of Filipino children.** *PLoS One.* 10(2):e0115619. 2015.
- MIAGOSTOVICH, M. P., Nogueira, R. M., Cavalcanti, S. M. *et al.* **Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 35(2):149-54. 1993.
- MITTRUCKER, H. W., Visekruna, A. e Huber, M. **Heterogeneity in the differentiation and function of CD8<sup>+</sup> T cells.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 62(6):449-58. 2014.
- MODIS, Y., Ogata, S., Clements, D. e Harrison, S. C. **A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100:6986-6991. 2003.
- MONGKOLSAPAYA, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N *et al.* **Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever.** *Nat Med.* 9(7):921-7. 2003.
- MONTEIRO, S. P., Brasil, P. E., Cabello, G. M. *et al.* **HLA-A\*01 allele: a risk factor for dengue haemorrhagic fever in Brazil's population.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107(2):224-30. 2012.
- MUKHOPDHYAY, S., Kuhn, R. J. e Rossmann, M. G. **A structural perspective of the flavivirus life cycle.** *Nat. Rev. Microbiol.* 3(1):13-22. 2005.
- NEEFJES, J., Jongsma, M. L., Paul, P. e Bakke, O. **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.** *Nat Rev Immunol.* 11(12):823-36. 2011. Review.
- NGUYEN, T. P., Kikuchi, M., Vu, T. Q. *et al.* **Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2(10):304. 2008.
- NIMMANNITYA, S., Halstead, S. B., Cohen, S. N. e Margiotta, M. R. **Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-64.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 18(6):954-971. 1969.
- NOGUEIRA, R. M., Schatzmayr, H. G., de Filippis, A. M. *et al.* **Dengue virus type 3, Brazil, 2002.** *Emerging infectious diseases.* 11: 1376-1381. 2005.
- ONG, S. P., Lee, L. M., Leong, Y. F. *et al.* **Dengue virus infection mediates HMGB1 release from monocytes involving PCAF acetylase complex and induces vascular leakage in endothelial cells.** *PLoS One.* 7(7):e41932. 2012.
- OPAS. **Organização Pan-Americana de Saúde.** [www.paho.org/bra/](http://www.paho.org/bra/), acessado dia 27 de outubro de 2015, às 15:03.

OSANAI, C., Travassos da Rosa, A. P., Tang, A. T., Amaral, R. S., Passos, A. D. e Tauil, P. L. **Surto de dengue em Boa Vista, Roraima.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 25: 53-54. 1983.

OVSYANNIKOVA, I. G., Jacobson, R. M, Vierkant, R. A. *et al.* **HLA supertypes and immune responses to measles-mumps-rubella viral vaccine: findings and implications for vaccine design.** *Vaccine.* 25(16):3090-100. 2007.

PARADOA-PÉREZ, M. L., Trujillo, Y. e Basanta, P. **Association of dengue hemorrhagic fever with the HLA system.** *Haematologia (Budap).* 20(2):83-7. 1987.

PAUL, S., Dillon, M. B., Lindestam Arlehamn, C. S. *et al.* **A population response analysis approach to assign class II HLA-epitope restrictions.** *J Immunol.* 194(12):6164-76. 2015.

PÉDRON, B., Guérin, V., Cordeiro, D. J. *et al.* **Development of cytomegalovirus and adenovirus-specific memory CD4 T-cell functions from birth to adulthood.** *Pediatr Res.* 69(2):106-11. 2011.

PIAZZA, P., Campbell, D., Marques, E. *et al.* **Dengue virus-infected human dendritic cells reveal hierarchies of naturally expressed novel NS3 CD8 T cell epitopes.** *Clin Exp Immunol.* 177(3):696-702. 2014.

PIERSON, T. C. e DIAMOND, M. S. **Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses.** *Curr Opin Virol.* 2(2):168-75. 2012.

PÓVOA, T. F., Alves, A. M., Oliveira, C. A. *et al.* **The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication.** *PLoS One.* 9(4):e83386. 2014.

PREUGSCHAT, F. e STRAUSS, J. H. **Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo.** *Virology.* 185(2):689-97. 1991.

QI, R. F., Zhang, L., & Chi, C. W. **Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design.** *Acta biochimica et biophysica Sinica.* 40(2):91-101. 2008.

