

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FIOCRUZ/PR

ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ASSOCIADA À APOPTOSE EM CÉLULAS
DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS HUMANOS INDUZIDA PELA INFECÇÃO
DE VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3

GUILHERME FERREIRA SILVEIRA

Curitiba
Fevereiro, de 2011.

GUILHERME FERREIRA SILVEIRA

ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ASSOCIADA À APOPTOSE EM CÉLULAS
DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS HUMANOS INDUZIDA PELA INFECÇÃO
DE VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dr. Claudia N. Duarte dos Santos

Co-orientador: Dr. Juliano Bordignon

Curitiba

2011

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos
Orientadora e presidente da banca Instituto Carlos Chagas - ICC

Prof. Dr. Daniel Santos Mansur
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplente,

Prof. Dra. Sônia M Raboni

Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o mestrando *Guilherme Ferreira Silveira*, em relação ao seu trabalho intitulado: "Estudo da resposta inflamatória associada à apoptose em células dendríticas derivadas de monócitos humanos induzida pela infecção de vírus dengue sorotipo 3" são de parecer favorável à APROVAÇÃO do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011



Edvaldo da Silva Trindade
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185796

CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81.531-990 - JARDIM DAS AMÉRICAS - Caixa Postal 19031 -
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail- pgbiocel@ufpr.br - www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA -PR

À minha esposa Cecília, que sempre acreditou, mesmo antes do que eu.

Aos meus pais Nailon e Luiza, irmão e irmãs, e familiares.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela orientação, incentivo e apoio, recebidos durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Juliano Bordignon, por todo o ensinamento e dedicação e amizade.

Aos diretores do Instituto Carlos Chagas - ICC, Drs. Samuel Goldenberg, Stênio P. Fragoso, Marco A. Krieger, Maurílio José Soares, Claudia N. Duarte dos Santos, pelo empenho em sempre proporcionar as melhores condições de trabalho para todos os que buscam o Instituto Carlos Chagas.

À Dra. Florencia Meyer, por toda a colaboração, atenção e presteza na execução do projeto.

Ao Dr. Christian M. Probst e ao Felipe Leprevost pelos ensinamentos em análises de bioinformáticas.

Ao Dr. André Báfica e ao Lucas L. Nogueira pela orientação a respeito da imunologia e outras técnicas.

Ao Dr. Jörg Kobarg e a Maria Eugenia Ribeiro de Camargo do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS pela colaboração na realização dos micro-arranjos.

Aos colegas do laboratório pelas inúmeras vezes em que me auxiliaram, em todos os momentos do desenvolvimento deste estudo.

À Dra. Monica Mathor, do Centro de Tecnologias de Irradiação do Instituto de Pesquisas em Energia Nuclear – IPEN/USP, pelas inativações dos sobrenadantes das culturas virais.

À UFPR, à pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, aos professores e todos os membros do programa pela oportunidade de aprendizado.

Ao apoio financeiro das FIOCRUZ, CNPq, CNPq-PROSUL Fundação Araucária, e RIVE-CYTED.

Ao Ozzy, Robert, Lemmy, Tom e James.

Guilherme Ferreira Silveira.

Cientistas de hoje substituíram a matemática por experiências, e eles afastam-se, equação depois de cada equação, e eventualmente constroem uma estrutura que não tem nenhuma relação com a realidade.

Никола Тесла

RESUMO

A Dengue (DEN) representa atualmente um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo. A OMS estima que cerca de 80 milhões de pessoas se infectem anualmente em mais de 100 países. A DEN é causada por um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV 1-4), sendo transmitida ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes spp.* As apresentações clínicas decorrentes da infecção por qualquer um dos sorotipos de DENV podem variar desde a Febre da Dengue (FD), à Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), podendo progredir para a Síndrome do Choque da Dengue (SCD). A FD é caracterizada por sintomas inespecíficos como cefaléia, febre, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos e exantemas. Já a FHD, além dos sintomas da FD, se caracteriza também por hemorragias, trombocitopenia e extravasamento de soro dos vasos sanguíneos para o tecido basal, o que é atribuído ao aumento da permeabilidade vascular. As células dendríticas (DCs do inglês *dendritic cells*) são alvo primário da infecção pelos DENV, sendo ainda as mais eficientes células apresentadoras de antígenos (APCs do inglês *Antigen Presentation Cells*), realizando um papel essencial na captura, processamento e transporte de antígenos até os linfonodos. Com o intuito de obter novos conhecimentos sobre a interação de DENV e células hospedeiras, este trabalho objetivou o estudo da resposta de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (mdDCs), infectadas com diferentes cepas de DENV-3. Inicialmente, o isolado clínico recente PAR DENV3/5532-02, foi utilizado para infectar mdDCs em diferentes tempos. As análises demonstraram que as infecções destas células modulam uma série de genes, pertencentes principalmente as seguintes ontologias: resposta imune, atividade catalítica, adesão e proliferação celular. Com o intuito de expandir os conhecimentos relacionados à resposta das mdDCs à infecção, outro isolado clínico, o BR DENV3/290-04, foi incluído no estudo. Os resultados mostraram que a cepa PAR DENV3/5532-02 infecta e induz apoptose em uma porcentagem maior de células, induz a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), em relação à cepa BR DENV3/290-04, em 72h. Foi também demonstrado que a indução de apoptose nestas células ocorreria tanto pela replicação viral como por um efeito *bystander*, e não pela ação direta do TNF- α . Neste caso o TNF- α apresentou um efeito protetor nas culturas infectadas pelo DENV. Nossos dados sugerem que o isolado clínico PAR DENV3/5532-02 pode modular a sobrevivência e função das mdDCs.

Palavras chave: Dengue. Células dendríticas. Citocinas. Inflamação. Apoptose. Replicação viral.

ABSTRACT

Dengue (DEN) is currently one of the most serious public health problems worldwide. The WHO estimates that about 80 million people become infected annually in over 100 countries. The DEN is caused by one of four dengue virus serotypes (DENV 1-4), and is transmitted to humans through the bite of mosquitoes of the genus *Aedes*. The clinical presentations resulting from infection by any of the serotypes of DENV may vary from Dengue Fever (DF) to the Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), leading to the Dengue Shock Syndrome (DSS). The DF is characterized by nonspecific symptoms such as headache, fever, arthralgia, myalgia, nausea, vomiting and rashes. On the other hand, DHF have the same symptoms of DF, in addition to bleeding, thrombocytopenia and extravasation of serum from blood vessels to the basal tissue, which is attributed to increased vascular permeability. Dendritic cells (DC) are the primary target of infection by DENV and is still the most efficient antigen presenting cells (APC), fulfilling a key role in capturing, processing and transport of antigens to the lymph nodes. In order to gain further knowledge on the interaction of DENV and host cells, this work aims to study the response of DC derived from human monocytes (mdDCs), infected with different strains of DENV-3. Initially, a recent clinical isolate PAR DENV3/5532-02 was used to infect mdDCs at different times. Analysis showed that infection of these cells modulates a number of genes, belonging mainly to the following ontologies: immune response, catalytic activity, cell adhesion and proliferation. In order to expand the knowledge related to the response of mdDCs to infection, another clinical isolate, BR DENV3/290-04 was included in the study. The results showed that PAR DENV3/5532-02 strain infects and induces apoptosis in a greater percentage of cells and leads to an increased production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) in relation to strain BR DENV3/290-04 at 72. It was also showed that induction of apoptosis in these cells occurred by both viral replication and bystander effect and not by direct action of TNF- α . In this case TNF- α showed a protective effect in cultures infected with DENV. Our data suggest that the clinical isolate PAR DENV3/5532-02 can modulate the survival and function of mdDCs.

Keywords: Dengue virus 3. Dendritic cells. Cytokines. Inflammation. Apoptosis. Viral replication.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 –	Estrutura secundária do RNA das regiões 3' UTR das cepas DENV3/5532 e DENV3/290.....	38
Figura 5.2 –	Expressão de marcadores moleculares de superfície em culturas de mdDCs.....	40
Figura 5.3 –	Co-marcação para mdDCs e vírus da dengue analisado por citometria de fluxo em 72hpi.....	41
Figura 5.4 –	<i>Box plot</i> da média relativa da intensidade de sinal das <i>probs</i> em cada condição de análise, após a normalização pelo método de RMA.....	42
Figura 5.5 –	Resultados referentes aos experimentos de microarranjo das mdDCs infectadas com DENV3/5532.....	45
Figura 5.6 –	Porcentagem de células infectadas, progênie viral e células em processo de apoptose após infecção com DENV3/290 ou DENV3/5532.....	48
Figura 5.7 –	Níveis de TNF- α , IL-6 e IL-8 no sobrenadante de mdDCs infectadas com DENV3/5532, DENV3/290 e mock.....	50
Figura 5.8 –	Perfil de produção de quimiocinas pelas mdDCs infectadas.....	52
Figure 5.9 –	Papel do tratamento com o TNF- α na porcentagem de mdDCs infectadas e na indução do processo de apoptose.....	57
Figura 5.10 –	Papel da replicação do DENV3 na indução de apoptose e na secreção de citocinas pelas mdDCs.....	58

Figure 5.11 – Perfil de produção de quimiocinas pelas mdDCs infectadas com cepas nativas e inativas de DENV3.....	59
Figura 5.12 – Efeito <i>bystander</i> promovido nas mdDCs tratadas por sobrenadante de culturas submetidas à irradiação gama.....	61
Figura 6.1 – Diagrama representativo dos resultados da ação do TNF- α nas infecções pelos DENV3.....	68
Figura 10.1 – Histograma de análise de expressão de CD40 em mdDCs infectadas com DENV3.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 –	Descrição das proteínas que compõe a partícula viral do DENV.....	18
Tabela 4.1 –	Nome dos iniciadores, gene ID, sequências, temperatura de anelamento, tamanho do <i>amplicon</i> e concentração do cDNA utilizado nas qPCR.....	32
Tabela 5.1 –	Substituições aminoacídicas entre as cepas de DENV3/5532 e DENV3/290.....	38
Tabela 10.1 –	Descrição dos genes modulados nas mdDCs infectadas com a cepa DENV3/5532.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2'-5'-OAS	-	2'-5'-oligoadenilato sintetase;
4G2	-	Anticorpo monoclonal anti-Flavivirus específico;
ADE	-	Exacerbação dependente de anticorpos (Antibody Dependent-Enhancement);
ANOVA	-	Análise de variância
anti-GFP	-	Anticorpo específico contra proteína verde fluorescente;
anti-TNF- α	-	Anticorpo neutralizante específico contra fator de necrose tumoral alfa;
APC	-	Células apresentadoras de antígenos;
ATP	-	Adenina trifosfato;
C	-	Proteína viral de capsídeo;
C3	-	Composto 3 do complemento;
C6/36	-	Células da glandula salivar de mosquitos <i>Aedes albopictus</i> ;
CBA	-	Cytometric Bead Array;
CCL3	-	Ligante (motivo C-C) de quimiocina 3
CD	-	Agrupamento de diferenciação (cluster differentiation);
CO ₂	-	Gás carbônico;
CTR	-	Centro de Tecnologia de Irradiação;
CXCR3	-	Receptor (motivo C-X-C) de quimiocina 3
DC	-	Células dendríticas;
DC-SIGN	-	Molécula ligada à adesão intercelular tipo 3 grambina não-integrina, específica de células dendríticas;
DCC	-	Células dendríticas dermais;
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;
DENV3/290	-	BR DENV3/290-02 (ENTREZ EF629369);
DENV3/5532	-	PAR DENV3/5532-07 (bankit1388619);
DF	-	Febre da Dengue;
DHF	-	Febre Hemorrágica da Dengue;
DNA	-	Ácido desoxiribonucleotídeo;
DSS	-	Síndrome do Choque da Dengue;
E	-	Proteína viral de envelope;
EIF2KA2	-	Proteína quinase dependente de RNA;
ELISA	-	Ensaio de ligação imuno-enzimático
FACS	-	Citometria de fluxo (flow assay for cell sorting);
FBS	-	Soro fetal bovino;
FIOCRUZ	-	Fundação Oswaldo Cruz;
FLIP	-	Proteína Inibitória de FLICE;
GM-CSF	-	Fator Estimulante de Colônias de Monócitos e Granulócitos;
GO	-	Ontologia gênica;
HepG2	-	Célula de carcinoma humano
HLA-DR	-	Antígeno leucocitário humano DR;

HMEC-1	-	Células endoteliais microvasculares dermais humanas;
hpi	-	Horas após a infecção;
HUVECs	-	Células endoteliais de cordão umbilical humano;
IFIT1	-	Proteína induzida por interferons com repetições de tetratricopeptídeos 1;
IFN-I	-	Interferons do tipo I
IgG	-	Imunoglobulina G;
IgM	-	Imunoglobulina M;
IL-10	-	Interleucina 10;
IL-12	-	Interleucina 12;
IL-12p40	-	Interleucina 12 proteína 40;
IL-12p70	-	Interleucina 12 proteína 70;
IL-13	-	Interleucina 13;
IL-14	-	Interleucina 14;
IL-17	-	Interleucina 17;
IL-1 β	-	Interleucina 1 beta;
IL-4	-	Interleucina 4;
IL-5	-	Interleucina 5;
IL-6	-	Interleucina 6;
IL-8	-	Interleucina 8;
IP-10	-	Proteína 10 induzida por interferom gama ou CXCL10;
IP-9	-	Proteína 9 induzida por interferom gama ou CXCL11;
IPEN	-	Instituto de Pesquisas em Energias Nucleares;
ISG	-	Genes estimulados por interferon;
JAK/STAT	-	Janus quinase/sinais e ativadores de transcrição
LC	-	Células de Langerhans;
M	-	Proteína viral de membrana;
MCP-1	-	Proteína de monócitos quimiotática 1
MHC	-	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade;
MIG	-	CXCL - ligante (motivo C-X-C) de quimiocina 9
MIP-1 β	-	Proteína inflamatória de macrófagos 1 β
Mock	-	Mimetismo de cinética celular (mimetic of cell kinetics);
MOI	-	Multiplicidade de infecção;
MX	-	Proteínas de resistência à infecção pelos mixovírus;
NF- $\kappa\beta$	-	Fator nuclear capa beta;
NK	-	Células natural killer;
NO	-	Oxido nítrico;
NS	-	Não Significativo;
NS1	-	Proteína viral não estrutura 1;
NS2A	-	Proteína viral não estrutura 2A;
NS2B	-	Proteína viral não estrutura 2B;
NS3	-	Proteína viral não estrutura 3;
NS4A	-	Proteína viral não estrutura 4A;
NS4B	-	Proteína viral não estrutura 4B;
NS5	-	Proteína viral não estrutura 5;
OAS2	-	2'-5' - oligoadenilato sintetase 2;
PBS	-	Solução de tampão fosfato;
PCR	-	Proteína C Reativa;

prM	-	Proteína viral pré-membrana
qPCR	-	Reação em cadeia da polimerase quantitativa;
RANTES	-	Proteínas reguladas pela ativação, expressas e secretadas pelas células T normais;
RLR	-	Receptores semelhantes à RIG (RIG-like receptors);
RMA	-	Robust Multi-Arrays Average;
RNA	-	Ácido ribonucleico;
sNS1	-	NS1 solúvel;
TA	-	Temperatura ambiente;
TANGO	-	Tool for Analysis of Gene Ontology Enrichments;
Th1	-	Perfil de resposta da célula T auxiliar 1;
Th2	-	Perfil de resposta da célula T auxiliar 1;
TLR	-	Receptores semelhantes à Toll (Toll-like receptors);
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral alfa;
TRAIL	-	Ligante da superfamília de fatores de necrose tumoral, membro 10 (TNFSF10)
UTR	-	Região não traduzida (untranslated region);

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:.....	16
1.1 – Epidemiologia:.....	16
1.2 – O vírus da dengue:.....	17
1.3 – Patogenia:.....	18
1.4 – Células Dendríticas:.....	21
2. JUSTIFICATIVA:.....	24
3. OBJETIVOS:.....	26
3.1 – Objetivo Principal:.....	26
3.2 – Objetivos Específicos:.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS:.....	27
4.1 – Culturas de células dendríticas derivadas de monócitos:.....	27
4.2 – Isolamento viral e sequenciamento de nucleotídeos:.....	28
4.3 – Microarranjo, análises bioinformáticas e PCR quantitativo:.....	29
4.4 – Infecção, produção de citocinas/quimiocinas e determinação da taxa de apoptose:.....	32
4.5 – Papel do TNF- α na infecção de mdDCs e na sobrevivência celular:.....	34
4.6 – Papel da replicação viral na infecção de mdDCs:.....	35
4.7 – Análises Estatísticas:.....	36

5. RESULTADOS:.....	37
5.1 – Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados virais:.....	37
5.2 – Expressão gênica diferencial em mdDCs infectadas com DENV3/5532:.....	39
5.3 – Análise comparativa da susceptibilidade de mdDCs à infecção e indução à apoptose:.....	46
5.4 – Determinação da produção de citocinas/quimiocinas pelas mdDCs infectadas por DENV3:.....	49
5.5 – Análise do papel do TNF- α na infecção e na indução de apoptose <i>in vitro</i> em mdDCs infectadas com os diferentes isolados de DENV3:.....	52
5.6 – Determinação do papel da replicação viral na indução de apoptose e produção de citocinas/quimiocinas em mdDCs infectadas com DENV3:.....	56
6. DISCUSSÃO:.....	62
7. CONCLUSÕES:.....	73
8. PERSPECTIVAS:.....	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	76
10. ANEXO:.....	92
10.1 – Tabelas genes modulados em mdDCs	92
10.2 – Soluções:.....	102
10.3 – Artigo Publicado:.....	103

1. INTRODUÇÃO:

1.1 – Epidemiologia:

A Dengue (DEN) representa atualmente um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 80 milhões de pessoas se infectem anualmente em mais de 100 países, 550 mil pacientes necessitem de hospitalização e pelo menos 25 mil morram devido a infecção pelo vírus da DEN (WHO, 2009). Na última década, em torno de 80% dos casos confirmados de DEN nas Américas ocorreu no Brasil e, desde sua reintrodução no país em 1986 (SCHATZMAYR, *et al.*, 1986, NOGUEIRA, *et al.*, 1988), mais de cinco milhões de casos foram confirmados em praticamente todo território nacional. No ano de 2009, foram reportados no Brasil mais de 734.000 casos de Febre da Dengue (FD), e quase 10.000 casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), com 212 mortes (WHO, 2009). Já em 2010, relatos preliminares do Ministério da Saúde apontam para mais de 1 milhão de casos. A maioria dos estados brasileiros passou por epidemias de DEN com a co-circulação de três sorotipos DENV-1, -2 e -3 (MELO, *et al.*, 2009). Recentemente, em 2010, foram confirmados pelo Ministério da Saúde, casos autóctones de dengue sorotipo 4 no norte do Brasil (MELO, *et al.*, 2009). Ainda, o aumento significativo das formas mais graves de dengue como FHD e Síndrome do Choque da Dengue (SCD) tem sido observado na América do Sul (MELO, *et al.*, 2009).

Em 2002 e 2004 ocorreram no Brasil grandes epidemias, com aumento expressivo de casos de FHD e óbitos. Neste período foram reportados quase 900.000

casos (WHO, 2004). Outra importante epidemia ocorrida na América do Sul foi em 2007 no Paraguai, com mais de 28.000 casos de FD e FHD notificados (WHO, 2007) tendo sido o DENV/3 isolado de alguns dos casos mais graves e com manifestações clínicas atípicas.