REED, L. J. e MUENCH, H. **A simple method of estimating fifty per cent endpoints.** *The Journal of Hygiene.* 27(3):493. 1938.

REMAKUS, S. e SIGAL, L. J. **Memory CD8<sup>+</sup> T cell protection.** *Adv Exp Med Biol.* 785:77-86. 2013.

REMAKUS, S., Rubio, D., Ma, X. *et al.* **Memory CD8<sup>+</sup> T cells specific for a single immunodominant or subdominant determinant induced by peptide–dendritic cell immunization protect from an acute lethal viral disease.** *J Virol.* 86:9748–59. 2012.

REMY, M. M. **Dengue fever: theories of immunopathogenesis and challenges for vaccination.** *Inflamm Allergy Drug Targets.* 13(4):262-74. 2014.

RIGAU-PEREZ, J. G., Clark, G. G., Gubler, D. J. *et al.* **Dengue and dengue haemorrhagic fever.** *Lancet.* 352:971-977. 1998.

- ROCCO, I. M., Silveira, V. R., Maeda, A. Y. *et al.* **First isolation of Dengue 4 in the state of Sao Paulo, Brazil, 2011.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 54: 49-51. 2012.
- ROMERO, P., Zippelius, A., Kurth, I. *et al.* **Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.** *J Immunol.* 178(7):4112-9. 2007.
- ROSEN, L. **The emperor's new clothes revisited, or reflections on the dengue haemorrhagic fever.** *Am J Trop Med Hyg.* 26:237-343. 1977.
- ROTHMAN, A. L. **Dengue: defining protective versus pathologic immunity.** *Journal of Clinical Investigation.* 113(7):946-951. 2004.
- ROTHMAN, A. L. **Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms.** *Nat Rev Immunol.* 11(8):532-43. 2011. Review.
- ROY, A., Sarkar, D., Chakraborty, S. *et al.* **Profile of hepatic involvement by dengue virus in dengue infected children.** *N Am J Med Sci.* 5(8):480-5. 2013.
- SAITO, M., Oishi, K., Inoue, S. *et al.* **Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections.** *Clin Exp Immunol.* 138(2):299-303. 2004.
- SALLUSTO, F., Geginat, J. e Lanzavecchia, A. **Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.** *Annu. Rev. Immunol.* 22:745–763. 2004.
- SALLUSTO, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. e Lanzavecchia, A. **Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.** *Nature.* 401:708–712. 1999.
- SAMPATH, A., Xu, T., Chao, A. *et al.* G. **Structure-based mutational analysis of the NS3 helicase from dengue virus.** *Journal of virology.* 80(13):6686-6690. 2006.
- SANGKAWIBHA, N., Rojanasuphot, S., Ahandrik, S. *et al.* **Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak.** *Am J Epidemiol.* 120(5):653-69. 1984.
- SANT, A. J. e MCMICHAEL, A. **Revealing the role of CD4(+) T cells in viral immunity.** *J Exp Med.* 209(8):1391-5. 2012.
- SCHATZMAYR, H. G., Nogueira, R. M. e Travassos da Rosa, A. P. **An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 81(2):245-6. 1986.
- SCHOEPP, R. J. e BEATY, B. J. **Titration of dengue viruses by immunofluorescence in microtiter plates.** *J Clin Microbiol.* 20(5):1017-9. 1984.
- SIDNEY, J., Peters, B., Frahm, N. *et al.* **HLA class I supertypes: a revised and updated classification.** *BMC Immunol.* 9:1. 2008.
- SIERRA, B., Alegre, R., Pérez, A. B., García, G. *et al.* **HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2**

**disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection.** *Hum Immunol.* 68(6):531-40. 2007.

SRIKIATKHACHORN, A. e GREEN, S. **Markers of dengue disease severity.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 338:67-82. 2010. Review.

SRIKIATKHACHORN, A., Krautrachue, A., Ratanaprakarn, W., *et al.* **Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonic study.** *Pediatric Infectious Disease Journal.* 26(4):283-290. 2007.

SRIKIATKHACHORN, A., Rothman, A. L., Gibbons, R. V. *et al.* **Dengue--how best to classify it.** *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 53:563-567. 2011.

STAHL, H. C., Butenschoen, V. M., Tran, H. T. *et al.* **Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies.** *BMC Public Health.* 13:1048. 2013. Review.