1.2 – O vírus da Dengue:

Os quatro sorotipos do vírus (DENV-1, -2, -3, e -4) fazem parte do gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), sendo transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes spp* (CALISHER, 1989). A partícula viral do DENV é composta por três proteínas estruturais, designadas C (proteína de capsídeo), M (proteína de membrana) e E (proteína de envelope) (CHAMBERS, *et al.*, 1990) e um genoma de RNA cadeia simples de polaridade positiva de ~11 kb, que contém uma única fase de leitura aberta, flanqueada por duas regiões não-traduzidas 5' e 3' UTR (do inglês *untranslated region*). Após a penetração na célula hospedeira e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, o RNA genômico é traduzido originando uma poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos, que é clivada *co* e *pós*-traducionalmente por proteases da célula hospedeira (signalases/cisteínases, proteinases e furina) e uma protease codificada pelo próprio vírus (serina proteinase), para gerar as proteínas estruturais C, prM (precursora da proteína M) e E, além das proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (LINDENBACH & Rice, 2003). Cada uma dessas proteínas é responsável por determinadas funções na geração das novas partículas virais, como descrito na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Descrição das proteínas que compõe a partícula viral do DENV e de suas principais funções durante o ciclo de vida. As funções seguidas de sinal de interrogação (?) são propostas.

UTR		Proteínas Estruturais					
3'		C		prM		E	
Replicação e tradução.		Formação da ribonucleoproteína.		Chaperona.		Interação com receptores, tropismo e fusão com membranas celulares.	
Proteínas Não Estruturais							UTR
NS1	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B	NS5	5'
Associação à superfície celular e no meio extracelular Replicação (?)	Inibe IFN-I (?)	Cofator de protease	Protease helicase, RNase e 5'PPP.	Inibe IFN-I.	Replicação, Inibe IFN-I (?)	RNA pol. Metiltransferase	Replicação e Tradução, Inibe IFN-I (?)

(adaptado de: PERERA & KUHN, 2008; RODENHUIS-ZYBERT, *et al.*, 2010)

1.3 – Patogenia:

Os DENV causam um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde a FD à FHD, que pode progredir para SCD (ROTHMAN & ENNIS, 1999; KUNO, 2003). A FD é caracterizada por sintomas inespecíficos como cefaléia, febre, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos e exantemas. Já a FHD, além dos sintomas da FD, se caracteriza também por hemorragias, trombocitopenia e extravasamento de plasma de vasos para tecido basal, o que é atribuído ao aumento da permeabilidade vascular (ROTHMAN, 1997; WHO, 1997; MALAVIGE, *et al.*, 2004). Este quadro pode se agravar rapidamente e o indivíduo entrar em choque hipovolêmico, denominado SCD, evoluindo em muitos casos para o óbito. Alguns autores sugerem que mecanismos imunopatológicos desempenhariam um importante papel no desenvolvimento da FHD/SCD (KURANE & ENMLR, 1994; ROTHMAN & ENNIS, 1999). Entretanto, os mecanismos fisiopatológicos exatos que desencadeiam estes quadros

ainda precisam ser determinados, o que é bastante dificultado pela falta de um modelo animal que reflita as formas graves da doença (BHAMARAPRAVATI, 1993; AN, *et al.*, 1999).

É sugerido que uma maior prevalência de FHD seja observada após a infecção secundária por um segundo sorotipo de vírus da dengue, possivelmente decorrente do fenômeno dos anticorpos potencializadores da infecção (*Antibody Dependent-Enhancement – ADE*) (HALSTEAD & O'ROURKE, 1977; MALAVIGE, *et al.*, 2004). Este fenômeno ocorre após a infecção secundária por um sorotipo heterólogo de vírus da dengue, onde anticorpos sub-neutralizantes contra um sorotipo (proveniente da infecção primária), associados à partícula viral, culminam por facilitar a endocitose do vírus (proveniente da infecção secundária), auxiliando em sua penetração na célula hospedeira e exacerbando, deste modo, a infecção (HALSTEAD & O'ROURKE, 1977). Outras evidências indicam que uma das possíveis causas do aumento da gravidade da doença seria variantes virais com um maior potencial patogênico, assim como um maior potencial de infecção de mosquitos vetores (RICO-HESSE, *et al.*, 1997; DUARTE dos SANTOS, *et al.*, 2000).

Mutações na glicoproteína E e nas regiões 5' e 3' UTR parecem alterar a eficiência de replicação do DENV em células dendríticas (RICO-HESSE, *et al.*, 1997). Além disso, diferentes isolados virais apresentam capacidade de replicação distinta em monócitos humanos, demonstrando variabilidade na virulência entre os isolados virais (HALSTEAD, 1998). Duarte dos Santos e colaboradores em 2000 demonstraram que mutações na proteína de envelope e no domínio helicase da proteína NS3 parecem estar envolvidas na aquisição do fenótipo neurovirulento de amostras de DENV-1 em modelo murino. As mutações no domínio helicase da

proteína NS3 e na proteína E parecem alterar a capacidade de replicação do vírus, contribuindo para o desenvolvimento de encefalite nos camundongos (DUARTE dos SANTOS, *et al.*, 2000; BORDIGNON, *et al.*, 2007).

Outro aspecto importante na patogenia da DEN é a resposta do hospedeiro à infecção. Uma vez inoculado no homem, o DENV tem como alvo primário às células residentes do sistema imunológico da pele, como as células de Langerhans (LCs) e as células dendríticas (DCs) (NAVARRO-SÁNCHEZ, *et al.*, 2005). Ambos os tipos celulares são considerados sentinelas do sistema imunológico e são caracterizados morfológicamente como possuindo prolongamentos da membrana plasmática, o que possibilita um maior contato com a matriz extracelular da pele. LCs e DCs representam apenas 3% dos tipos celulares residentes na pele, cobrindo, porém, uma superfície que pode chegar até 25% de todo o tecido epitelial (SATTHAPORN & EREMIN, 2001). Além destas características morfológicas, um dos receptores de entrada do DENV em células eucarióticas foi descrito em DCs, o DC-SIGN (molécula ligada à adesão intercelular tipo 3 grambina não-integrina, específica de células dendríticas [SATTHAPORN & EREMIN, 2001]). Este receptor está presente na membrana plasmática de DCs e realiza um primeiro contato com o Domínio III da proteína E do envelope viral (PERERA & KUHN, 2008; RODENHUIS-ZYBERT, *et al.*, 2010). O contato entre estas moléculas, assim como outras supostas interações vírus-molécula de superfície celular, proporcionam a sinalização para a formação de *lipid rafts*. A formação deste tipo de especialização de membrana inicia a entrada do vírus na célula, via endocitose (SUN, *et al.*, 2008). Moléculas DC-SIGN parecem concentrar o vírus na membrana celular e internalizá-lo pela via endocítica (SAKUNTABHAI, *et al.*, 2005; POKIDYSHEVA, *et al.*, 2006). Estas informações

mostram que o sistema imunológico, assim como algumas de suas células, possui um papel fundamental na patogênese do DENV.

1.4 – Células Dendríticas:

As DCs são as mais eficientes células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo essenciais na captura, processamento e transporte de antígenos até os linfonodos. Uma vez nos linfonodos, as DCs-APCs apresentam aos linfócitos T, via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC/HLA) de classe I ou II, antígenos dos microrganismos invasores. Desta maneira, as DCs constituem uma ligação fundamental entre a resposta imune inata e adaptativa (DEJNIRATTISAI, *et al.*, 2008).

Foi demonstrado que DCs ativadas após a infecção pelo vírus da dengue secretam fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferons (IFN) do tipo I, além de expressarem cofatores relacionados com a apresentação de antígeno e maturação como CD40, CD80, CD83 e CD86. Outro ponto importante parece ser o tipo de resposta induzida durante a infecção (BALTIMORE, *et al.*, 2009). Libraty e colaboradores em 2001 demonstraram que pacientes que montam uma resposta de células T auxiliares, com padrão Th1 no início da infecção e a sustentam ao longo do processo parecem ter uma menor tendência ao desenvolvimento de formas graves da doença, diferente dos que desenvolvem uma resposta de células T auxiliares com padrão Th2, ou que mudam de Th1 para Th2 ao longo da infecção, os quais apresentam maior risco de evoluírem para as formas graves (FHD/SCD).

O reconhecimento dos patógenos pelas DCs ocorre por diferentes mecanismos, como a via do receptor de C-lectina (DC-SIGN – CD209) e dos receptores *Toll-like* (TLRs) ou dos Receptores Semelhantes à RIG (RLR) (BOWIE & UNTERHOLZNER, 2008). Anticorpos anti-DC-SIGN inibem a infecção de DCs pelo DENV, demonstrando a importância deste receptor na DEN (NAVARRO-SÁNCHEZ, *et al.*, 2005). Estudos de polimorfismos de DC-SIGN demonstraram sua relação com a patogenia da dengue (SAKUNTABHAI, *et al.*, 2005). Finalmente, diferenças na capacidade das DCs em conter a infecção podem estar relacionadas com o desenvolvimento de sintomas incomuns na dengue, uma vez que a resposta do sistema imunológico à infecção pode ser comprometida. Adicionalmente, a ativação precoce de células *natural killer* (NK) e a produção de interferons tipo-I (IFN-I) limitam a replicação viral e constituem importantes mecanismos de imunidade inata contra o DENV (NAVARRO-SÁNCHEZ, *et al.*, 2005). A ocorrência de formas graves da dengue após infecções primárias ou secundárias se deve a uma resposta imune anormal envolvendo a produção de citocinas, quimiocinas, ativação de linfócitos T e distúrbios homeostáticos. Além disso, elevações nos níveis circulantes de marcadores como receptores solúveis de TNF e IL-12 foram correlacionados com a gravidade da doença (NAVARRO-SÁNCHEZ, *et al.*, 2005).

Warke *et al.* em 2003 demonstraram que células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs), quando infectadas por DENV-2, alteram a expressão de genes relacionados à resposta antiviral, em especial, a 2',5'-oligoadenilato sintetase (2',5'-OAS), que pertence à via regulada por IFN-I. A 2',5'-OAS é uma endoribonuclease RNase L envolvida na degradação de RNA, sendo importante na resposta imune inata antiviral (KAJASTE-RUDNITSKI, *et al.*, 2005). Além disso, no mesmo trabalho

foram identificados 422 genes modulados (296 superexpressos e 126 subexpressos) na infecção pelo vírus DENV-2, utilizando a técnica de microarranjo de alta densidade de DNA. Os genes com expressão aumentada (296) representam várias categorias, como: estresse celular, resposta imunológica, dano celular, inflamação e resposta antiviral. Genes relacionados ao citoesqueleto e estrutura de membrana apresentaram expressão diminuída. A infecção viral também parece modular a apoptose, inibindo-a nos primeiros momentos da infecção, permitindo assim a replicação viral, e desencadeando-a no decorrer da infecção (WARKE, *et al.*, 2003; KROEMER, *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA:

A picada do mosquito do gênero *Aedes spp* é a forma de transmissão do DENV. No momento da picada, as partículas virais são inoculadas juntamente com a saliva do mosquito. Uma vez no tecido do hospedeiro, as partículas virais são endocitados pelas DCs, que irão processá-las, dando início à apresentação dos antígenos virais as células T. A habilidade das DCs em conter a infecção nos seus momentos iniciais foi sugerida como um ponto de equilíbrio entre o desenvolvimento de casos leves e a gênese das formas graves da dengue (NAVARRO-SÁNCHEZ, *et al.*, 2005). O entendimento deste delicado balanço de interações entre DC e DENV pode ter um papel crucial na elucidação da patologia da FD e FHD/SCD, uma vez que a DC é uma das mais importantes APCs responsáveis por promover a ligação entre o sistema imune inato e adaptativo.

Recentemente, foi isolada em nosso laboratório uma cepa de DENV que ocasionou um quadro de dengue clássica, não fatal, ocorrido no estado do Rio de Janeiro, Brasil, durante uma importante epidemia em 2002 (BR DENV/3/290-02) (GeneBank EF629369). Além desta, outra cepa de DENV foi isolada em nosso laboratório, de um caso de dengue visceral ocorrido no Paraguai em 2007 (PAR DENV/3/5532-07, em 2007) (bankit1388619). Ambas apresentam um baixo número de passagens em laboratório, 5 e 3 respectivamente. As análises moleculares revelaram que as cepas BR DENV/3/290-02 e PAR DENV/3/5532-07 pertencem ao genótipo III do sorotipo 3. Portanto, o uso destas cepas virais em estudos de interação DC-humanas-DENV pode mimetizar a resposta dos pacientes quando da infecção pelos DENV/3, com diferentes quadros clínicos.

A instalação de uma doença infecciosa é dependente de vários fatores, sendo os principais a virulência do microrganismo e a resposta do hospedeiro contra o agente infeccioso. O equilíbrio entre estes aspectos define o surgimento ou não da doença. Deste modo, a análise da resposta das DCs providas de voluntários saudáveis, infectadas por estes vírus deverá contribuir para o melhor entendimento de algumas etapas importantes no processo de infecção por DENV e, eventualmente, nortear o desenho racional de terapias antivirais e/ou imunomodulatórias, que possam prevenir o desenvolvimento de formas graves da dengue.

3. OBJETIVOS:

3.1 – Objetivo Principal:

Estudar a interação de células dendríticas derivadas de monócitos (mdDC) humanos com diferentes isolados clínicos de vírus da dengue sorotipo 3.

3.2 – Objetivos Específicos:

1. Padronizar as culturas de mdDCs humanas de voluntários saudáveis, objetivando o estudo da interação mdDCs-DENV/3;
2. Padronizar as infecções de mdDCs por DENV/3, determinando a porcentagem de células infectadas;
3. Definir o perfil transcricional de mdDCs infectadas com cepa de DENV/3, utilizando a metodologia de microarranjo de DNA de alta densidade (Human Gene 1.0 stv 1, Affymetrix);
4. Caracterizar o perfil da infecção de mdDCs (porcentagem de células infectadas, progênie viral, apoptose e produção de citocinas/quimiocinas) com isolados de DENV/3;

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 – Culturas de células dendríticas derivadas de monócitos:

Células dendríticas derivadas de monócitos (mdDCs) foram obtidas utilizando-se sangue periférico (120 mL) de voluntários saudáveis, após consentimento informado, e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (número 514/09). Para tanto, células mononucleares foram separadas pela técnica de gradiente de densidade utilizando-se o reagente *Lymphocyte Separation Medium* (Lonza, Walkersville, USA), e destas, foi isolada a população de células CD14+, utilizando-se o método de imuno-classificação magnética por *beads* metálicos revestidos com anticorpos contra CD14 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), de acordo com as recomendações do fabricante. Estas células CD14+ foram cultivadas por 6-7 dias em meio RPMI 1640 contendo 100 ng/mL de Interleucina-4 (IL-4) e 50 ng/mL Fator Estimulante de Colônias de Monócitos e Granulócitos (GM-CSF; PeproTech, Rocky Hill, NJ), 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de Penicilina, 100 µg/mL Estreptomicina e 2 mM de L-Glutamina (reagentes da marca Gibco-BRL, Grand Island, NY), realizando uma troca de meio no dia 3^o-4^o de cultivo. Após este período, as culturas foram avaliadas para determinar o fenótipo de mdDCs utilizando a técnica de citometria de fluxo (FACSCalibur, Benton Dickson – BD), para tanto, foram utilizados seis marcadores de superfície distintos: CD14, CD1a, CD11b, CD11c, CD209 e HLA-DR. A escolha destes marcadores foi baseada em publicações anteriores de (BELASIO, *et al.*, 2009; DAVIS, *et al.*, 2006; ESLAHPAZIR, *et al.*, 2008; GUERRA, *et al.*, 2007; RELLOSO, *et al.*, 2002; SUBRAMANYA. *et al.*, 2010).

4.2 – Isolamento viral e sequenciamento de nucleotídeos:

O vírus PAR DENV/3/5532-07 (DENV/3/5532) utilizado neste estudo foi isolado de um caso fatal de febre da dengue aguda primária com complicações hepáticas e cardíacas na cidade de Lambaré, região metropolitana Assunção, Paraguai, durante a epidemia de 2007. Já o vírus BR DENV/3/290-02 (DENV/3/290) foi isolado de um caso não fatal de febre da dengue primária ocorrido em 2002, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. As partículas virais foram isoladas em culturas de células de glândula salivar de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 diretamente do plasma dos pacientes e estes isolados foram passadas 5 vezes (DENV/3/290), e 3 vezes (DENV/3/5532) em culturas de C6/36 antes de iniciarmos o estudo. O sobrenadante das culturas foi titulado por imunodeteccção de focos formados (GOULD & CLEGG, 1985) e usado para infectar as mdDCs.

O sequenciamento nucleotídico completo da cepa DENV/3/5532 foi realizado por nosso grupo, anteriormente a este trabalho, diretamente da reação de PCR pela estratégia de *primer walking* com o kit *Thermo Sequenase* (USB Inc., Ohio) no equipamento ABI 3100 utilizando a metodologia de *BigDye® Terminator* (Applied Biosystems Inc.), seguindo as orientações do fabricante. O pacote de programas *Phred/Phrap/Consed system* (EWING & GREEN, 1998; EWING, *et al.*, 1998; GORDON, *et al.*, 1998; GORDON, *et al.*, 2001) foi utilizado para montar os fragmentos obtidos (bankit1388619). A sequência nucleotídica da cepa DENV/3/290 foi obtida diretamente do banco de dados ENTREZ no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/157418344>).

A comparação entre as sequências nucleotídicas das cepas DENV/3/5532 (bankit1388619) e DENV/3/290 (ENTREZ - EF629369) foi realizada através de alinhamento seguido por edição manual com o uso do programa *BioEdit v7.0.9.0* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). A sequência aminoacídica foi traduzida a partir da sequência nucleotídica utilizando-se os programas *BioEdit* e *MEGA v4.0* (TAMURA, *et al.*, 2007). A predição da estrutura secundária da região 3' do RNA viral foi realizada utilizando-se o programa *mfold* (Zuker, *et al.*, 1999), disponível no servidor *Mobylye@pasteur* (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>).

4.3 – Microarranjo, análises bioinformáticas e PCR quantitativo:

Culturas de mdDCs de dez voluntários saudáveis diferentes foram infectadas com mock ou DENV/3/5532 em MOI de 5 por duas horas na ausência de FBS. O inóculo viral foi removido, as mdDCs foram lavadas e cultivadas em RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, USA) mais 10% de SFB, 100 UI/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Estreptomicina e 2 mM de L-Glutamina (Gibco-BRL, Grand Island, NY). As células foram coletadas em 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção (hpi), e o RNA total foi extraído utilizando-se o kit *RNAasy Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA de cada uma das dez culturas foi misturado (75 µg de cada amostra para análise em *pool*) para a análise da expressão gênica por microarranjo utilizando-se a plataforma *GeneChip, Human Gene 1.0 st v. 1*, da Affymetrix (Santa Clara, CA). Os RNAs foram processados de acordo com as recomendações do fabricante (Affymetrix, Santa Clara, CA) para as etapas de

amplificação, transcrição *in vitro*, purificação, marcação, hibridização e leitura dos *chips* (GeneChip® Scanner 3000).

Os arquivos gerados foram analisados utilizando-se o programa *Expression Console* (Affymetrix, Santa Clara, CA), onde foi possível comprovar a qualidade dos procedimentos realizados. O mesmo programa foi utilizado para realizar a normalização dos dados pelo método de *Robust Multi-Arrays Average* (RMA) descrita por Irizarry e colaboradores em 2003. A razão-logarítmica entre as intensidades de sinal para os *chips* hibridizados com o RNA extraído de mdDCs infectadas com DENV/3/5532 e mock foi calculada, e a lista dos genes diferencialmente expressos foi obtida utilizando-se uma variação mínima do módulo de 2 ou maior. A clusterização dos dados foi realizada pelo programa *Cluster 3.0* utilizando-se a Distância Euclidiana. A ontologia gênica (GO) foi obtida utilizando-se o pacote *Tool for Analysis of Gene Ontology Enrichments* (TANGO) do programa *Expander*, para tanto, foram aceitos os GOs com valores de significância $p \leq 0.05$. As análises das vias gênicas envolvidas foram realizadas com o pacote TANGO e também pela consulta as bases de dados *NCBI Entrez Gene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>) e *Gene Ontology* (www.geneontology.org). Desta forma foi possível definir os padrões de sinalizações celulares e redes metabólicas moduladas durante a infecção das mdDCs pelo DENV/3/5532. Todo o grupo de dados do microarranjo foi depositado na base de dados pública *Gene Expression Omnibus* (GEO), sob o número de registro GSE23986.

Para a confirmação dos dados de microarranjo, utilizando-se a técnica de PCR quantitativo (qPCR), foram escolhidos três genes modulados nas mdDCs infectadas com DENV/5532. Para a realização dos qPCRs, as mdDCs de seis diferentes

voluntários foram infectadas com MOI de 5 utilizando-se o isolado DENV/3/5532. O isolado de DENV/3/290, de um caso não fatal de FD foi utilizado como um controle nos experimentos, além do mock, nos tempos de 24, 48 e 72 hpi. Destas culturas, o RNA total (0,5 pg/ μ L para cada reação) foi extraído com a utilização do kit *RNAesy Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA) de acordo com as recomendações do fabricante, e o cDNA foi obtido utilizando-se iniciadores randômicos (4 pmol/reação) (Lot: 472283) (Invitrogen, Carlsbad, USA) e a enzima transcriptase reversa (1 μ L) por 2h a 42°C grau (Promega, Madison, WI). As reações de PCR foram realizadas com *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystem, Inc.) e 4 pmol/reação dos iniciadores específicos. A ciclagem utilizada foi: 50°C por 2 min, 96°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 96°C por 15 seg., 59°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. A sequência dos iniciadores é mostrada na Tabela 4.1. As curvas de dissociação foram utilizadas para a verificação da especificidade relativa da reação. O gene constitutivo 18S foi utilizado para a realização da normalização e da quantificação das reações de amplificação. A modulação dos genes foi calculada pelo $\Delta\Delta C_t$ como descrito por Fonseca e colaboradores em 2007.

Tabela 4.1: Iniciadores para a reação de qPCR, *gene ID*, sequências, temperatura de anelamento, tamanho do *amplicon* e concentração do cDNA utilizado nas qPCR.

Nome dos iniciadores	<i>Gene ID</i>	<i>Foward sequence</i>	<i>Reverse sequence</i>
IFIT1	3434	GCAAGGACACACCCACAGCTT	GGCAGCCGTTCTGCAGGGTT
OAS2	4939	CAGGGGAGTGGAGTGCCGGA	ACCTGTGGGTTCCGCTGGGT
EIF2AK2	5610	AGCCAGTAGTGGGGCGACTGT	TGAGGCCTGGATGGCCGTTT
18S	100008588	CACGGCCGGTACAGTGAAAC	CCCCTCGGCATGTATTAGCT
Nome dos iniciadores	Temperatura de anelamento	Tamanho do <i>amplicon</i>	Concentração de cDNA
IFIT1	59.0°C	155bp	0.5ng/uL
OAS2	59.0°C	208bp	2.5ng/uL
EIF2AK2	58.0°C	197bp	2.5ng/uL
18S	59.0°C	152bp	0.5ng/uL

4.4 – Infecção, produção de citocinas/quimiocinas e determinação da taxa de apoptose:

Para avaliar diferenças na suscetibilidade das mdDCs à infecção com os dois isolados virais, 4.0×10^5 mdDCs (de quatro diferentes voluntários saudáveis) foram infectadas com MOI de 5 das cepas DENV/3/290, DENV/3/5532 e mock, por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células foram lavadas com meio RPMI 1640 e transferidas para uma placa de 24 orifícios. As mdDCs e o sobrenadante foram recuperadas em 24, 48, e 72 hpi. O sobrenadante foi utilizado para determinar os títulos virais pelo ensaio de imunodeteção de focos formados e para a quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70) e quimiocinas (RANTES, MIG, MCP-1 e IL-10), utilizando-se os kits de *Cytometric Bead Array* (CBA) segundo instruções do fabricante (Becton & Dickinson, San Jose, CA). As células recuperadas foram utilizadas para ensaios de determinação

da porcentagem de células infectadas e de células em apoptose, utilizando-se para isso técnicas de citometria de fluxo.

A técnica de CBA consiste na ligação imunológica entre compostos solúveis no sobrenadante das culturas de mdDCs e anticorpos específicos que recobrem esferas. O sobrenadante foi incubado à temperatura ambiente (TA) por 3 horas às esferas, as quais são conjugadas com fluoróforos. Após este período, as esferas são lavadas e recuperadas em tampão específico. As amostras são então detectadas pela técnica de citometria de fluxo. Dois kits foram utilizados, o *Human Inflammatory Cytokine Kit* (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70) e o *Human Chemokine Kit* (RANTES, MIG, MCP-1 e IL-10) (Becton & Dickinson, San Jose, CA) de acordo com as orientações do fabricante. Ambos os ensaios foram realizados em FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, CA) e os dados foram então analisados utilizando-se o programa FlowJo 7.2.5 (Tree Star, Ashland, OR) para a obtenção das concentrações das diferentes citocinas no sobrenadante de mdDCs infectadas com os diferentes isolados de DENV.

Para determinar o número de mdDCs infectadas, as células foram lavadas em tampão fosfato (PBS) e os receptores de região Fc na superfície celular foram bloqueados com tampão de bloqueio (5% de SFB e 1% de soro humano tipo AB [LONZA, Walkersville, MD, USA]) por 20 minutos à temperatura ambiente (TA). As células foram fixadas e permeabilizadas utilizando-se o kit *Cytofix/Cytoperm* (Becton & Dickinson, San Jose, CA), marcadas com anticorpo monoclonal 4G2 (*Flavivirus*-específico) por 30 minutos a 37°C, lavadas com tampão *Perm/Wash* (Becton & Dickinson, San Jose, CA), e incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário (anticorpo policlonal de burro anti-camundongo conjugado com ficoeritrina, PE [eBioscience, San Diego, AS, USA]). As mdDCs foram lavadas duas vezes com

tampão *Perm/Wash*, recuperadas em PBS e analisadas utilizando-se equipamento FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, CA). Os dados de citometria foram então analisados utilizando-se o programa FlowJo 7.2.5 (Tree Star, Ashland, OR).

A determinação das mdDCs em apoptose foi realizada utilizando-se o kit *Annexin V Apoptosis Detection kit* (Becton & Dickinson, San Jose, CA) de acordo com as recomendações do fabricante. As mdDCs foram recuperadas em 24, 48 e 72 hpi, lavadas uma vez com PBS e recuperadas em tampão de ligação específico do kit, e marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo. Uma amostra de células foi testada em cada ensaio como controle negativo de apoptose anteriormente à infecção. As mdDCs foram analisadas utilizando-se equipamento FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, CA). Os dados de citometria foram então analisados utilizando-se o programa FlowJo 7.2.5 (Tree Star, Ashland, OR). As células foram consideradas em apoptose quando apresentavam o perfil de Anexina V positivo e Iodeto de Propídeo negativo.

4.5 – Papel do TNF- α na infecção de mdDCs e na sobrevivência celular:

Para avaliar o papel do TNF- α nas mdDCs infectadas pelas cepas DENV/3/290, DENV/3/5532 e mock, cinco novas culturas de mdDCs (4.0×10^5 células\ponto) foram infectadas com MOI de 5 ou mock, por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a infecção, às mdDCs foram tratadas com: meio RPMI 1640 (células não tratadas), TNF- α (10 ng/orifício) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anticorpo neutralizante anti-TNF- α (1:250) (eBioscience, San Diego, CA, USA) ou anticorpo anti-GFP como controle isotípico (20 ng/orifício). Após 72 hpi, a porcentagem de células infectadas,

a apoptose (Annexin V +, Iodeto de Propídeo -) e a determinação dos níveis de TNF- α solúvel nos sobrenadantes, foram determinadas por FACS utilizando-se os mesmo protocolos descritos no item 4.4.

4.6 – Papel da replicação viral na infecção de mdDCs:

Para avaliar o papel da replicação viral na produção de citocinas/quimiocinas pelas mdDC assim como na indução à apoptose, 4.0×10^5 células (de cinco voluntários diferentes) foram infectadas com DENV/3/5532, DENV/3/290 (MOI 5) e mock. Adicionalmente, as células foram tratadas (também com MOI 5) com sobrenadantes de culturas de células C6/36 infectadas com DENV/3/5532, DENV/3/290 e mock, inativados por radiação gama (realizada no Centro de Tecnologia de Irradiação – CTR do Instituto de Pesquisas em Energias Nucleares – IPEN/São Paulo/SP pela Dr. Monica Mathor). A inativação viral foi confirmada pela determinação dos títulos virais em sobrenadante de culturas de C6/36 infectados com os vírus inativados.

Para avaliar se a indução da apoptose das mdDCs infectadas com o DENV poderia ser mediado por algum sub-produto secretado durante infecção, mdDCs (três doadores saudáveis) foram tratadas com sobrenadantes inativados de mdDCs infectadas com DENV/3/290, DENV/3/5532 e mock por 72h. A inativação dos sobrenadantes da infecção foi também realizada no Centro de Tecnologia de Irradiação – CTR do Instituto de Pesquisas em Energias Nucleares – IPEN/São Paulo/SP pela Dr. Monica Mathor. A inativação viral foi confirmada como previamente descrito. As mdDCs tratadas com os sobrenadantes inativados e com os vírus nativos

(controles positivos) foram recuperadas após 72 hpi. O sobrenadante foi utilizado para a determinação dos títulos virais e para a quantificação das citocinas/quimiocinas, como descrito anteriormente (como descrito no item 4.4). As mdDCs foram utilizadas para a determinação da porcentagem de infecção e de células em apoptose, como descrito anteriormente (como descrito no item 4.4).

4.7 – Análises Estatísticas:

Todos os dados foram reportados como a média \pm desvio padrão (SD) e foram submetidos à análise de variância utilizando *one-way* ANOVA (quando os experimentos apresentaram apenas uma variável) ou *two-way* ANOVA (quando os experimentos apresentaram mais de uma variável) seguidos por confirmação pelo teste de Bonferroni (STRASSBURGER & BRETZ, 2008). Os níveis de significância foram analisados e estabeleceu-se como significativo $p \leq 0.05$. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism 3.0* (GraphPad Software, San Diego, CA).

5. RESULTADOS:

5.1 – Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados virais:

Aproximadamente 50% dos pacientes que foram a óbito durante uma epidemia de DENV/3 no Paraguai apresentavam manifestações clínicas incomuns (PAHO, 2007). A cepa viral DENV/3/5532 foi isolada de um caso de óbito decorrente de febre da dengue primária clássica, ocorrido na cidade de Lambaré, Paraguai. A paciente de 56 anos apresentava infecção aguda por dengue, confirmada por testes ELISA para detecção de IgM e IgG contra a proteína NS1 do DENV. A paciente apresentou quadro de síndrome de choque no quinto dia após o início dos sintomas, possuindo um valor de 35% de hematócrito além de acidose metabólica. O diagnóstico final foi de infecção primária pelo vírus da dengue associado à miocardite e hepatite (confirmados por imunohistoquímica). A causa da morte foi confirmada como choque cardiogênico (Ministério da Saúde Pública e Bem Estar Social, Assunção, Paraguai). A cepa viral DENV/3/5532 foi confirmada como sendo do sorotipo 3, genótipo III (Sri Lanka), através da determinação de sua sequência nucleotídica.

Outro isolado clínico utilizado neste estudo foi a cepa DENV/3/290 isolada de um caso não fatal de FD (paciente infectado no Rio de Janeiro), sendo também do sorotipo 3, genótipo III. A comparação da sequência de aminoácidos correspondente a região codificadora do genoma das duas cepas estudadas revelou 12 substituições, localizadas nas proteínas prM, C, E, NS2B e NS5 (Tabela 5.1). A comparação entre as sequências nucleotídicas da região 3' UTR das cepas DENV/3/5532 e DENV/3/290 mostrou duas substituições: T(151)G e C(332)T. As mudanças observadas na

estrutura secundária do RNA da região 3' UTR, são mostradas na figura 5.1. Nenhuma diferença foi observada nas proteínas NS1, NS2A, NS3, NS4A e NS4B, e na região 5' UTR.

Tabela 5.1: Substituições aminoacídicas entre as cepas de DENV/3/5532 e DENV/3/290.

Proteína	DENV3/290 x DENV3/5532
C	K(35)R
pre-M	R(86)H
E	T(266)I
	N(302)K*
	H(345)Y*
	E(360)D*
NS1	T(471)I
	H(77)Y
NS2b	I(93)T
	I(105)V
NS5	L(27)R
	I(50)T
	V(181)I
	N(835)D

*Mutações localizadas no domínio III da proteína E (MODIS, *et al.*, 2003 e 2005).

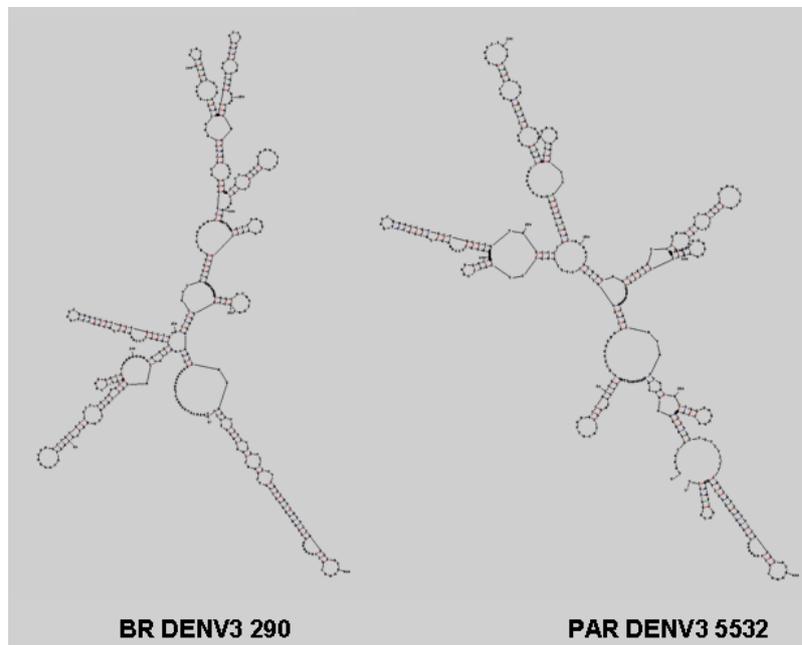


Figura 5.1: Estrutura secundária do RNA da região 3' UTR das cepas DENV/3/5532 e DENV/3/290. A predição da estrutura secundária do RNA foi realizada utilizando-se o programa *mfold* (Zuker et al, 1999), disponível no servidor Mobylye@pasteur (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>).

5.2 – Expressão gênica diferencial de mdDCs infectadas com DENV/3/5532:

As DCs são um dos primeiros e mais importantes alvos para a infecção do DENV em humanos (WU, *et al.*, 2000), e representam uma das mais importantes células apresentadoras de antígeno, estabelecendo uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa (NAVARRO-SÁNCHEZ, *et al.*, 2005). Visando caracterizar o fenótipo das células dendríticas derivadas de monócitos humanos (mdDCs) foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. A identificação fenotípica das mdDCs foi realizada com os seguintes marcadores de superfície: CD14(-), CD11b(+), CD11c(+), CD209(+) e HLA-DR(+). A figura 5.2 apresenta a média da expressão dos marcadores em sete culturas de mdDCs provenientes de doadores voluntários distintos. Os dados obtidos demonstraram que mais de 90% das células em cultura foram positivas para os marcadores testados, excetuando CD14, onde a positividade média foi de menos de 15%. Os resultados confirmaram a diferenciação dos monócitos em células dendríticas, a pureza das culturas, além da eficiência do protocolo utilizado para a obtenção das mdDCs.

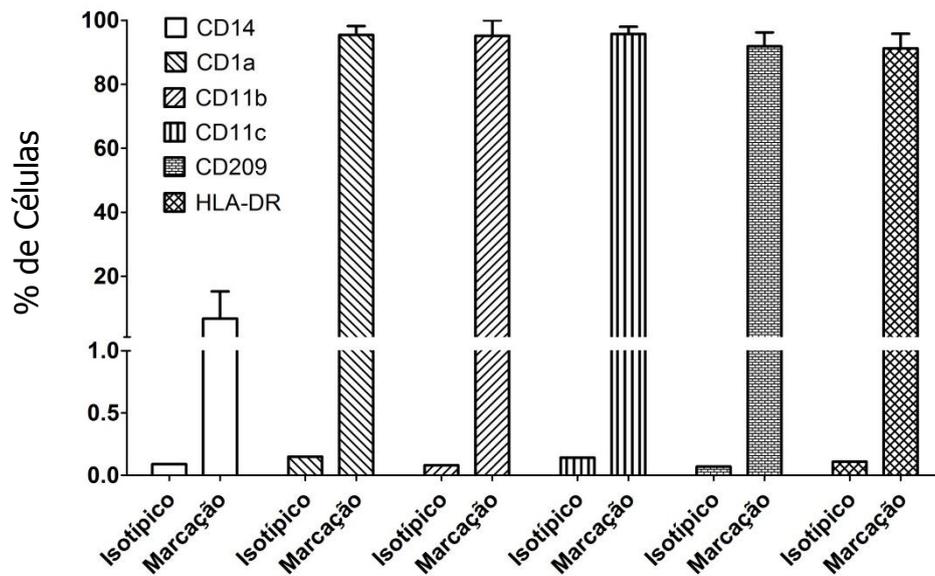


Figura 5.2: Expressão de marcadores moleculares de superfície em culturas de mdDCs. Controle isotípico e marcações com CD14 (-), CD1a (+), CD11b (+), CD11c (+), CD209 (+) e HLA-DR (+). Os valores são representados como a média \pm o desvio padrão de sete culturas de mdDCs diferentes.

Uma vez comprovada a eficiência do protocolo de obtenção das mdDCs, a próxima etapa foi a caracterização do processo de infecção das células pelo DENV/3. Para comprovar que as células infectadas eram realmente as dendríticas, realizamos a co-marcação CD11c+/DEN a partir de três culturas de células distintas. Todas as células reveladas positivas para a infecção com DENV/3/5532 e DENV/3/290, também eram positivas para o marcador de superfície de DCs, CD11c, demonstrando que as células infectadas eram mdDCs (Figura 5.3).