STEPHENS, H. A., Klaythong, R., Sirikong, M. *et al.* **HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais.** *Tissue Antigens.* 60:309-1810. 2002.

STIASNY, K e HEINZ, F. X. **Flavivirus membrane fusion.** *J Gen Virol.* 87(10):2755-66. 2006. Review.

TEIXEIRA, M. G. e Barreto, M. L. **Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa.** *Estudos Avançados - São Paulo.* 22. 2008.

TEIXEIRA, M. G., Barreto, M. L. e Guerra, Z. **Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue.** *Informe Epidemiológico do SUS.* 8: 5-33. 1999.

THOMAS, L., Najioullah, F., Besnier, F. *et al.* **Clinical presentation of dengue by serotype and year of epidemic in Martinique.** *Am J Trop Med Hyg.* 91(4):862. 2014.

TISONCIK, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P. *et al.* **Into the eye of the cytokine storm.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(1):16-32. 2012. Review.

TORRENTES-CARVALHO, A., Marinho, C. F., de Oliveira-Pinto, L. M. *et al.* **Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue.** *Immunobiology.* 219(5):329-40. 2014.

TRACHTERBERG, E., Korber, B., Sollars, C. *et al.* **Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression.** *Nat Med.* 9(7):928-35. 2003.

UMAREDDY, I., Chao, A., Sampath, A., Gu, F., & Vasudevan, S. G. **Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA.** *Journal of general virology.* 87(9):2605-2614. 2006.

VAN TEIJLIGEN, N. H., Hölzemer, A., Körner, C. *et al.* **Sequence variations in HIV-1 p24 Gag-derived epitopes can alter binding of KIR2DL2 to HLA-C\*03:04 and modulate primary natural killer cell function.** *AIDS.* 228(10):1399-408. 2014.

- VAUGHAN, K., Greenbaum, J. e Blythe, M. **Metaanalysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology.** *Viral Immunol.* 23:259-84. 2010.
- VEJBAESYA, S., Thongpradit, R., Kalayanarooj, S. *et al.* **HLA Class I Supertype Associations With Clinical Outcome of Secondary Dengue Virus Infections in Ethnic Thais.** *J Infect Dis.* 12(6):939-47. 2015.
- VOSKOBOINIK, I., Whisstock, J. C. e Trapani, J. A. **Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology.** *Nat Rev Immunol.* 15(6):388-400. 2015. Review.
- WAHALA, W. M., Huang, C., Butrapet, S. *et al.* **Recombinant dengue type 2 viruses with altered e protein domain III epitopes are efficiently neutralized by human immune sera.** *J Virol.* 86(7):4019-23. 2012.
- WANG, A., Chandran, S., Shah, S. A. *et al.* **The stoichiometric production of IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA defines memory T cells that can self-renew after adoptive transfer in humans.** *Sci Transl Med.* 4(149):149ra120. 2012.
- WANG, L., Chen, R. F., Liu, J. W. *et al.* **DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation.** *PLoS Negl Trop Dis.* 5:e934. 2011
- WATTS, D. M., Porter, K. R., Putvatana, P. *et al.* **Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever.** *Lancet.* 354(9188):1431-4. 1999.
- WEISKOPF, D. e SETTE, A. **T-cell immunity to infection with dengue virus in humans.** *Front Immunol.* 5:93. 2014.
- WEISKOPF, D., Angelo, M. A., de Azeredo, E. L. *et al.* **Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells.** *Proc Natl Acad Sci.* 110(22):2046-53. 2013.
- WHO. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, treatment, prevention and control.** New edition: 160. 2009.
- YACOUB, S., Mongkolsapaya, J. e Sreaton, G. **The pathogenesis of dengue.** *Wolters Kluwer Health.* 26(3): 284-289. 2013.
- YAMAMOTO, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H. *et al.* **Polyfunctional CD4 + T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection.** *Journal of virology.* 83(11):5514–24. 2009.
- YUNG, C. F., Lee, K. S., Thein, T. L. *et al.* **Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, singapore.** *Am J Trop Med Hyg.* 92(5):999-1005. 2005.
- ZELLWEGER, R. M., Miller, R., Eddy, W. E. *et al.* **Role of humoral versus cellular responses induced by a protective dengue vaccine candidate.** *PLoS Pathog.* 9:e1003723. 2013.