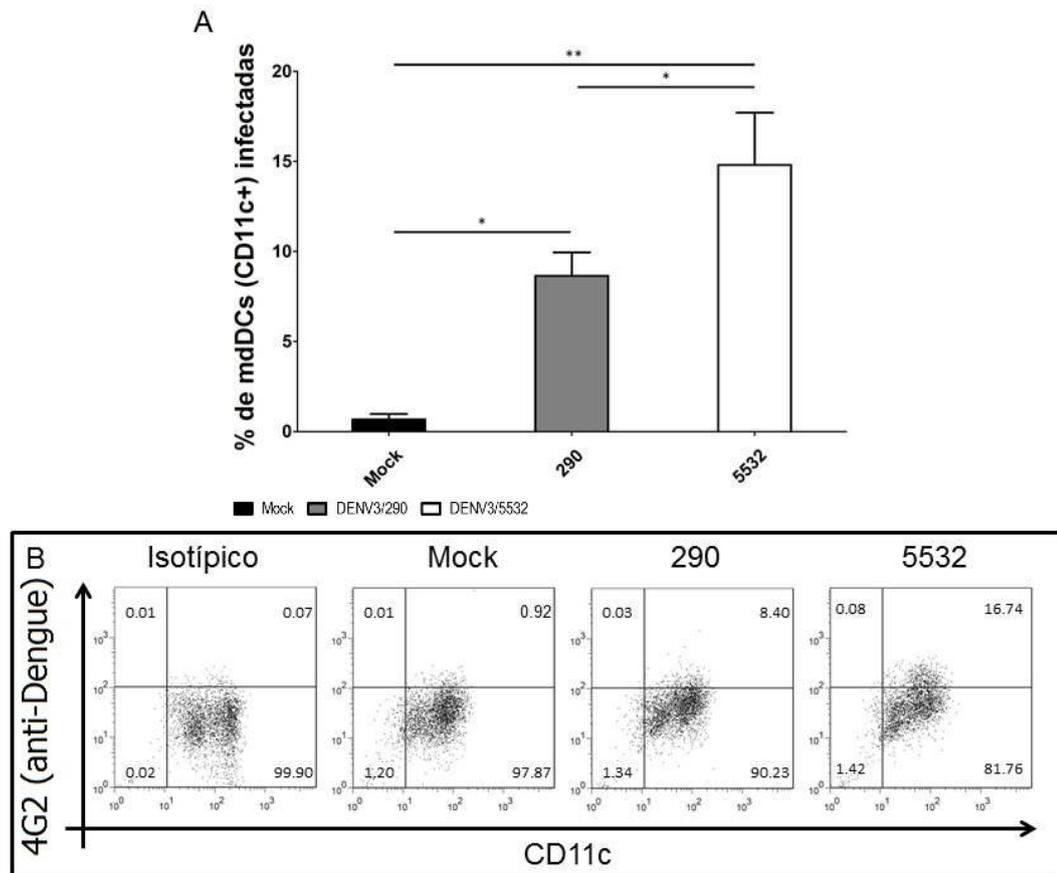


Figura 5.3: Co-marcação de superfície para mdDCs e DENV analisado por citometria de fluxo em 72hpi. (A) As mdDCs marcadas por anticorpos anti-CD11c (conjugado com FITC) e com anticorpo monoclonal anti-*Flavivirus* específico, 4G2, seguido de anticorpo de burro anti-camundongo conjugado com PE. Os dados foram analisados utilizando-se o *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e os resultados são mostrados como a média \pm desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. DENV/3/5532 (barra branca), DENV/3/290 (barra cinza) e mock (barra preta). (B) Gráficos de *dot plot* demonstrando a comarcação com CD11c e dengue (4G2) por FACS. * = $p < 0.05$ e ** = $p < 0.01$.

Com a finalidade de se determinar a modulação da expressão gênica das mdDCs em resposta à infecção pelo DENV/3, culturas de mdDC de dez voluntários saudáveis foram infectadas a um MOI de 5 com o isolado DENV/3/5532, além do mock, por 6, 12, 24 e 48 hpi. Posteriormente, as culturas foram processadas para a extração do RNA total, que foi utilizado (em *pool*) para as análises utilizando microarranjos de DNA de alta densidade representando a totalidade do genoma humano. Neste ensaio, não foi utilizada a cepa DENV/3/290, pois o intuito do experimento era determinar a modulação gênica diferencial nas mdDCs infectadas

por uma cepa isolada de um caso fatal apenas. Outros exemplos de modulação da expressão gênica de casos não fatais já foi bem caracterizado (BECERRA, *et al.*, 2009; FINK, *et al.*, 2007; SIMMONS, *et al.*, 2007; UBOL, *et al.*, 2008; WARKE, *et al.*, 2003). A Figura 5.4 mostra os resultados da média das intensidades relativas após a normalização pela técnica de RMA. Este resultado demonstra a eficácia do protocolo utilizado na elaboração do experimento de microarranjo, bem como, a homogeneidade das intensidades dos sinais, permitindo então que os *chips* pudessem ser comparados entre si, para se identificar os genes modulados durante a infecção.

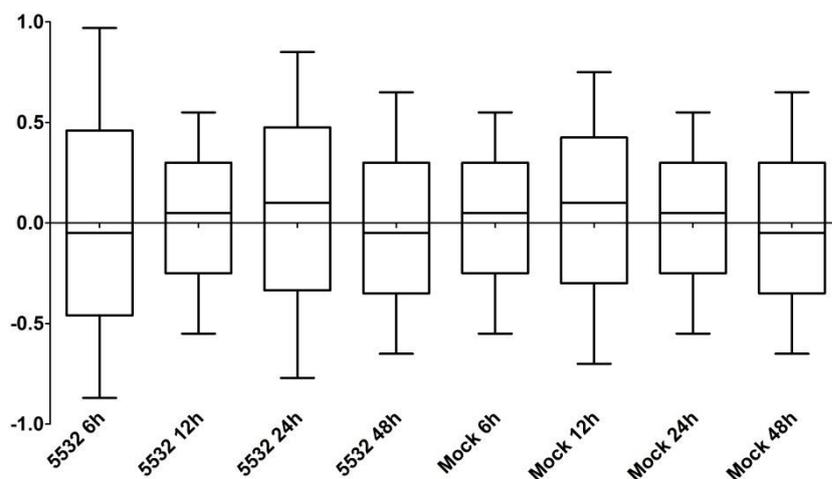


Figura 5.4: *Box plot* da média relativa da intensidade de sinal das probes em cada condição de análise, após a normalização pelo método de RMA.

A análise dos microarranjos revelou uma regulação positiva (*up-regulation*) de 96 genes com variação em escala logarítmica (*fold change*) ≥ 2 vezes, e uma regulação negativa (*down-regulation*) de 28 genes com a mesma variação, em um total de 124 genes modulados (Figura 5.5A). Análises da ontologia gênica classificaram estes genes nas seguintes categorias: resposta imune ($n=46$, $p < 0.05$); atividade catalítica ($n=7$, $p \geq 0.05$ = não-estatístico [NS]); adesão celular ($n=6$, NS);

proliferação celular (n=5, NS); outras funções (n=29, NS) e sem classificação prévia (n=31, NS). Uma análise mais específica na funcionalidade dos genes modulados pela infecção mostrou: resposta a vírus (n=26, $p \leq 0.05$); ligação a ATP (n=7, $p \leq 0.05$); resposta inflamatória (n=5, $p \leq 0.05$); atividade hidrolase (n=4, NS); ligação a motivos de dedos de zinco (n=3, NS); outras funções (n=37, NS) e sem classificação prévia (n=42, NS). Os principais processos biológicos relacionados aos genes modulados foram os de resposta imune inata (n=8, $p \leq 0.05$); reação de oxidação (n=3, NS) e quimiotaxia (n=3, NS) (Figura 5.5B). Uma lista completa com as ontologias gênicas, intensidades de sinal, nome e siglas dos genes modulados está presente no Anexo (Tabela 10.1).

Com o intuito de se validar biologicamente os resultados observados nos microarranjos, três dos genes modulados foram analisados pela técnica de qPCR. Para tanto, seis novas culturas de mdDCs foram infectadas com DENV/3/5532 e mock, como descrito em Materiais e Métodos. Adicionalmente, inserimos no estudo a cepa DENV/3/290, como referência de um vírus isolado de um caso não-fatal de dengue clássica, para fins comparativos. Nos tempos de 24, 48 e 72 hpi, o perfil de transcrição dos genes OAS2 (2'-5'-oligoadenilato sintetase 2), EIF2KA2 (proteína quinase dependente de RNA) e IFIT1 (proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeos 1) foram analisados por qPCR. Os resultados confirmaram os dados obtidos pelos experimentos de microarranjo durante a infecção das mdDCs pelos DENV/3/5532 (Figura 5.5C), tendo sido demonstrado uma modulação estatisticamente significativa nos genes analisados, quando comparadas as células infectadas contra o mock, em todos os tempos. Foi demonstrado ainda que a cepa DENV/3/290 não foi capaz de modular a expressão dos genes EIF2KA2 e

IFIT1 de forma significativa, quando comparada ao mock. Além disso, a comparação da modulação da expressão gênica entre as duas cepas de DENV/3 revelou que apenas o gene IFIT1 foi diferencialmente modulado nos tempos de 24 e 48 hpi (Figura 5.5C). As diferenças observadas entre a transcrição dos genes testados por qPCR nas células infectadas pelas duas cepas, podem ser explicadas pela presença das substituições aminoacídicas entre as duas cepas mapeadas nas proteínas NS2B e NS5 (Tabela 5.1), que podem interferir na regulação da via JAK/STAT – (ASHOUR, *et al.*, 2009; ASHOUR, *et al.*, 2010) ou na proteína NS3 alterando a atividade da serina protease – NS2B (SALAEMAE, *et al.*, 2010).

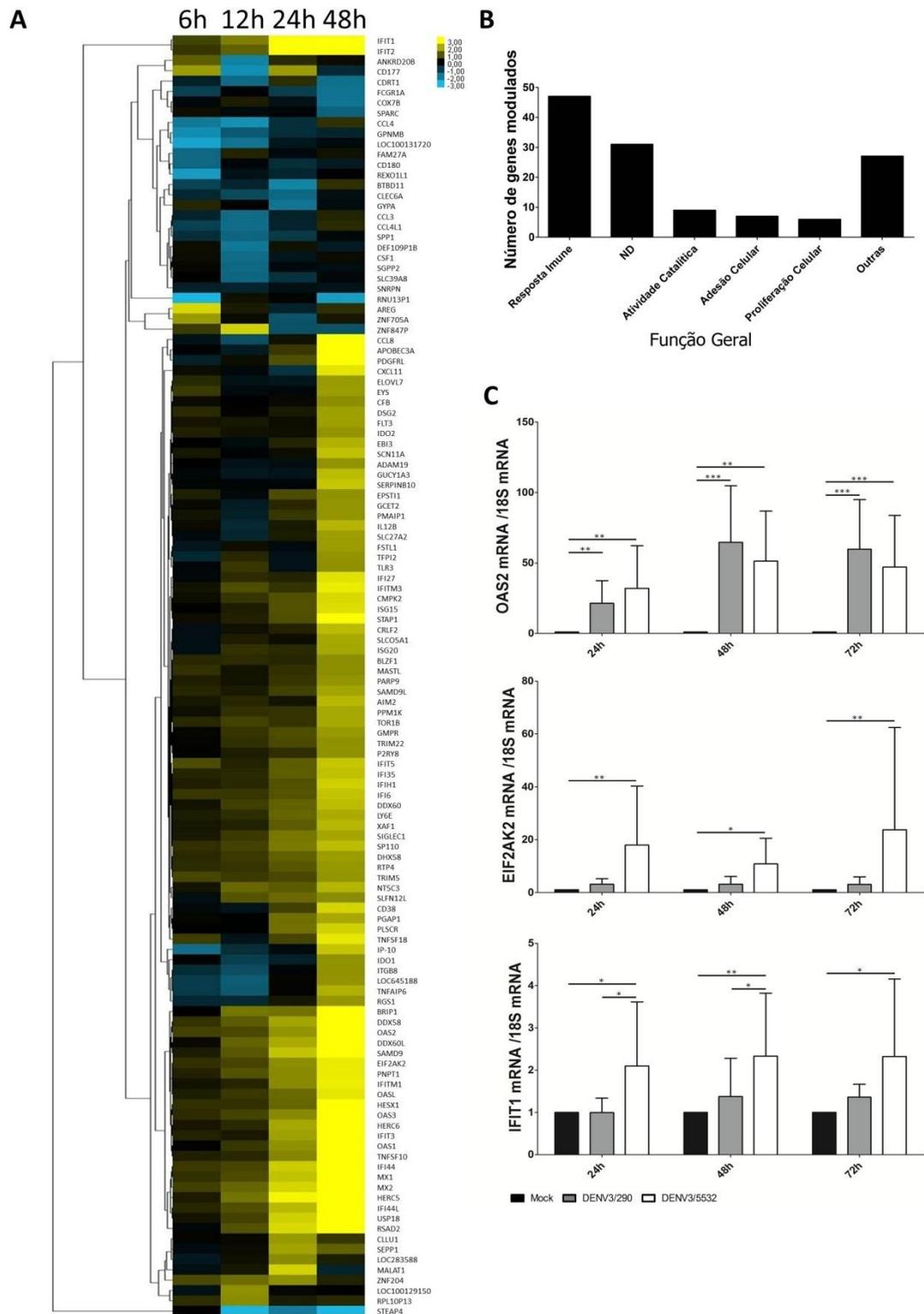


Figura 5.5: (A) Clusterização hierárquica (Distância Euclidiana) dos 124 genes modulados nas mdDCs infectadas com a cepa DENV/3/5532 (genes *up-regulated* em amarelo e genes *down-regulated* em azul). (B) Anotação funcional dos 124 genes obtida pelo programa *Expander*, banco de dados *NCBI Entrez Gene* e banco de dados *Gene Ontology*. (C) Análises por qPCR dos genes para OAS2, IFIT1 e EIF2AK2 em mdDCs, após a infecção com DENV/3/5532 (barras brancas), DENV/3/290 (barras cinza) e mock (barras pretas). Os dados foram analisados utilizando-se *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Valores são expressos pela média \pm desvio padrão (SD) de seis diferentes experimentos. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ e *** = $p \leq 0.001$

Os resultados apontam que uma das vias gênicas mais fortemente modulada nas mdDCs infectadas é a de ativação de interferon, a qual pode influenciar diretamente o processo de infecção. Os experimentos subsequentes visaram determinar outros parâmetros biológicos (porcentagem de células infectadas, progênie viral, porcentagem de células apoptóticas e produção de citocinas/quimiocinas) durante o curso da infecção das mdDCs pelos diferentes isolados de DENV/3.

5.3 – Análise comparativa da susceptibilidade de mdDCs à infecção e indução à apoptose:

Foi demonstrado que a capacidade do DENV em replicar-se em células humanas está diretamente relacionada com a cepa, evidenciando o papel do vírus na patogenia da dengue (HALSTEAD, 1998). A Figure 5.6A demonstra que as mdDCs são mais permissíveis à infecção pela cepa DENV/3/5532 quando comparada a DENV/3/290, em 72 hpi ($p < 0.01$). Para determinar se esta maior porcentagem de células infectadas resulta em uma maior produção de partículas virais infectantes, o título viral no sobrenadante das culturas de mdDCs foi determinado (Figure 5.6B). Apesar da diferença de aproximadamente 0.5-1.0 Log₁₀ no título da progênie viral observado entre as duas cepas analisadas (Figure 5.6B), não havia significância estatística.

A indução de apoptose deflagrada durante a infecção pelos *Flavivírus* contribui para as manifestações fisiopatológicas observadas durante a infecção *in vitro*

(COURAGEOT, *et al.*, 2003). Visando determinar se existia diferença na indução de apoptose durante a infecção das mdDCs pelas duas cepas estudadas, culturas de células de quatro voluntários saudáveis foram infectadas com MOI de 5 com as cepas DENV/3/5532, DENV/3/290 e mock. A indução da apoptose foi analisada pela marcação de Anexina-V e Iodeto de Propídeo, nos tempos de 24, 48 e 72 hpi. Como mostrado na Figura 5.6C, a cepa DENV/3/5532 induziu apoptose em um maior número de células em 72 hpi, quando comparada à cepa DENV/3/290 ($p < 0.01$) e ao mock ($p < 0.05$). Nenhuma diferença na indução de apoptose foi observada em 24 e 48 hpi para a infecção pelas duas cepas.

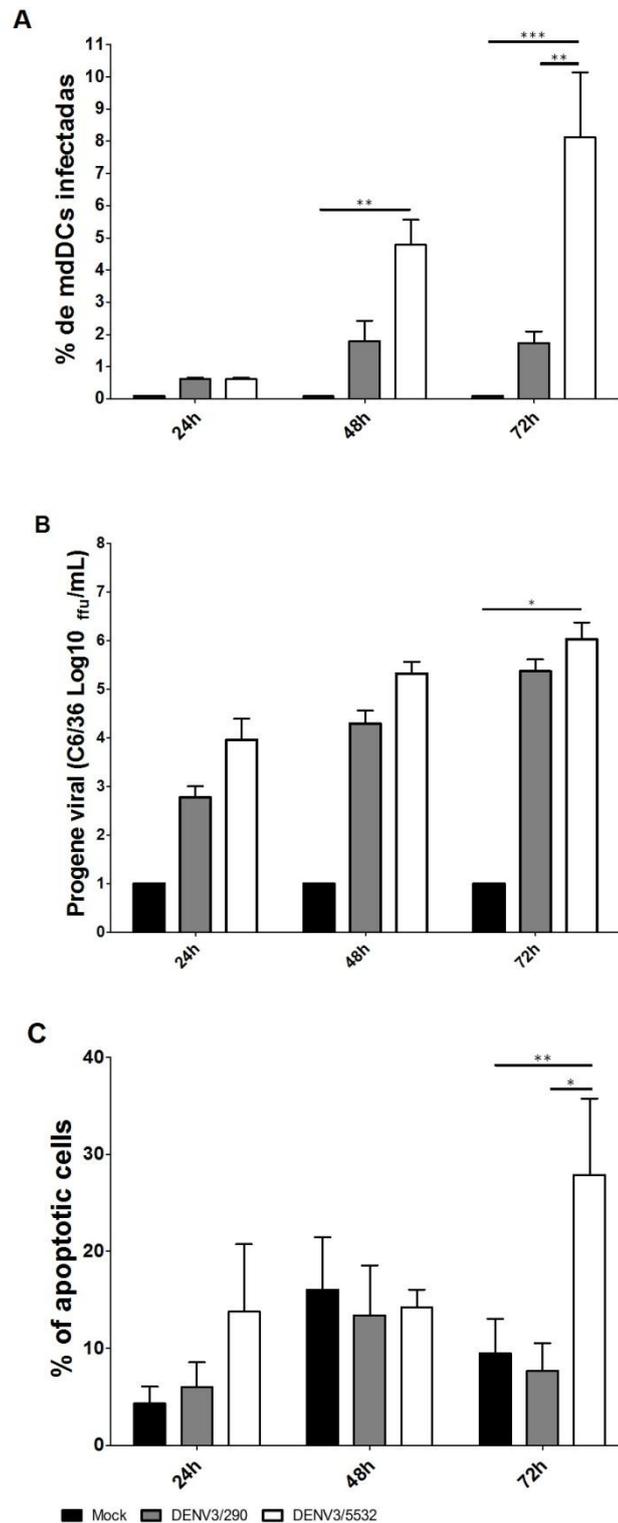


Figura 5.6: Porcentagem de células infectadas, progênie viral e células em processo de apoptose após infecção com DENV3/290, DENV3/5532 ou mock. (A) Porcentagem de mdDCs infectadas. (B) Progênie viral no sobrenadante das culturas de mdDCs. Os resultados da progênie viral são expressos in Log₁₀ das unidades formadoras de foco (ffu) em células C6/36/mL. (C) Porcentagem de células em apoptose. As mdDCs foram avaliadas para a positividade na marcação com Anexina-V utilizando-se citometria de fluxo. Os dados foram analisados utilizando-se *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Valores são expressos pela media \pm desvio padrão (SD) de quatro diferentes experimentos. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ e *** = $p \leq 0.001$.

No intuito de determinar qual seria o nível de mediadores inflamatórios produzidos pelas culturas de mdDCs durante a infecção com as diferentes cepas de dengue, foram realizados os ensaios de quantificação de citocinas/quimiocinas no sobrenadante das culturas de mdDCs infectadas.

5.4 – Determinação da produção de citocinas/quimiocinas pelas mdDCs infectadas por DENV/3:

Acredita-se que a produção de citocinas/quimiocinas pelas células do sistema imunológico após a infecção pelo DENV tenha um papel importante no desenvolvimento das manifestações hemorrágicas da doença, afetando as células vasculares endoteliais e causando extravasamento de fluídos e proteínas (PANG, *et al.*, 2007). Em nossos experimentos, foram avaliados os níveis de seis citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL12p70 e IL-10) e quatro quimiocinas (RANTES, IP-10, MIG e MCP-1), importantes mediadores inflamatórios, em mdDCs infectadas com DENV/3/5532, DEV3/290 e mock, nos tempos de 24, 48 e 72 hpi. Foi possível demonstrar que mdDCs infectadas com DENV/3/5532 produzem maior quantidade de TNF- α ($p < 0.05$) e IL-6 ($p < 0.05$) em 72 hpi (Figura 5.7), quando comparada a infecção com DENV/3/290 e mock. Ainda, as mdDCs infectadas com o DENV/3/5532 foram capazes de produzir IL-8 mais intensamente do que as mdDCs infectadas com mock, em 72 hpi. Adicionalmente, a infecção com a cepa DENV/3/290 induziu a expressão de TNF- α /IL-6/IL-8 em baixos níveis quando comparado ao mock (não estatisticamente significativo; Figura 5.7). Nenhuma

diferença na expressão de IL-10, IL12p70 e IL-1 β foi observada em nenhuma das condições de infecção.

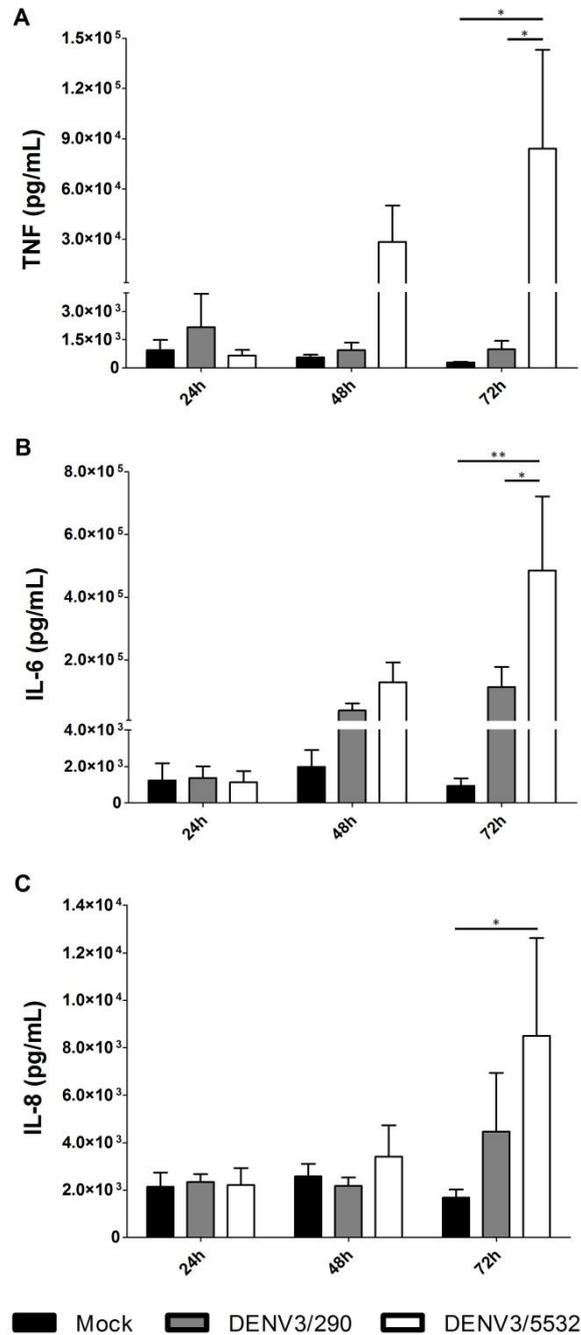


Figura 5.7: Níveis de (A) TNF- α , (B) IL-6 e (C) IL-8 no sobrenadante de mdDCs infectadas com DENV/3/5532, DENV/3/290 e mock. Podem ser observados níveis mais elevados de TNF- α e IL-6 no sobrenadante das culturas de mdDCs infectadas com DENV/3/5532 quando comparadas com DENV/3/290 e mock em 72 hpi. DENV/3/5532 (barras brancas), DENV/3/290 (barras cinza) e mock (barras pretas). Os dados foram analisados utilizando-se *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Valores são expressos (pg/mL) pela media \pm desvio padrão (SD) de quatro culturas diferentes. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$.

Os experimentos para se dosar os níveis de IP-10, MCP-1, MIG e RANTES solúveis no sobrenadante das culturas de mdDCs, mostraram que estas quimiocinas estão elevadas para as duas cepas testadas, sem diferença estatística entre elas, em 24, 48 e 72 hpi. Em adição, os níveis de IP-10 nas culturas infectadas com ambas as cepas, eram mais elevados quando comparados ao mock em 48 hpi e 72 hpi. Os níveis de MCP-1, MIG e RANTES se encontravam mais elevados na infecção com a cepa DENV/3/5532 em relação ao mock nos pontos de 48 e 72 hpi (Figura 5.8). Portanto, os dados mostram que a cepa DENV/3/5532 estimula especificamente a produção de citocinas (TNF- α e IL-6), e que ambas as cepas induziram a produção de IP-10, quando comparadas ao mock. Conjuntamente, estes resultados sugerem uma estimulação dos mediadores pró-inflamatórios na infecção das mdDCs pelos DENV/3, em especial, para a cepa DENV/3/5532.

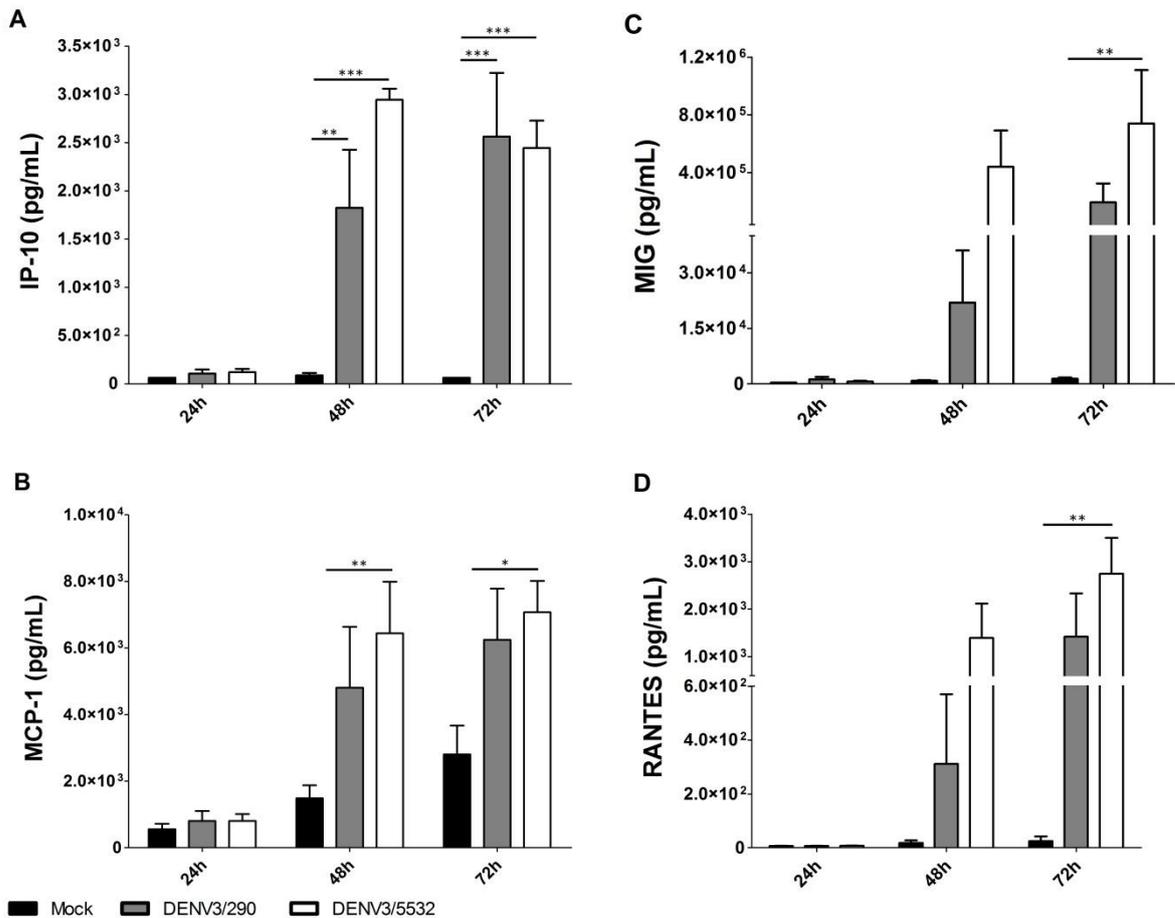


Figura 5.8: Perfil de produção de quimiocinas pelas mdDCs infectadas com DENV/3/5532 (barras brancas), DENV/3/290 (barras cinza) e mock (barras pretas) em 24, 48 e 72hpi. Os níveis de IP-10 (A), MCP-1 (B), MIG (C) e RANTES (D) foram mensurados nos sobrenadantes de mdDCs infectadas utilizando-se o kit CBA e estão expressos em pg/mL. Os dados foram analisados utilizando-se *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Valores são expressos pela média \pm desvio padrão (SD) de quatro experimentos diferentes. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ e *** $p = < 0.001$.

5.5 – Análise do papel do TNF- α durante a infecção e na indução de apoptose *in vitro* em mdDCs infectadas com os diferentes isolados de DENV/3:

Os experimentos anteriores mostraram que as mdDCs infectadas produzem elevados níveis de TNF- α e são induzidas ao processo de apoptose, ambos de forma mais significativa nas culturas infectadas com a cepa DENV/3/5532 (Figura 5.6C e Figura 5.7A). TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória que induz a apoptose

de células endoteliais, contribuindo para a patogenia da DHF (CARDIER, *et al.*, 2005). Desta forma, visando avaliar o papel do TNF- α no curso da infecção e na indução de apoptose de mdDCs infectadas pelas cepas de DENV/3, realizamos os experimentos com suplementação ou bloqueio do TNF- α nas culturas (Figura 5.9; ver material e métodos, item 4.5).

Inicialmente foi avaliado se a adição ou bloqueio do TNF- α logo após a infecção iria alterar os níveis de apoptose das mdDCs. Os resultados indicam que o bloqueio do TNF- α , com anticorpo neutralizante (barra branca, Figura 5.9B) causa uma elevação na porcentagem de células em apoptose no curso da infecção com ambas as cepas virais. Não detectada alteração nas mdDCs infectadas com mock, comprovando que o efeito é dependente da associação do TNF- α com a replicação viral. A Figura 5.9B mostra que, quando as mdDCs são infectadas com a cepa DENV/3/290, e tratadas com TNF- α (barra cinza, Figura 5.9B) a porcentagem de células em apoptose permanece em níveis semelhantes à infecção sem o tratamento ou ainda ao controle isotópico. Quando as mdDCs são infectadas com a cepa DENV/3/5532 ocorre, após a adição do TNF- α , uma redução nos níveis de apoptose. Finalmente, os dados permitem concluir que existe um papel regulador (protetor) do TNF- α na sobrevivência de mdDCs infectadas com DENV/3.

Adicionalmente, foi determinado o número de células infectadas nas diferentes condições experimentais, sendo possível demonstrar que, independente do tratamento utilizado (Figura 5.9A), a porcentagem de mdDCs infectadas com mock ou com a cepa DENV/3/290 não foi alterada. Já no caso da infecção de mdDCs com a cepa viral DENV/3/5532, podemos observar que a adição de TNF- α à cultura (barra cinza) aumentou a porcentagem de células infectadas, quando comparado as demais

condições: Não tratadas, bloqueio de TNF- α e adição de anticorpo isotípico (Figura 5.9A). A Figura 5.9C mostra a dosagem de TNF- α no sobrenadante das culturas de mdDCs, comprovando a efetividade dos tratamentos (adição e bloqueio do TNF- α) utilizados no experimento.

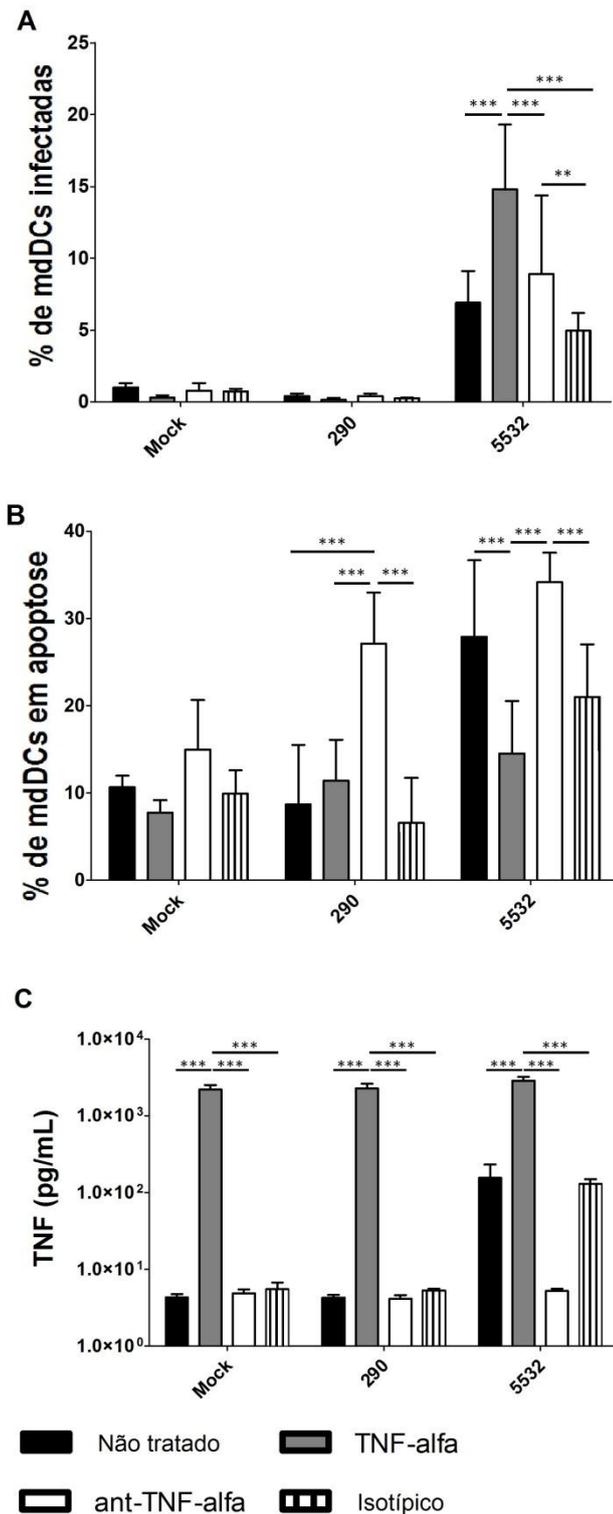


Figure 5.9: Papel do tratamento com o TNF- α na porcentagem de mdDCs infectadas e na indução do processo de apoptose. (A) Porcentagem de células em apoptose, (B) células infectadas e (C) níveis de TNF- α (pg/mL) no sobrenadante das culturas, após 72 hpi com mock, DENV/3/290 e DENV/3/5532. As culturas foram tratadas por 72 horas com: meio RPMI-1640 (barra preta), adição de TNF- α (10 ng/poço; barra cinza), bloqueio com anticorpo anti-TNF- α (barra branca) e controle isotípico (barra branca com linhas), logo após a infecção. Os dados foram analisados utilizando-se *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Valores são expressos pela média \pm desvio padrão (SD) de cinco experimentos diferentes. ** = $p \leq 0.01$ e *** = $p < 0.001$.

Uma vez demonstrado que as células são induzidas à produção de citocinas/quimiocinas pela infecção do DENV/3, avaliou-se o papel da replicação viral neste processo, bem como, na indução da apoptose das mdDCs *in vitro*.

5.6 – Determinação do papel da replicação viral na indução de apoptose e produção de citocinas/quimiocinas em mdDCs infectadas com DENV/3:

O nível de replicação viral é um importante fator no desenvolvimento da FHD (WARKE *et al.*, 2003). Libraty e colaboradores em 2002 demonstraram que os níveis de proteína NS1 solúvel (sNS1), e de partículas virais encontrados no sangue periférico de crianças com infecção pelo DENV, é maior em pacientes que desenvolvem manifestações hemorrágicas da doença. Visando determinar se a replicação viral exerce influencia na indução de apoptose, e na produção de citocinas/quimiocinas pelas mdDCs, culturas de células de cinco voluntários saudáveis foram infectadas com as cepas DENV/3/5532 e DENV/3/290 nativos, bem como, amostras dos mesmos vírus inativados por radiação gama, e mock. A inativação foi comprovada pela análise da porcentagem de mdDCs infectadas (Figura 5.10A), e determinação da progênie viral (Figura 5.10B) para os vírus nativos e inativados. A Figura 5.10C mostra os resultados de indução de apoptose, que confirmaram que nas culturas de mdDCs infectadas pelo vírus DENV/3/5532 nativo a morte celular é significativamente maior do que a observada com o respectivo vírus inativado, e também com a cepa DENV/3/290 e mock.

As Figuras 5.10D, 5.10E e 5.10F, mostram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α /IL-6/IL-8, respectivamente) são significativamente mais elevados nos sobrenadantes das culturas de mdDCs infectadas pelo vírus DENV/3/5532, do que nas infectadas por mock ou DENV/3/290, confirmando os dados já observados anteriormente (Figura 5.7). O resultado relacionado à produção de IL-8 é conflitante com os dados apresentados na Figura 5.7C. Esta discordância foi anteriormente descrita na literatura (RODRIGUEZ-MADOZ, *et al.*, 2010; BECERRA, *et al.*, 2009), considerando que a produção de citocinas pode apresentar pequenas variações, além disso, nos experimentos comparados foram utilizadas culturas de mdDCs provenientes de doadores diferentes. Em relação à dosagem das três citocinas, TNF- α , IL-6 e IL-8 (Figuras 5.10D, 5.10E e 5.10F), foi possível observar que, quando as culturas de mdDCs são tratadas com os sobrenadantes inativados, a produção é significativamente menor (semelhante ao mock) do que quando comparada a produção das células infectadas com os mesmos vírus nativos (com capacidade replicativa).