ZOMPI, S., Santich, B. H., Beatty, P. R. e Harris E. **Protection from secondary dengue virus infection in a mouse model reveals the role of serotype cross-reactive B and T cells.** *J Immunol.* 188:404–1610. 2012.

## Anexo A

Tabela de Genótipos HLA classe I e II dos pacientes infectados pelo DENV incluídos no estudo.

Paciente	Classificação	HLA classe I			HLA classe II		
		A	B	C	DQA1	DQB1	DRB1
JGS	FD	A*02	B*44	C*04	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*07
		A*23	B*57	C*18	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*07
GBS	FDSA	A*02	B*35	C*04	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*01
		A*31	B*51	C*05	DQA1*05	DQB1*05	DRB1*11
SSS	FD	A*24	B*07	C*06	DQA1*01	DQB1*04	DRB1*04
		A*26	B*50	C*07	DQA1*03	DQB1*06	DRB1*13
CA	FDSA	A*02	B*52	C*06	DQA1*01	DQB1*05	DRB1*12
		A*68	B*58	C*16	DQA1*01	DQB1*06	DRB1*13
ES	FDSA	A*02	B*40	C*03	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*14
		A*68	B*48	C*08	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*14
ABS	FDSA	A*03	B*51	C*07	DQA1*01	DQB1*05	DRB1*13
		A*23	B*58	C*12	DQA1*01	DQB1*06	DRB1*16
ZS	FD	A*11	B*15	C*03	DQA1*05	DQB1*02	DRB1*03
		A*30	B*40	C*15	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*11
RC	FDSA	A*01	B*08	C*07	DQA1*05	DQB1*02	DRB1*03
		A*02	B*39	C*07	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*16
CS	FDSA	A*02	B*40	C*03	DQA1*05	DQB1*03	-
		A*68	B*48	C*08	DQA1*05	DQB1*03	-
LSF	FDSA	A*23	B*07	C*03	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*11
		A*30	B*58	C*07	DQA1*05	DQB1*05	DRB1*13
NRP	FDSA	A*02	B*41	C*07	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*03
		A*30	B*58	C*17	DQA1*05	DQB1*05	DRB1*10
NML	FD	A*02	B*14	C*01	DQA1*03	DQB1*03	DRB1*04
		A*31	B*15	C*08	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*11
AGS	FD	A*11	B*35	C*04	DQA1*01	DQB1*05	DRB1*01
		A*11	B*35	C*04	DQA1*01	DQB1*05	DRB1*01
DCM 08	FD	A*01	B*18	C*05	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*03
		A*02	B*57	C*06	DQA1*05	DQB1*02	DRB1*07
ENA	FD	A*01	B*38	C*07	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*03
		A*26	B*58	C*12	DQA1*05	DQB1*02	DRB1*07
HAA	FDSA	A*03	B*14	C*08	DQA1*01	DQB1*04	DRB1*01
		A*33	B*52	C*12	DQA1*03	DQB1*05	DRB1*04
HRDS	FD	A*23	B*41	C*07	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*03
		A*30	B*58	C*17	DQA1*05	DQB1*02	DRB1*07
AF	FD	A*02	B*35	C*04	DQA1*01	DQB1*04	DRB1*08
		A*11	B*44	C*05	DQA1*04	DQB1*06	DRB1*15
KF	FD	A*02	B*15	C*03	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*07
		A*33	B*58	C*07	DQA1*03	DQB1*02	DRB1*09
LBO	FD	A*29	B*14	C*06	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*01
		A*33	B*45	C*08	DQA1*05	DQB1*05	DRB1*11
LEHB	FD	A*24	B*42	C*14	DQA1*01	DQB1*05	DRB1*12
		A*30	B*51	C*17	DQA1*01	DQB1*06	DRB1*13
LSSC	FDSA	A*02	B*40	C*03	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*04
		A*03	B*51	C*14	DQA1*03	DQB1*06	DRB1*13
MTC	FDSA	A*02	B*13	C*06	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*07
		A*23	B*44	C*07	DQA1*02	DQB1*05	DRB1*16