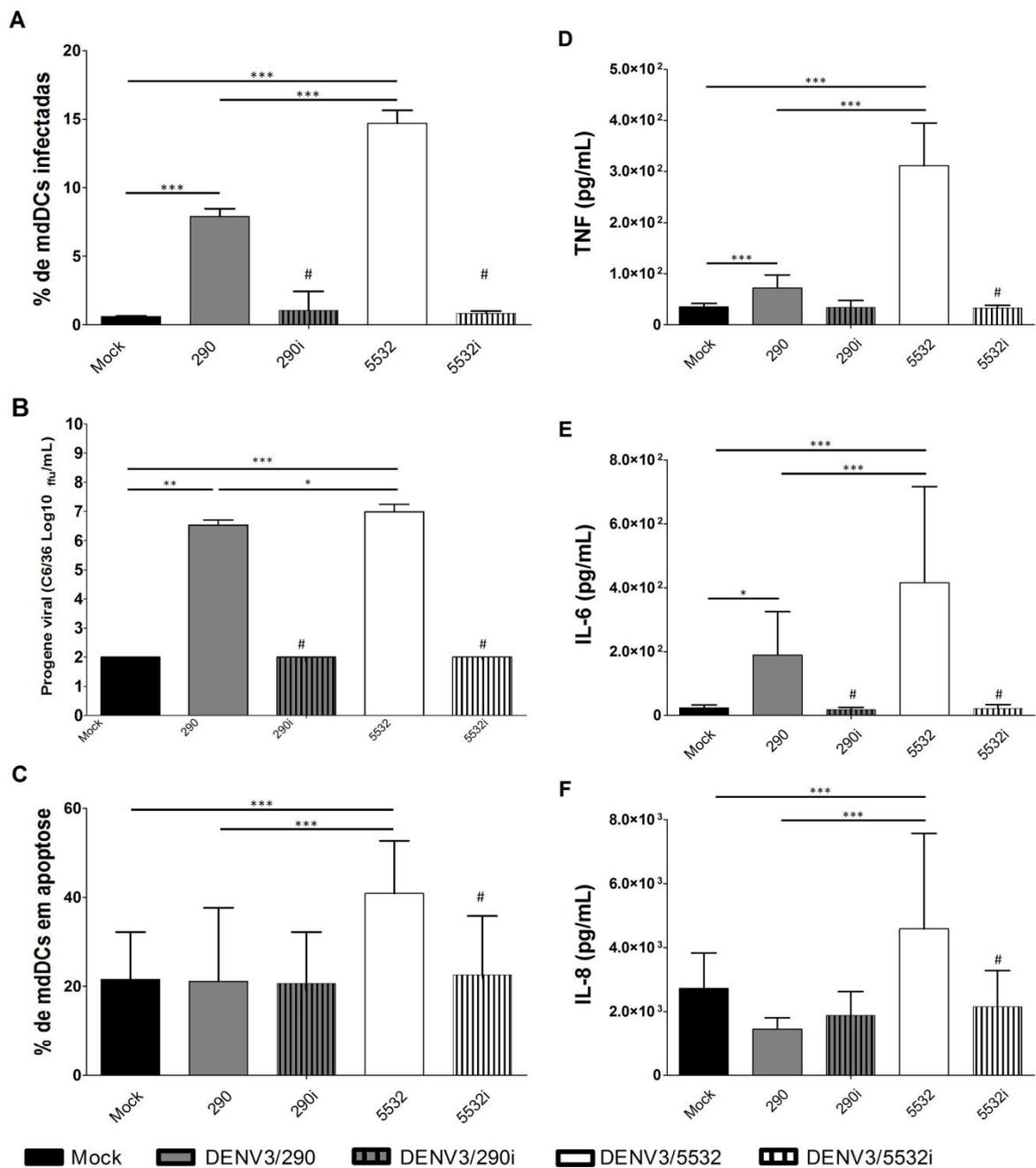


Figure 5.10: Papel da replicação do DENV/3 na indução de apoptose e na secreção de citocinas pelas mdDCs. (A) Porcentagem de células infectadas, (B) progênie viral, (C) células em apoptose e níveis de secreção de (D) TNF- α , (E) IL-6 e (F) IL-8, em 72 hpi com mock (barra preta), DENV/3/290 (barra cinza), DENV/3/290 inativado (barra cinza com linhas), DENV/3/5532 (barra branca) ou DENV/3/5532 inativado (barra branca com linhas). Os dados foram analisados utilizando-se *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Valores são expressos pela média \pm desvio padrão (SD) de cinco diferentes experimentos. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ e *** $p < 0.001$. # = $p \leq 0.05$ comparando a infecção com os vírus nativos e inativados. Os valores de citocinas foram expressos em pg/mL.

Outro parâmetro analisado nas culturas de mdDCs infectadas e tratadas com sobrenadantes inativados, foi a produção de quimiocinas (IP-10 [5.11A], MCP-1

[5.11B], MIG [5.11C] e RANTES [5.11D]). Os dados obtidos comprovaram que apenas as mdDCs infectadas com as cepas virais com capacidade replicativa (nativos) induziram a produção das quimionas testadas, ao contrário da infecção com os mesmos vírus inativados. Analisados conjuntamente, os experimentos com vírus inativados permitiram concluir que a replicação viral é essencial para a indução da apoptose, a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α /IL-6/IL-8) (Figura 5.10) e quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIG e IP-10) (Figura 5.11).

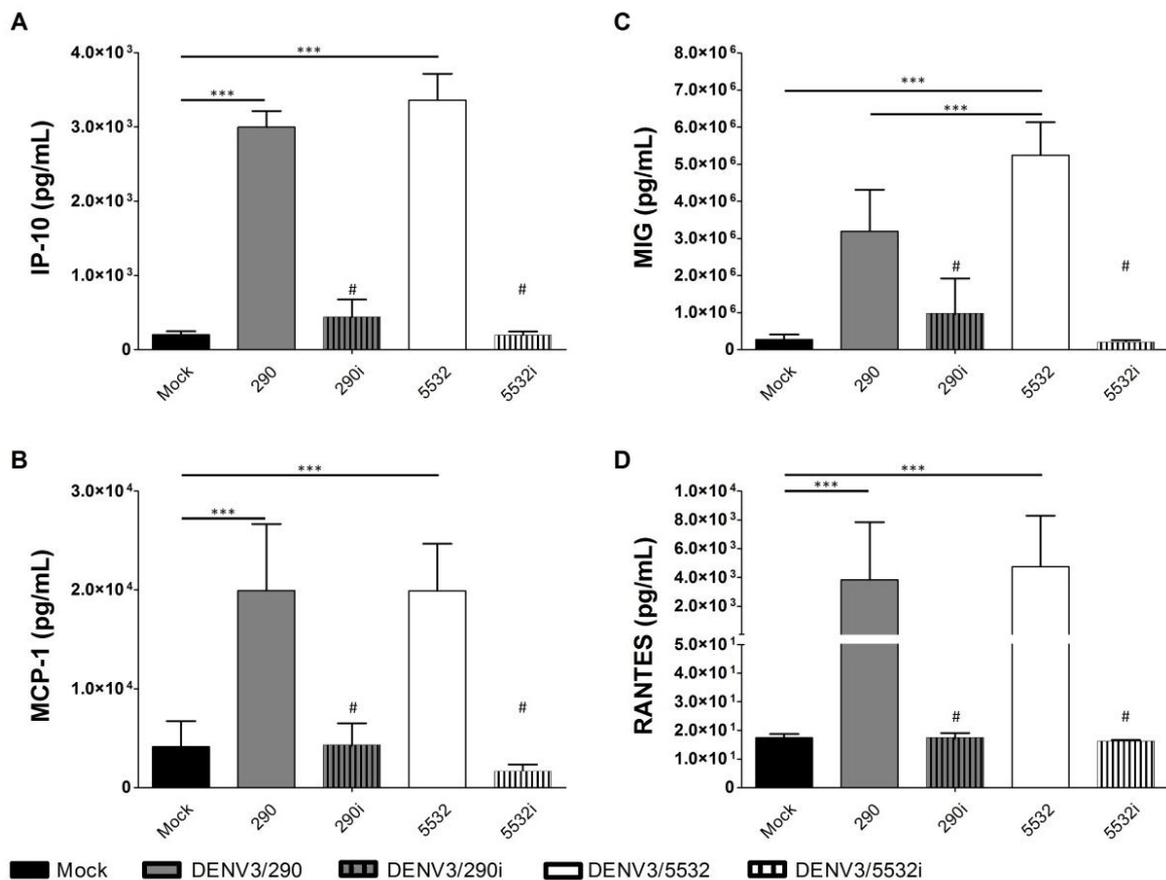


Figura 5.11: Perfil de produção de quimiocinas pelas mdDCs infectadas com cepas nativas e inativas de DENV/3. Níveis de (A) IP-10, (B) MCP-1, (C) MIG e (D) RANTES, em 72 hpi com mock (barra preta), DENV/3/290 (barra cinza), DENV/3/290 inativado (barra cinza com linhas), DENV/3/5532 (barra branca) ou DENV/3/5532 inativado (barra branca com com linhas). Os valores foram obtidos utilizando-se a técnica de CBA e são expressos em pg/mL. Os dados foram analisados utilizando-se *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Valores são expressos pela média \pm desvio padrão (SD) de cinco diferentes experimentos. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ e *** $p = < 0.001$. # = $p \leq 0.05$ comparando a infecção com os vírus nativos e inativados.

Apesar da definição do importante papel da replicação viral na indução da apoptose, fica claro pela análise das figuras 5.6A e 5.6C, que o número de mdDCs em apoptose é 2x maior do que o número de células infectadas. Foi então avaliado se a existência de algum sub-produto da infecção poderia também estar induzindo a apoptose das mdDCs (*Bystander effect* [PALMER, *et al.*, 2005]). A Figura 5.12 representa o resultado de três culturas distintas de mdDCs tratadas com o sobrenadante inativado por radiação gama de quatro culturas de mdDCs previamente infectadas com as cepas DENV/3/5532, DENV/3/290 (com MOI de 5) e mock por 72 hpi. A inativação dos vírus foi comprovada pela técnica de imunodeteção de focos em células C6/36. A porcentagem de células infectadas pelos vírus DENV/3/5532, DENV/3/290 e mock à esquerda (Figura 5.12A; controles do experimento), e tratadas com o sobrenadante irradiado à direita. Na Figura 5.12B é mostrado a porcentagem de células em apoptose nas culturas infectadas pelos vírus DENV/3/5532, DENV/3/290 e mock à esquerda, e tratadas com o sobrenadante irradiado à direita. Os resultados indicam que, além da replicação viral, existe algum outro metabólito secretado durante a infecção com a cepa DENV/3/5532 que induz a apoptose de mdDCs.

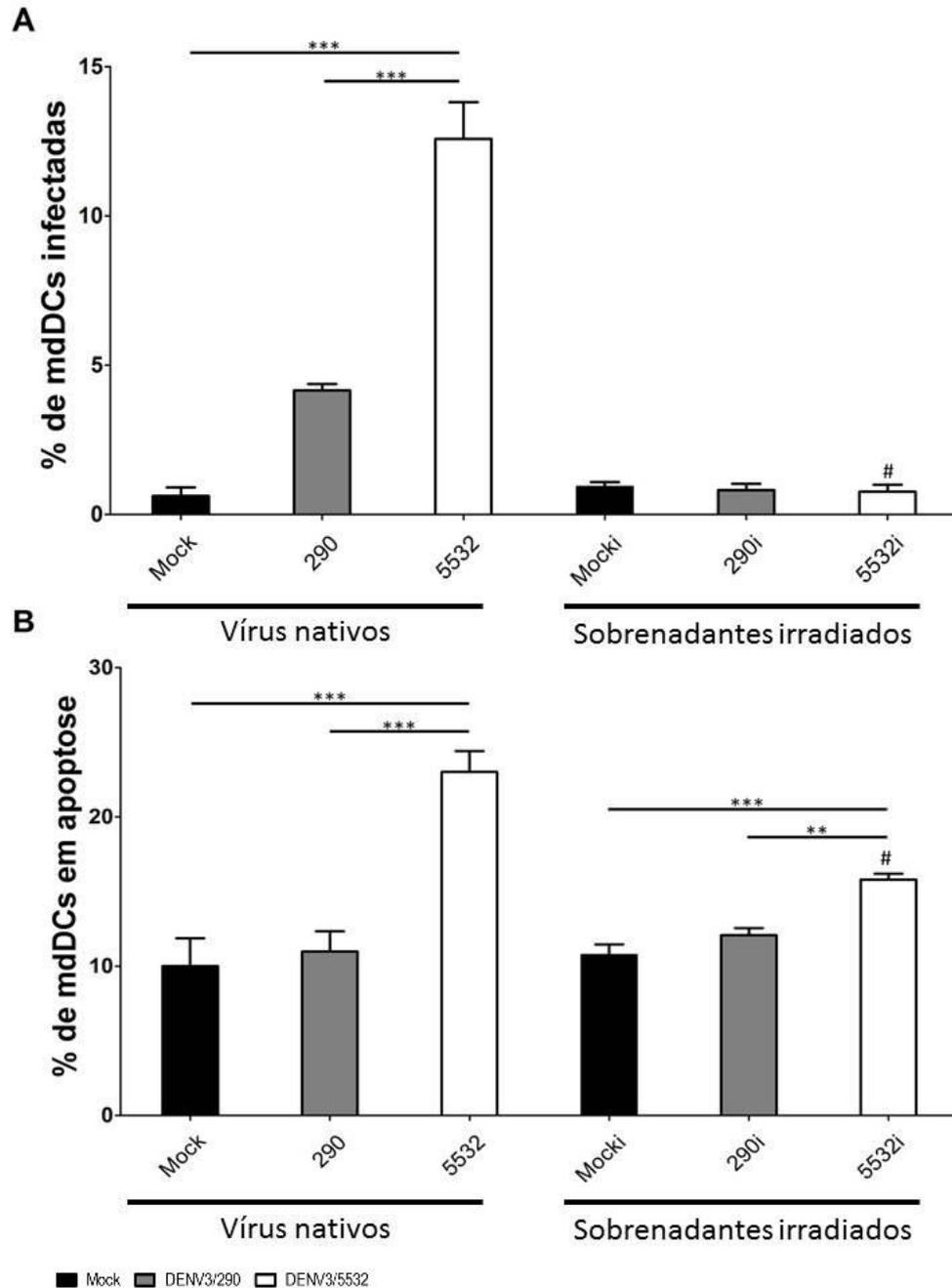


Figura 5.12: Efeito *bystander* promovido nas mdDCs tratadas por sobrenadante de culturas submetidas à irradiação gama. (A) Porcentagem de mdDCs infectadas por vírus nativos (esquerda) e com sobrenadante de culturas de mdDCs previamente infectadas e expostas à radiação gama (direita), demonstrando a eficácia do processo de irradiação. (B) Porcentagem de células em processo de apoptose infectadas por vírus nativos (esquerda) e com sobrenadante de culturas de mdDCs previamente infectadas e expostas à radiação gama (direita). Os dados mostram o efeito *bystander* induzido pelo tratamento das mdDCs com o sobrenadante irradiado de células previamente infectadas pela cepa DENV3/5532. Os experimentos foram realizados com três culturas distintas de mdDCs (de voluntários saudáveis), onde cada uma foi tratada separadamente com quatro sobrenadantes irradiados (provenientes dos experimentos mostrados na Figura 5.6). Os dados foram analisados utilizando-se *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Valores são expressos pela média \pm desvio padrão (SD) de três culturas distintas. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ e *** = $p \leq 0.001$. DENV3/5532 (barras brancas), DENV3/290 (barras cinza) e mock (barras pretas). # = $p \leq 0.05$ quando comparando a apoptose induzida pelos vírus nativos e inativados.

6. DISCUSSÃO:

Desde a reintrodução do vírus da dengue sorotipo 3 (genótipo III, Sri Lanka) nas Américas, durante epidemias na Nicarágua e no Panamá em 1994, houve um aumento significativo no número de casos de FHD/SCD (PAHO, 2007). Adicionalmente, casos com manifestações clínicas incomuns como miocardites, hepatite, pneumonia e distúrbios neurológicos (conhecidos como dengue com complicação), tem sido mais frequentes (PAHO, 2007). Recentemente, durante a epidemia de DENV/3 ocorrida no Paraguai em 2007, aproximadamente 50% dos óbitos foi devido a casos de dengue com complicação, o que chamou a atenção dos médicos e da comunidade científica (PAHO, 2007).

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela evolução para as formas graves da infecção (FHD/SCD) pelo DENV, assim como as manifestações clínicas incomuns da doença ainda não são totalmente compreendidos. Vários estudos têm implicado a cepa viral infectante na patogenia da dengue (PRYOR, *et al.*, 2001). A comparação da sequencia de aminoácidos do genoma das cepas DENV/3/5532 e DENV/3/290 revelou doze diferenças localizadas nas regiões estruturais (uma na proteína prM, uma na proteína C e cinco na proteína E) e não-estruturais (uma na proteína NS2B e quatro na proteína NS5). Três das mutações na proteína E são localizadas no domínio III, domínio este semelhante à imunoglobulina e que está envolvido no reconhecimento de receptores na superfície celular (REY, *et al.*, 1995). Diferenças na patogenicidade entre os genótipos americano e asiático de DENV2 foram relacionadas com mutações na proteína E (N390D) e nas regiões 3' e 5' não-traduzidas (UTRs). Estas alterações podem explicar a baixa capacidade das cepas do

genótipo americano em se replicarem em células dendríticas e macrófagos derivados de monócitos humanos (COLOGNA & RICO-HESSE, 2003; PRYOR, *et al.*, 2001). Com relação aos vírus utilizados neste estudo, as cinco substituições de aminoácidos observadas nas proteínas não estruturais poderiam interferir na replicação viral (DÈSPRES, *et al.*, 1998), na regulação da via JAK/STAT (ASHOUR, *et al.*, 2009; ASHOUR, *et al.*, 2010) e na atividade proteolítica da serina-protease da proteína NS3 (SALAEMAE, *et al.*, 2010).

Por outro lado, fatores imunológicos dos indivíduos poderiam ser também um determinante no desenvolvimento das formas graves de dengue já que as manifestações clínicas decorrentes das infecções virais são basicamente dependentes de um balanço entre a resposta do hospedeiro e a replicação do vírus. A habilidade do vírus em escapar da ou modular a resposta imune do hospedeiro é crucial para o desenvolvimento da doença (PASIEKA, *et al.*, 2006). O primeiro alvo celular para a infecção pelo DENV são as DCs residentes da pele, células de Langerhans (LC), e as células dendríticas dermais (DDC) (NAVARRO-SÁNCHEZ, *et al.*, 2005). As DCs são células chave no desenvolvimento da resposta imune adaptativa e, por esta razão, elas representam um interessante modelo de estudo *ex-vivo* na patogênese da dengue (DEJNIRATTISAI, *et al.*, 2008).