<b>RDTN</b>	FDSA	A*24	B*42	C*01	DQA1*03	DQB1*03	DRB1*04
		A*30	B*59	C*17	DQA1*05	DQB1*04	DRB1*11
<b>MM</b>	FD	A*24	B*14	C*02	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*01
		A*29	B*45	C*06	DQA1*03	DQB1*05	DRB1*04
<b>MRC</b>	FDSA	A*02	B*40	C*03	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*11
		A*03	B*51	C*15	DQA1*05	DQB1*06	DRB1*15
<b>TCTS</b>	FDSA	A*30	B*51	C*15	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*07
		A*30	B*57	C*18	DQA1*02	DQB1*05	DRB1*13
<b>VFS</b>	FD	A*02	B*40	C*14	DQA1*01	DQB1*05	DRB1*13
		A*11	B*51	C*15	DQA1*01	DQB1*06	DRB1*16
<b>WRS</b>	FDSA	A*02	B*37	C*04	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*11
		A*30	B*53	C*06	DQA1*05	DQB1*05	DRB1*16
<b>AFS</b>	FD	A*02	B*15	C*07	DQA1*03	DQB1*03	DRB1*04
		A*23	B*49	C*07	DQA1*06	DQB1*03	DRB1*08
<b>BRS</b>	FD	A*02	B*14	C*04	DQA1*03	DQB1*02	DRB1*03
		A*24	B*35	C*08	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*04
<b>DCM 27</b>	FD	A*02	B*27	C*02	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*11
		A*02	B*35	C*04	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*11
<b>DAS</b>	FD	A*02	B*44	C*05	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*04
		A*68	B*49	C*07	DQA1*03	DQB1*06	DRB1*13
<b>DV-09</b>	FDSA	A*02	B*07	C*05	DQA1*03	DQB1*03	DRB1*04
		A*03	B*44	C*07	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*11
<b>DV-10</b>	FDSA	A*03	B*07	C*07	DQA1*01	DQB1*06	DRB1*13
		A*30	B*07	C*07	DQA1*01	DQB1*06	DRB1*15
<b>DV-11</b>	FDSA	A*23	B*35	C*04	DQA1*01	DQB1*04	DRB1*01
		A*31	B*44	C*04	DQA1*04	DQB1*05	DRB1*08
<b>DV-12</b>	FD	A*02	B*07	C*07	DQA1*01	DQB1*02	-
		A*26	B*08	C*07	DQA1*05	DQB1*06	-
<b>DV-14</b>	FDSA	A*26	B*18	C*05	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*03
		A*30	B*51	C*07	DQA1*05	DQB1*06	DRB1*13
<b>DV-18</b>	FD	A*02	B*35	C*04	DQA1*05	DQB1*02	DRB1*03
		A*31	B*57	C*18	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*14
<b>DV-20</b>	FDSA	A*24	B*18	C*03	DQA1*01	DQB1*04	DRB1*03
		A*33	B*51	C*15	DQA1*04	DQB1*06	DRB1*15
<b>DV-21</b>	FD	A*01	B*08	C*04	DQA1*05	DQB1*02	DRB1*03
		A*68	B*35	C*07	DQA1*05	DQB1*03	DRB1*16
<b>DV-22</b>	FD	A*02	B*15	C*03	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*11
		A*24	B*35	C*04	DQA1*05	DQB1*06	DRB1*13
<b>DV-25</b>	Grave	A*01	B*18	C*12	-	DQB1*03	DRB1*04
		A*25	B*51	C*15	-	DQB1*03	DRB1*04
<b>DV-36</b>	FDSA	A*02	B*51	C*02	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*07
		A*03	B*51	C*16	DQA1*02	DQB1*06	DRB1*13
<b>GCS</b>	FD	A*03	B*18	C*04	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*03
		A*30	B*35	C*05	DQA1*05	DQB1*02	DRB1*07
<b>JBS</b>	FD	A*23	B*13	C*06	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*07
		A*30	B*51	C*15	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*07
<b>KWSP</b>	FD	A*23	B*44	C*04	DQA1*03	DQB1*02	DRB1*08
		A*26	B*45	C*06	DQA1*04	DQB1*04	DRB1*09
<b>LJL</b>	FD	A*02	B*07	C*07	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*03
		A*24	B*51	C*16	DQA1*05	DQB1*06	DRB1*15
<b>LMV</b>	FD	A*02	B*07	C*07	DQA1*04	DQB1*03	DRB1*08
		A*03	B*51	C*16	DQA1*05	DQB1*04	DRB1*11
<b>LSMA</b>	FD	A*02	B*51	C*15	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*01
		A*24	B*52	C*15	DQA1*03	DQB1*05	DRB1*04
<b>MCFV</b>	FD	A*02	B*15	C*03	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*01
		A*02	B*49	C*07	DQA1*03	DQB1*05	DRB1*04

<b>NOS</b>	FD	A*02	B*39	C*04	DQA1*01	DQB1*03	DRB1*04
		A*30	B*44	C*07	DQA1*03	DQB1*06	DRB1*15
<b>SF</b>	FD	A*02	B*44	C*12	DQA1*01	DQB1*06	DRB1*13
		A*24	B*52	C*14	DQA1*01	DQB1*06	DRB1*15
<b>WMM</b>	FD	A*01	B*08	C*07	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*03
		A*24	B*35	C*12	DQA1*05	DQB1*05	DRB1*16
<b>CFS</b>	FDSA	-	-	C*06	DQA1*01	DQB1*03	-
		-	-	C*07	DQA1*05	DQB1*06	-
<b>CTR</b>	Grave	A*02	B*07	C*07	DQA1*02	DQB1*02	DRB1*04
		A*23	B*44	C*16	DQA1*03	DQB1*03	DRB1*07
<b>JFSS</b>	FDSA	A*02	B*45	C*07	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*03
		A*24	B*58	C*16	DQA1*05	DQB1*05	DRB1*10
<b>OAA</b>	FD	A*02	B*15	C*03	DQA1*01	DQB1*02	DRB1*14
		A*33	B*53	C*04	DQA1*02	DQB1*06	DRB1*15
<b>RFC</b>	FD	-	B*07	-	DQA1*01	DQB1*03	-
		-	B*14	-	DQA1*05	DQB1*06	-

Todos os pacientes incluídos neste estudo foram agudos. A classificação clínica foi realizada de acordo com o OMS (2009) em: FD, Febre do Dengue; FDSA, FD com Sinais de Alarme; e Grave. Os traços (-) representam alelos não identificados pela metodologia por insuficiência de quantidade da amostra. Tipagem de HLA tipo I e II foi realizada em colaboração com o Laboratório de HLA – UERJ, sob coordenação do Dr. Luis Cristovão Pôrto.

## Anexo B

### Projeto Dengue

#### Laboratório de Imunologia Viral - FIOCRUZ

#### Mato Grosso do Sul - 2013

##### IDENTIFICAÇÃO

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

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Masc ( ) Fem Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data Entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data Internação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

##### DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Gestante: ( ) Sim ( ) Não Dengue anterior: ( ) Sim ( ) Não

Vacina: ( ) Febre amarela <10 anos ( ) Rubéola/triviral

Outros: \_\_\_\_\_

##### HISTÓRIA CLÍNICA

###### Comorbidades:

Diabetes mellitus	DPOC	Asma brônquica	rinite	Hipertensão arterial
Doença cardíaca	Doença falciforme	Doença auto-imune	Tabagismo	Outros

Doença viral crônica? Quais?

Faz uso de medicamentos contínuos? Especificar:

###### Sintomas suspeitos de dengue

Febre	Prostação/Astenia	Calafrios	Cefaléia	Mialgia	Dor lombar	Artralgia
-------	-------------------	-----------	----------	---------	------------	-----------

Data de Início da Febre: __/__/__						
Dor Retro-Ocular ao movimento do globo ocular	Dor de garganta	Tosse	Náuseas	Vômitos	Dor Abdominal	Diarréia
Epigastralgia	Tontura/Vertigem	Exantema	Prurido	Adenomegalias cervicais	Icterícia	Hiperemia conjuntival
Outros						

#### Atenção para os Sinais de Alarme

Dor Abdominal persistente	Sangramento espontâneo	Sangramento volumoso	Vômitos persistentes	Hepatomegalia	Derrame Pleural	Derrames Pericárdio
Ascite	Hipotensão Postural	Hipotensão Arterial	Desconforto respiratório	Hemoconcentração	Diarréia	
Outros						

#### Manifestações Hemorrágicas

Prova do laço	Petéquias	Gengivorragia	Epistaxe	Metrorragia
Outras				

#### LABORATORIAL

1º HT: \_\_\_\_\_ 1º Plaqueta: \_\_\_\_\_ data: \_\_/\_\_/\_\_

2º HT: \_\_\_\_\_ 2º Plaqueta: \_\_\_\_\_ data: \_\_/\_\_/\_\_

último HT: \_\_\_\_\_ última Plaqueta: \_\_\_\_\_ data: \_\_/\_\_/\_\_

Anexar dados do hemograma e bioquímica

**Outras informações:**

## Anexo C

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado de que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre minha doença, que se chama DENGUE. **MINHA PARTICIPAÇÃO SERÁ APENAS PARA DOAR SANGUE DURANTE OU APÓS MEU ATENDIMENTO MÉDICO.** Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas com esta doença.