Considerando os aspectos descritos acima, analisamos o comportamento de isolados clínicos de DENV/3 exibindo diferentes fenótipos e a interação destes vírus com células humanas alvo, a fim de mimetizar o ciclo de infecção viral natural, já que não existe um modelo animal disponível para patogênese da dengue.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a cepa DENV/3/5532, implicada em um caso fatal de dengue, infecta mais eficientemente as mdDCs,

modula de forma mais intensa diversos genes envolvidos na resposta da imunidade inata, induz um maior percentual de células à apoptose, e uma maior secreção de citocinas pró-inflamatórias. O conjunto destes fatores pode ter contribuído para o desenvolvimento da miocardite, hepatite e morte por choque da paciente-fonte. Além disso, já foi extensamente demonstrado que a patogenia da dengue correlaciona-se positivamente com a carga viral (LIBRATY, *et al.*, 2002), sendo detectados picos de viremia entre 100- e 1000 vezes maiores em pacientes que desenvolveram FHD/SCD, em relação a taxa viral de pacientes com FD (VAUGHN, *et al.*, 2000). Corroborando estes achados, a cepa DENV/3/5532 infectou mais eficientemente as mdDCs do que a cepa DENV/3/290 (isolada de um caso de FD) nas mdDCs, produzindo altos títulos de vírus no sobrenadante de cultura (Figura 5.6A e B). A diferença observada na produção de progênie viral (0.5-1.0 Log₁₀) nas mdDCs infectadas com as duas cepas é possivelmente devida a alta taxa de células em apoptose detectada nas culturas infectadas com a cepa DENV/3/5532, o que pode vir a inibir a morfogênese viral. Alternativamente, a cepa DENV/3/5532 poderia apresentar uma menor eficiência na montagem das partículas virais quando comparadas com a cepa DENV/3/290, ou ainda, a taxa de replicação viral poderia ter atingido um limite de saturação, não sendo possível a elevação dos índices de progênie viral.

Nos últimos anos vários estudos têm avaliado a resposta do hospedeiro à infecção pelo DENV utilizando tecnologias de alto desempenho como os microarranjos de DNA (BECERRA, *et al.*, 2009; BORDIGNON, *et al.*, 2008; FINK, *et al.*, 2007; SIMMONS, *et al.*, 2007; UBOL, *et al.*, 2008; WARKE, *et al.*, 2003). De forma geral, estes estudos demonstraram uma importante ativação da resposta

imune inata, prioritariamente mediada por IFNs do tipo I. Da mesma forma, a análise dos microarranjos das mdDCs infectadas com a cepa DENV/3/5532 revelou a ativação de genes estimulados por interferon (ISG15 e ISG20) com atividade antiviral, como a família de genes OAS (oligoadenilato sintetases), proteínas de resistência à infecção pelos mixovírus (MX) e proteínas com repetições de tetratricopeptídeos (IFIT), (Figura 5.5). Navarro-Sanchez e colaboradores em 2005 sugeriram que a imunidade inata pode ser um importante mecanismo de controle da infecção pelo vírus da dengue. Os dados deste trabalho, demonstraram que a infecção das mdDCs com a cepa DENV/3/5532 induziu uma superexpressão (*up-regulation*) de vários genes da imunidade inata envolvidos com a atividade antiviral nestas células. Porém, aparentemente, esta resposta não foi suficiente para controlar a infecção nas mdDCs.

Adicionalmente, os dados de microarranjo revelaram uma superexpressão (*up-regulation*) de alguns transcritos de citocinas/quimiocinas, como a IP-10 (Proteína 10 induzida por interferon gama ou CXCL10), IL-8 (interleucina 8 ou CCL8), IL-12p40 (subunidade p40 da interleucina 12), CCL3 e IP-9 (CXCL11) que são importantes para o recrutamento de outras células do sistema imune ao sítio de infecção. A modulação de alguns genes foi confirmada pela detecção das proteínas IL-8 e IP-10, no sobrenadante das culturas de mdDCs infectadas com as duas cepas virais (Figura 5.7C e Figura 5.8A). Além disso, foram realizadas confirmações biológicas dos dados obtidos nos microarranjos, utilizando-se a qPCR dos genes OAS2, IFIT1 e EIF2AK2 (Figura 5.5C), corroborando os achados.

Tem sido cada vez mais reconhecido que a resposta inflamatória descontrolada, com elevada produção de citocinas, desempenha um papel fundamental no

desenvolvimento de manifestações clínicas graves na dengue (Clyde, *et al.*, 2006). Bozza e colaboradores em 2008 demonstraram que, níveis elevados de IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-17 e GM-CSF são produzidos em casos graves de dengue, quando comparados com pacientes que apresentaram formas mais brandas da doença, os quais produziam níveis elevados de MIP-1 β . Além disso, os autores mostraram que níveis elevados de TNF- α , IL-8, IL-1 β e MCP-1, encontrados no soro de pacientes que apresentaram sintomas graves de dengue, estão associados com trombocitopenia e hipotensão.

A infecção das mdDCs com a cepa DENV/3/5532 induziu uma maior produção das citocinas TNF- α e IL-6, quando comparado à infecção com a cepa DENV/3/290 em 72 hpi (Figura 5.7). A produção tardia de TNF- α e IL-6 (72 hpi) após a infecção pode estar relacionada à necessidade de vários ciclos de replicação do DENV, antes de desencadear a produção das citocinas em níveis detectáveis. Além disso, a baixa modulação dos genes nos tempos iniciais da infecção (6 e 12 hpi), demonstrado pelas análises dos microarranjos (Figura 5.5A) corrobora com a hipótese de vários ciclos de replicação viral para a modulação da expressão gênica. Da mesma forma, Ho e colaboradores em 2001 demonstraram que o pico de produção de TNF- α por mdDCs infectadas com DENV ocorre em 72 hpi. O TNF- α tem sido implicado no desenvolvimento do dano endotelial de vasos, pela ativação de células endoteliais microvasculares dermais humanas (HMEC-1) através da indução de moléculas de adesão celular, como as ICAM-1 (CARDIER, *et al.*, 2005). Ademais, foi verificado a indução da apoptose nas HMEC-1 mediado pelo TNF- α , podendo contribuir para o extravasamento de líquido dos vasos sanguíneos, observado nos casos de FHD/SCD (CARDIER, *et al.*, 2005). A apoptose das células HMEC-1, mediada por TNF- α , ocorre

amplamente pela produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (YEN, *et al.*, 2008). Entretanto, foi demonstrado em nosso estudo que o TNF- α é capaz de proteger as mdDCs do processo de apoptose. Foi observada uma redução no número de células apoptóticas infectadas com DENV/3 e tratadas com o TNF- α (Figure 5.10A). Descrições anteriores mostram que as DCs estariam protegidas do efeito pró-apoptótico do TNF- α via super-expressão de TRAIL e sub-expressão de FLIP (Proteína Inibitória de FLICE), desta forma, o TNF- α *in vitro* induziria exclusivamente células tumorais à morte por apoptose (JOO, *et al.*, 2002; FANGER, *et al.*, 1999). Também já foi demonstrado que o TNF- α têm um papel protetor em linhagens de células dendríticas foliculares (HK), e que estas células proliferam na presença da citocina (PARK, *et al.*, 2003). Além disso, o TNF- α (ou LPS) induz as DC à maturação, o que leva a superexpressão de genes anti-apoptóticos como Bcl-XL e Bcl-2 (LUNDQVIST, *et al.*, 2002). Baseado nos resultados obtidos foi desenvolvido um modelo que é apresentado na Figura 6.1. Neste modelo é demonstrado que as mdDCs infectadas com DENV/3/5532 replicam mais eficientemente e produzem mais TNF- α , quando comparadas com as células infectadas com DENV/3/290. O bloqueio do TNF- α solúvel utilizando-se de anticorpo neutralizante anti-TNF- α eleva a apoptose das mdDCs. Já a adição exógena de TNF- α promove a proteção das mdDCs do processo de apoptose. Esta proteção é provavelmente devida a maturação das mdDCs (LUNDQVIST. *et al.*, 2002). Nas culturas testadas, ocorreu a elevação da expressão dos níveis de CD40, um marcador de maturação bem definido (SALLUSTO, *et al.*, 2010), sendo que esta elevação foi mais acentuada nas mdDCs infectadas com a cepa DENV/3/5532 do que com a cepa DENV/3/290 (Anexos; Figura 10.1). Os dados confirmaram que ocorre uma regulação diferencial na maturação das mdDCs

após o bloqueio da ação do $\text{TNF-}\alpha$, o que pode contribuir para o estado apoptótico observado.

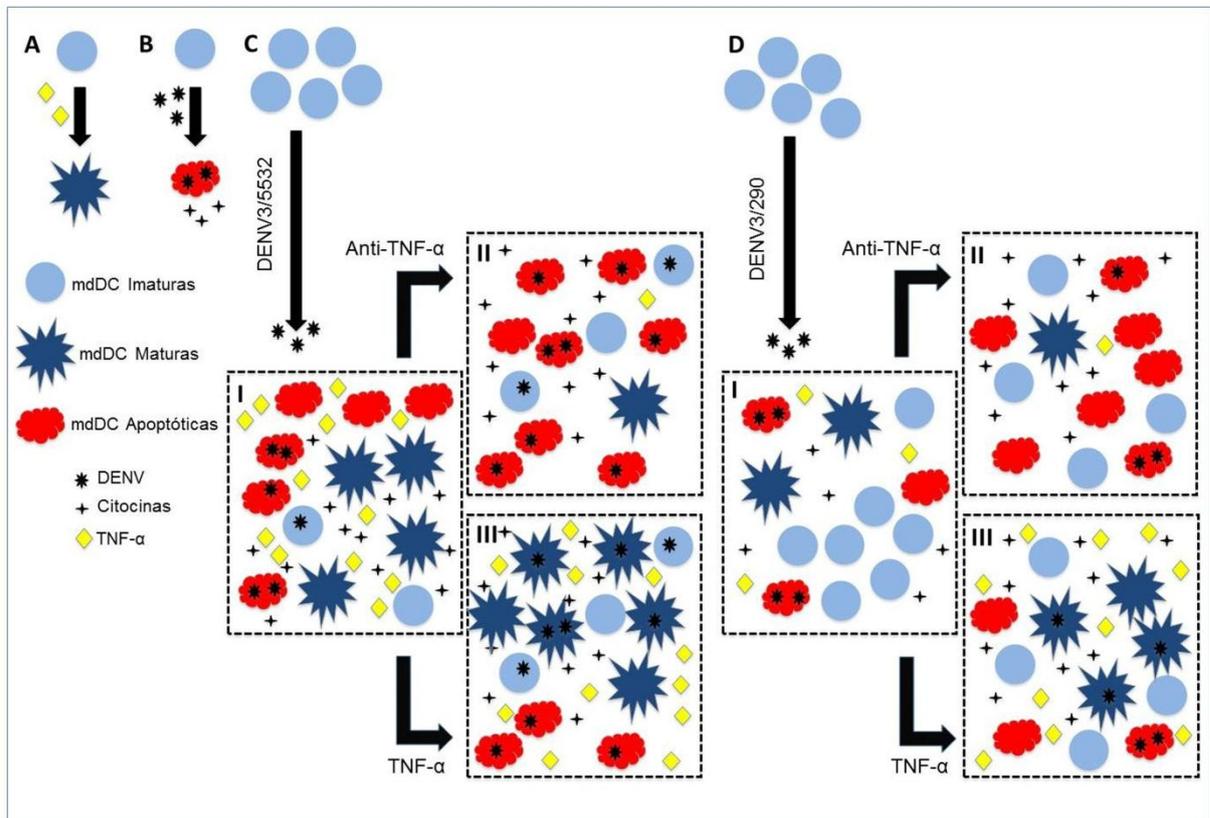


Figura 6.1: Representação esquemática da infecção de mdDCs com ambas as cepas virais e o papel do $\text{TNF-}\alpha$ na sobrevivência de mdDCs. (A) De acordo com o trabalho de Lundqvist e colaboradores em 2002 o $\text{TNF-}\alpha$ teria a capacidade de estimular a maturação nas DC, o que elevaria a capacidade de resistências das células à apoptose, provavelmente pela super-expressão de Bcl-XL e Bcl-2. (B) Em contrapartida, a infecção viral é associada à apoptose, inibindo a maturação das células e reduzindo a expressão de moléculas apresentadoras de antígeno, prejudicando a estimulação dos linfócitos T (Palmer, *et al.*, 2005). (C-I) mdDCs infectadas com DENV/3/5532 mostram maiores níveis de infecção, apoptose e produção de $\text{TNF-}\alpha$. A infecção pelo DENV/3/5532 inibe a maturação das mdDC e consequentemente o desenvolvimento de um estado anti-apoptótico. (C-II) Quando as células são tratadas com anti- $\text{TNF-}\alpha$ ocorre uma elevação no número de células apoptóticas, pois sem a presença de $\text{TNF-}\alpha$, as mdDCs não sofrem maturação. (C-III) O tratamento com $\text{TNF-}\alpha$ promove a maturação das mdDC tornando as células mais resistentes à apoptose, mesmo com a presença do DENV/3, isso pode explicar o aumento na porcentagem de células infectadas observadas. (D-I) Já a infecção das mdDCs pelo DENV/3/290 mostra baixos níveis de infecção, apoptose e $\text{TNF-}\alpha$. (D-II) Quando as células são tratadas com anti- $\text{TNF-}\alpha$ ocorre baixos níveis de maturação das mdDC, elevando o número de células apoptóticas, a despeito do baixo número de células infectadas. Quando as mdDCs são tratadas com anti- $\text{TNF-}\alpha$, a maturação celular diminui, sendo portanto observadas mais células em apoptose. (D-III) Já o tratamento com $\text{TNF-}\alpha$ estimula a maturação das células, levando às células ao estado anti-apoptótico.

Outro transcrito diferencialmente modulado no curso da infecção das mdDCs com a cepa DENV/3/5532 foi o da citocina IL-6. Recentemente, Levi e colaboradores (2010) mostraram que os níveis elevados de TNF- α , IL-6, C3 e Proteína C Reativa estão associados com a gravidade dos sintomas da dengue, sendo o aumento da taxa de IL-6 especialmente detectado em infecções secundárias. Níveis elevados de IL-6 também foram observados em crianças que exibiam formas graves da doença (SCD) no sudoeste asiático. Adicionalmente, IL-6 representa um papel importante no desenvolvimento de auto-anticorpos contra plaquetas e células endoteliais, contribuindo para a trombocitopenia e o extravasamento de plasma dos vasos sanguíneos observados nos casos graves de dengue (RACHMAN & RINALDI, 2006). Similarmente, IL-6 parece ser um importante mediador de sepse, através da indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias, Proteína C Reativa e NO (HACK, *et al.*, 2007).

A produção de RANTES, IP-10 e MCP-1 pelas mdDCs infectadas com as duas cepas estudadas foi significativa quando comparado as células infectadas com mock, no entanto, não houve diferença na síntese destas quimiocinas entre as duas cepas de DENV/3 (Figura 5.8). Monócitos infectados com cepas de DENV2 produziram MCP-1 e esta quimiocina interferiu na estabilidade das junções ocludentes entre as células HUVECs em cultura, sugerindo que o MCP-1 está, pelo menos parcialmente, envolvido na exacerbação da permeabilidade de vasos sanguíneos observada na FHD/SCD (LEE, *et al.*, 2006). Adicionalmente, o trabalho de Lee e colaboradores (2006) sugere que a infecção pelo DENV, combinada com outras doenças, como a aterosclerose, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares, e a indução de MCP-1, são associações que elevam o risco da progressão para FHD/SCD.

Neste estudo foram dosados os mediadores da resposta imune: MIG (Figura 5.8C e 5.11C) e IL-8 (Figura 5.7 e 5.10), em dois momentos distintos, tendo sido observadas diferenças nos níveis de produção destes mediadores pelas mdDCs infectadas, quando realizada comparação entre as cepas. Discordâncias na produção de mediadores imunológicos produzidos por DCs infectadas com DENV já foram relatadas anteriormente (RODRIGUEZ-MADOZ, *et al.*, 2010a; RODRIGUEZ-MADOZ, *et al.*, 2010b), uma vez que a produção de citocinas/quimiocinas pode apresentar pequenas variações entre as culturas. Além disso, em nossos experimentos, foram utilizadas culturas de mdDCs primárias de diferentes doadores, sistema que apresenta variabilidade inerente, a cada indivíduo. A interleucina 8 (IL-8) a qual já foi bem caracterizada na progressão da FHD. A IL-8 atua na reorganização de actina nas junções ocludentes das células HMEC-1 em cultura (TALAVERA, *et al.*, 2004). Além disso, níveis elevados desta citocina (conjuntamente com IL-6) foram relatados em pacientes com FHD, sendo positivamente correlacionado com o desenvolvimento de trombocitopenia (PRIYADARSHINI, *et al.*, 2010). IL-8 e IFN- α foram associados com níveis aumentados de alanina aminotransferase, sugerindo o envolvimento destas citocinas também com danos hepáticos observados na infecção pelo DENV (PRIYADARSHINI, *et al.*, 2010). As quimiocinas induzidas por IFN- α , MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) e IP-9 (CXCL11) são ativamente produzidas pelas DCs após a infecção pelo DENV2, e esta síntese é amplificada na presença de células T específicas contra DENV (DEJNIRATTISAI, *et al.*, 2008). Estas quimiocinas interagem com o receptor CXCR3 encontrado nas células T de memória ativadas e promovem a sua quimiotaxia (LOETSCHER, *et al.*, 1996; QIN, *et al.*, 1998), contribuindo para a imunopatologia direcionada por células T observada nos casos de FHD. Ademais, os

autores demonstraram que pacientes sofrendo de FHD apresentaram níveis elevados de MIG, IP-10 e IP-9 (CXCL11) quando comparados com pacientes com FD (DEJNIRATTISAI, *et al.* 2008).

Outra quimiocina que foi produzida nas mdDCs após a infecção com os DENV/3 em nosso estudo foi a RANTES, que funciona no recrutamento de linfócitos e células NK. Lin e colaboradores em 2000 demonstraram que células hepáticas humanas produzem RANTES após a infecção com DENV2, através de vias de oxidação que envolve IL-6 e NF- κ B. Os autores sugerem que RANTES pode ser um importante mediador de dano hepático observado durante a infecção pelo DENV. Conceição e colaboradores em 2010 observaram uma elevação na expressão do mRNA para IL-6, IL-8 e RANTES em células HepG2 infectadas com o DENV2, e sugeriram que estas citocinas/quimiocinas podem contribuir para a hepatite observada nos pacientes com dengue.