O procedimento será o seguinte: **UM VOLUME DE 5 ML OU DE 20 ML SANGUE** será obtido por punção da veia do antebraço, no mesmo momento em que for coletado sangue **PARA DOSAGEM DE PLAQUETAS E HEMATÓCRITO NECESSÁRIOS PARA CONHECER E CONTROLAR A GRAVIDADE DO MEU ESTADO. SEREI SOLICITADO A DOAR 5 OU 20 ML SANGUE UMA VEZ APÓS A RECUPERAÇÃO (ENTRE 1 A 2 MESES) COM A FINALIDADE DE CONFIRMAR A NORMALIDADE DOS EXAMES LABORATORIAIS.**

**FOI-ME EXPLICADO QUE ESTA QUANTIDADE DE SANGUE REPRESENTA UMA PEQUENA PORÇÃO DO QUE POSSUO E SUA RETIRADA NÃO VAI ME PREJUDICAR.**

A retirada do sangue será feita por um enfermeiro ou técnico do CRD. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local da punção, com duração de 3 a 5 dias. Todos os cuidados serão tomados, como uso de seringa, agulha e gaze descartáveis e álcool para assepsia local, entre outros. Quanto aos exames e procedimentos não foram identificados riscos até o momento.

Os resultados deste estudo serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto não será permitida a minha identificação, o que garante a minha privacidade.

O pesquisador responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contactar os demais pesquisadores envolvidos neste estudo.

**MINHA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É INTERAMENTE VOLUNTÁRIA, E SOU LIVRE PARA RECUSAR A PARTICIPAR NO ESTUDO, OU ME RETIRAR EM QUALQUER FASE DA PESQUISA SEM QUE ISSO POSSA AFETAR OU PREJUDICAR O CUIDADO MÉDICO A QUE DEVO RECEBER.**

Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos acima sejam realizados na minha pessoa.

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

Eu, Responsável pelo menor acima identificado, autorizo sua participação, como voluntário (a) no presente projeto de pesquisa.

Data: \_\_\_\_\_

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

Assinatura : \_\_\_\_\_

Pesquisadores: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (021) 8755-7771

Dra.Elzinandes L Azeredo (021) 7183-9093

## Anexo D



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo imunológico e genético durante a febre do dengue

**Pesquisador:** Claire Fernandes Kubelka

**CAAE:** 13318113.7.0000.5248

**Instituição Proponente:** Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 495.688

**Data da Relatoria:** 16/12/2013

#### Apresentação do Projeto:

Os autores pretendem estudar mecanismos fisiopatológicos da dengue, mais especificadamente, fatores imunológicos e genéticos relevantes à regulação da resposta antiviral e à patogênese da doença. No objetivo primário é descrito que o estudo reúne duas vertentes. Entretanto, são identificáveis três grandes estudos que se complementam.

São apresentados quatro objetivos e treze objetivos secundários.

O primeiro estudo é de caso-controle, considerando casos pacientes com manifestações clínicas indicadoras de gravidade (manifestações neurológicas e/ou co-morbidades) e controles pacientes sem estes sintomas. Os voluntários serão recrutados de bancos de dados dos centros participantes da pesquisa (UFMS e UPE) semelhante ao realizado pelo centro do RJ. Pretende-se determinar o perfil de citocinas e o perfil genético a fim de identificar biomarcadores específicos de gravidade através da correlação entre polimorfismo no gene e regulação da proteína como marcador de gravidade.

O segundo estudo é longitudinal, avaliando voluntários jovens na fase aguda da doença. Amostras de voluntários na fase aguda da doença serão processadas imediatamente ou estocadas nas instituições participantes do estudo, a fim de comparar a resposta imunológica de fase aguda com

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone**

: (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br