A despeito do fato do TNF- α ter sido implicado na patogênese de FHD (CARDIER, *et al.*, 2005), não se pode excluir o efeito direto da replicação do DENV na indução da apoptose das células infectadas. Vários trabalhos já reportaram que os níveis de replicação do vírus da dengue em monócitos (ESPINA, *et al.*, 2003), sistema nervoso central de camundongos (DÈSPRES, *et al.*, 1998) e linhagens celulares de hepatócitos humanos (MARIANNEAU, *et al.*, 1997) correlacionam-se positivamente com a indução da apoptose. De forma similar, as mdDCs são infectadas mais eficientemente pela cepa DENV/3/5532, e apresentam uma maior indução de apoptose e níveis mais elevados de TNF- α em 72 hpi, quando comparadas às células infectadas com a cepa DENV/3/290. Portanto, a maior indução de apoptose e produção de citocinas pró-inflamatórias foram observadas nas culturas de mdDCs

infectadas pela cepa DENV/3/5532, sendo diretamente influenciadas pela maior habilidade de replicação que esta cepa apresenta, quando comparada com a cepa DENV/3/290 ou aos vírus inativados.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a cepa DENV/3/5532 (genótipo III, Sri Lanka), isolado de um caso fatal de FD primária com complicações viscerais (hepatite e miocardite) e choque cardiogênico, infecta e replica-se mais eficientemente, induz maior número de células à apoptose, induz uma maior ativação de genes da resposta imune inata e a produção de citocinas com papel pró-inflamatório nas mdDCs, quando comparada as células infectadas com a cepa DENV/3/290. Adicionalmente, foi possível observar que o TNF- α , juntamente com a presença do DENV/3, reduz os níveis de apoptose nas mdDCs, e que a replicação viral ativa é essencial para a indução da apoptose e para a produção de citocinas/quimiocinas pelas mdDCs. Os elevados níveis de apoptose observados nas mdDCs infectadas com DENV/3/5532 podem comprometer a apresentação de antígenos dos DENV/3 aos linfócitos T, induzindo à uma resposta imunológica adaptativa deficiente. Aliado a isto, a maior secreção de citocinas pró-inflamatórias poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento da FHD/SCD ou outras manifestações clínicas não usuais. Conjuntamente, os resultados obtidos permitiram elucidar alguns dos possíveis mecanismos implicados na maior virulência da cepa DENV/3/5532 e, eventualmente, poderão contribuir para o prognóstico de casos graves/fatais de dengue.

7. CONCLUSÕES:

- A caracterização genômica de dois isolados clínicos recentes DENV/3/5532 e DENV/3290, provenientes de um caso fatal de dengue com complicações e febre de dengue, respectivamente, demonstrou 12 diferenças aminoacídicas (sete nas proteínas estruturais e cinco nas não-estruturais);
- Microarranjos de DNA de alta densidade foram utilizados para caracterizar a expressão gênica diferencial em culturas de mdDCs infectadas com DENV/3/5532, e demonstrar a modulação de genes envolvidos na resposta imune inata antiviral, em especial, mediada por interferon;
- mdDCs em cultura são mais susceptíveis à infecção pela cepa DENV/3/5532 em relação à DENV/3/290;
- A infecção *in vitro* de mdDCs, pela cepa DENV/3/5532 eleva a produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial, TNF e IL-6 e induz maiores taxas de apoptose quando comparada a cepa DENV/3/290;
- Foi demonstrado que a adição de TNF- α logo após a infecção pelo DENV/3 tem um papel protetor na indução de apoptose de mdDCs;
- A replicação viral parece ser essencial na indução de apoptose nas culturas de mdDCs, bem como, para a produção de citocinas;
- A secreção de algum metabólito no curso da infecção de mdDCs com a cepa DENV/3/5532 também induz a apoptose das células, promovendo o efeito conhecido como *bystander*;
- Os achados sugerem que haja uma correlação da gravidade da doença apresentada pela paciente fonte, com as resposta das mdDCs infectadas *in vitro*

pelo DENV/3/5532. Os elevados níveis de apoptose das DCs pode ter impedido uma apresentação eficiente dos antígenos virais aos linfócitos T da paciente. Esta ineficiência poderia levar a uma resposta adaptativa incorreta do sistema imunológico frente à infecção. Aliado ao elevado nível de citocinas observado *in vitro*, é possível que a resposta da paciente tenha influenciado na gravidade do quadro clínico observado;

8. PERSPECTIVAS:

- Caracterizar outros metabólitos secretados pelas mdDCs infectadas com a cepa DENV/3/5532, e que possam estar envolvidas na indução ao processo de apoptose;
- Investigar a produção de TNF- α pelas mdDCs, determinando que células são responsáveis por sua secreção: infectadas, ativadas e/ou *bystander*;
- Realizar ensaios para determinar o papel de cada uma das mutações observadas entre as duas cepas estudadas utilizando a tecnologia de clones infecciosos e replicons;
- Determinar se a multiplicidade de infecção (MOI) estaria relacionada com a maior produção de citocinas/quimiocinas, indução à apoptose e progênie viral nas culturas de mdDCs;
- Investigar o nível de expressão de moléculas de superfície relacionadas à ativação das mdDCs, quando infectadas com as diferentes cepas;
- Elucidar a(s) via(s) ativada(s) durante a infecção das mdDCs que induz à apoptose;
- Determinar quais as características biológicas como marcadores de superfície e maturação, das mdDCs infectadas pelos DENV e das mdDCs *bystander*;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALAVIGE, G. N. FERNANDO, S. FERNANDO, D. J. SENEVIRATNE, AND S. L. Dengue viral infections. **Postgr. Med. J.** 80: 588-601. 2004.

AN, J.; KIMURA-KURODA, J.; HIRABAYASHI, Y.; YASUI, K. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. **Virology**, v. 263, n. 1, p. 70-7, 1999.

ASHOUR, J.; LAURENT-ROLLE, M.; SHI, P.-Y.; GARCÍA-SASTRE, A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of virology**, v. 83, n. 11, p. 5408-18, 2009.

BALAS, C.; KENNEL, A.; DEAUVIEAU, F.; et al. Different innate signatures induced in human monocyte-derived dendritic cells by wild-type dengue 3 virus, attenuated but reactogenic dengue 3 vaccine virus, or attenuated nonreactogenic dengue 1-4 vaccine virus strains. *The Journal of infectious diseases*, v. 203, n. 1, p. 103-8, 2011.

BALTIMORE, S. H. AND D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nature immunology*, v. 10, n. 3, p. 281-288, 2009.

BECERRA, A. WARKE, R. V. MARTIN, K. XHAJA, K. BOSCH, N. DE. ROTHMAN, A. L. BOSCH, I. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. **J. Med. Virol.** 81 (8): 1403-1411. 2009.

BELASIO, E.F. MORETTI, S. NAPPI, F. BARILLARI, G. MICHELETTI, F. CAFARO, A. ENSOLI, B. Native HIV-1 Tat Protein Targets Monocyte-Derived Dendritic Cells and Enhances Their Maturation, Function, and Antigen-Specific T Cell Responses. **J. Immunol.**, 168, 197-206. 2002.

BHAMARAPRAVATI N, YOKSAN S, ANGSUBHAKORN S, KHIN MM & DARAKUL T. Clinical trials of live attenuated dengue vaccine current status. International Symposium on Current Situation of Dengue Virus Infection and its Control, 10-12 October 1993, Nagasaki, Japan. 1993.

BORDIGNON, J. STROTTMANN, D. M. MOSIMANN, A. L. P. PROBST, C. M. STELLA, V. NORONHA, L. ZANATA, S. M. SANTOS, C. N. D. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in the E and NS3 Helicase Domains. **Journal of Medical Virology** 79:1506–1517, 2007.

BOZZA, F. A. SHAH, A. M. WEYRICH, A. S. ZIMMERMAN, G. A. Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 40 (2): 123-134. 2009.

BOWIE, A. G.; UNTERHOLZNER, L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. **Nature reviews**. Immunology, v. 8, n. 12, p. 911-22, 2008.

CALISHER, C. H. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. **Acta Virol**. Sep;32(5):469-78. 1988;

CARDIER, J. E. MARIÑO, E. ROMANO, E. TAYLOR, P. LIPRANDI, F. BOSCH, N. ROTHMAN, A. L. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: Possible role of TNF-A in endothelial cell damage in dengue. **Cytokine** 6 (21): 359-365. 2005.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. *Flavivirus* genome organization, expression, and replication. **Genome**, 44:649-88, 1990.

CLYDE, K. KYLE, J. L. HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J. Virol**. 80 (23): 11418-31141. 2006.

COLOGNA, R. RICO-HESSE, R. American Genotype Structures Decrease Dengue Virus Output from Human Monocytes and Dendritic Cells. **J. Virol**. 77 (7): 3929-3938. 2003.

CONCEIÇÃO, T. M. EL-BACHA, T. VILLAS-BÔAS, C. S. COELHO, G. RAMIREZ, J. MONTERO-LOMELI, M. POIAN, A. T. DA. Gene expression analysis during dengue virus infection of HepG2 cells reveal virus control of innate immune response. **J. Infect.** 60 (1): 65-75. 2010.

COURAGEOT, M. P. CATTEAU, A. DÈSPRES, P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. **Adv. Virus Res.** 60: 157-86. 2003.

DAVIS, C. W. NGUYEN, H. Y. HANNA, S. L. SA'NCHEZ, M. D. DOMS, R. W., T.C. PIERSON. West Nile Virus Discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for Cellular Attachment and Infection. **J. Virol.**, 80 (3): 1290-1301. 2006.

DEJNIRATTISAI, W., T. DUANGCHINDA, C. L. S. LIN, S. VASANAWATHANA, M. JONES, M. JACOBS, P. MALASIT, X. N. XU, G. SCRETON, AND J. MONGKOLSAPAYA. A Complex Interplay among Virus, Dendritic Cells, T Cells, and Cytokines in Dengue Virus Infections. **J. Immunol.** 181: 5865–5874. 2008.

DÈSPRES, P. FRENKIEL, M. P. CECCALDI, P. E. SANTOS, C. N. D. DEUBEL, V. Apoptosis in the Mouse Central Nervous System in Response to Infection with Mouse-Neurovirulent Dengue Viruses. **J. Virol.** 72 (1): 823-829. 1998.

DUARTE DOS SANTOS, C. N. FRENKIEL, M. P. COURAGEOT, M. P. ROCHA, C. F. VAZEILLE-FALCOZ, M. C. WIEN, M. W. REY, F. A. DEUBEL, V. DESPRÈS, P.

Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Viol.**, 274(2):292-308. 2000.

ESLAHPAZIR, J. JENABIAN, M. A. BOUHLAL, H. HOCINI, H. CARBONNELI, C. GRE'SENQUET, G. MBOPI-KE'OU, F. O. X. LEGOFF, I. SAI DI, H. REQUENA, M. NASREDDINE, N. LONGO, J.D. KAVERI, S.V. BE'LEC, L. Infection of Macrophages and Dendritic Cell With Primary R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibeted by Natural Polyreactive Anti-CCR5 Antibodies Purified from Cervicovaginal Secretions. **Cli. Vacc. Immunol.**, 15 (5): 872-884. 2008.

ESPINA, L. M. VALERO, N. J. HERNÁNDEZ, J. M. MOSQUERA, J. A. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Jan. 68 (1): 48-53. 2003.

EWING, B. GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** 8: 186-194. 1998.

EWING, B. HILLIER, L. WENDL, M. GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** 8: 175-185. 1998.

FINK, J. GU, F. LING, L. TOLFVENSTAM, T. OLFAT, F. CHIN, K. C. AW, P. GEORGE, J. KUZNETSOV, V. A. SCHREIBER, M. VASUDEVAN, S. G. HIBBERD, M. L. Host gene

expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 1 (2): e86. 2007.

FANGER, N. A; MALISZEWSKI, C. R.; SCHOOLEY, K.; GRIFFITH, T. S. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 8, p. 1155-64, 1999.

FONSECA, S. G. REIS, M. M. COELHO, V. NOGUEIRA, L. G. MONTEIRO, S. M. MAIRENA, E. C. BACAL, F. BOCCHI, E. GUILHERME, L. ZHENG, X. X. LIEW, F. Y. HIGUCHI, M. L. KALIL, J. CUNHA-NETO, E. Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 may be Associated to the Predominance of CD8+ T cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Scand. J. Immunol.** 66: 362-371. 2007.

GOULD, E. A. CLEGG, J. C. S. Growth, Titration and Purification of Togaviruses. In B. W. J. Mahy (ed), *Virology: a practical approach*. IRL Press, Washington, DC. 1985.

GORDON, D. ABAJIAN, C. GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.** 8: 195-202. 1998.

GORDON, D. DESMARAIS, C. GREEN, P. Automated Finishing with Autofinish. **Genome Res.** 11: 614-625. 2001.

GUERRA, S. NÁJERA, J. L. GONZÁLEZ, J. M. LÓPEZ-FERNÁNDEZ, L. A. CLIMENT, N. GATELL, J. M. GALLART, T. ESTEBAN, M. Distinct Gene Expression Profiling after Infection of Immature Human Monocyte-Derived Dendritic Cell by the Attenuated Poxvirus Vectors MVA and NYVAC. **J. Virol.**, 81 (16): 8707-8721. 2007.

HACK, C. E. AARDEN, L. A. THIJS, L. G. Role of cytokines in sepsis. **Adv. Immunol.** 66:101-95. 1997.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. **Science** 239: 476-481. 1998.

HALSTEAD, S. B. O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **J. Exp. Med.** 146 (1): 201-217. 1977.

HO, L. J. WANG, J. J. SHAIQ, M. F. KAO, C. L. CHANG, D. M. HAN, S. W. LAI, J. H. Infection of Human Dendritic Cells by Dengue Virus Causes Cell Maturation and Cytokine Production. **J. Immunol.**, 166: 1449-1506. 2001.

IRIZARRY, R. A. HOBBS, B. COLLIN, F. BEAZER-BARCLAY, Y. D. ANTONELLIS, K. J. SCHERF, U. SPEED, T. P. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics** 4 (2): 249–264. 2003.

JOO, H.-G.; FLEMING, T. P.; TANAKA, Y., et al. Human dendritic cells induce tumor-specific apoptosis by soluble factors. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 102, n. 1, p. 20-8, 2002.

KAJASTE-RUDNITSKI, A. MASHIMO, T. FRENKIEL, M. P. GUENET, J. L. LUCAS, M. DESPRÈS, P. The 2',5'-oligoadenylate synthetase 1b is a potent inhibitor of West Nile virus replication inside infected cells. **J. Biol. Chem.**, 281(8):4624-4637. 2006.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KUNO, G. Serodiagnosis of flavivirus infections and vaccinations in humans. **Adv. Virus Res.** 61: 235-289. 2003.

KURANE, I. ENMLR, F. A. Cytokines in dengue virus infections: role of cytokines in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **seminars in VIROLOGY**, Vol 5, 1994- : pp 443448

LEE, Y. R. LIU, M. T. LEI, H. Y. LIU, C. C. WU, J. M. TUNG, Y. C. LIN, Y. S. YEH, T. M. CHEN, S. H. LIU, H. S. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. **J. Gen. Virol.** 87: 3623-3630. 2006.

LEVI, M. VAN DER POLL, T. Inflammation and coagulation. **Crit. Care Med.** 38: S26-34. 2010.

LIBRATY, D. H. YOUNG, P. R. PICKERING, D. ENDY, T. KALAYANAROOJ, S. GREEN, S. VAUGHN, D. W. NISALAK, A. ENNIS, F. A. ROTHMAN, A. L. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. **J. Infect. Dis.** 186 (8): 1165-8. 2002.

LIN, Y. L. LIU, C. C. CHUANG, J. I. LEI, H. Y. YEH, T. M. LIN, Y. S. HUANG, Y. H. LIU, H. S. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in DENV-2-virus-infected human liver cells. **Virology** 276: 114-126. 2000.

LOETSCHER, M. GERBER, B. LOETSCHER, P. JONES, S. A. PIALI, L. CLARK-LEWIS, I. BAGGIOLINI, M. MOSER, B. Chemokine receptor specific for IP-10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. **J. Exp. Med.** 184: 963-969. 1996.

LUNDQVIST, A.; NAGATA, T.; KIESSLING, R.; PISA, P. Mature dendritic cells are protected from Fas/CD95-mediated apoptosis by upregulation of Bcl-X(L). *Cancer immunology, immunotherapy* : CII, v. 51, n. 3, p. 139-44, 2002.

MARIANNEAU, P. CARDONA, A. EDELMAN, L. DEUBEL, V. DÈSPRES, P. Dengue Virus Replication in Human Hepatoma Cells Activates NF- κ B Which in Turn Induces Apoptotic Cell Death. **J. Virol.** 71 (4): 3244-3249. 1997.

MELO, F. L. DE; ROMANO, C. M.; ANDRADE ZANOTTO, P. M. DE. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 4, p. e390, 2009.;

MSPBS - Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, RENDICIÓN DE CUENTAS A LA CIUDADANÍA, Periodo 2003-2008, Asunción.
<http://www.mspbs.gov.py/publicaciones.php>. Accessed on 11/15/2009.

MUÑOZ-JORDÁN J. L. LAURENT-ROLLE, M. MARTÍNEZ-SOBRIDO, L. LIPKIN, W. I. GARCÍA-SASTRE, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flavivirus. **J. Virol.**, 79 (13): 8004-8013. 2005.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E. DÈSPRES, P. CEDILLO-BARRÓN, L. Innate Immune Response to Dengue Virus. **Arch. Med. Res.** 36: 425-435. 2005.

NOGUEIRA, R.; SCHATZMAYR, H.; MIAGOSTOVICH, M.; FARIAS, M.; FILHO, J. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Mem. Insa Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol, 83(2): 219-225, abr./jun. 1988;

PAHO. Dengue type 3 infection. Nicaragua and Panama, October–November. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 1995 70: 41–3. 2007.

PALMER, D. R.; SUN, P.; CELLUZZI, C.; et al. Differential Effects of Dengue Virus on Infected and Bystander Dendritic Cells. , v. 79, n. 4, p. 2432-2439, 2005.

PARK, S. M. PARK, H. Y. LEE, T. H. Functional Effects of TNF- α on a Human Follicular Dendritic Cell Line: Persistent NF- κ B Activation and Sensitization for Fas-Mediated Apoptosis1. **J. Immunol.** 171 (8): 3955-3962. 2003.

PASIEKA, T. J. BAAS, T. CARTER, V. S. PROLL, S. C. KATZE, M. G. LEIB, D. A. Functional genomic analysis of herpes simplex virus type 1 counteraction of the host innate response. **J. Virol.** 80 (15): 7600-7612. 2006.

PERERA, R. and Richard J. KUHN, R. J. Structural Proteomics of Dengue Virus. **Curr Opin Microbiol.** 11(4): 369–377. 2008;

POKIDYSHEVA, E. ZHANG, Y. BATTISTI, A. J. BATOR-KELLY, C. M. CHIPMAN, P. R. XIAO, C. GREGORIO, G. G. HENDRICKSON, W. A. KUHN, R. J. ROSSMANN, M. G. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. **Cell**, 124(3):485-493. 2006.

PRIYADARSHINI, D. GADIA, R. R. TRIPATHY, A. GURUKUMAR, K. R. BHAGAT, A. PATWARDHAN, S. MOKASHI, N. VAIDYA, D. SHAH, P. S. CECÍLIA, D. Clinical Findings

and Pro-Inflamatory Cytokines in Dengue Patients in Western India: A Facility-Based Study. **PLoS One** 5 (1): e8709. 2010.

PRYOR, M. J. CARR, J. M. HOCKING, H. DAVIDSON, A. D. LI, P. WRIGHT, P. J. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolated and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65 (5): 427-434. 2001.

QIN, S. ROTTMAN, J. B. MYERS, P. KASSAN, N. WEINBLATT, M. LOETSCHER, M. KOCH, A. E. MOSER, B. MACKAY, C. R. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. **J. Clin. Invest.** 101: 746-754. 1998.

RACHMAN, A. RINALDI, I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. **Acta Med. Indones.** 38 (2): 105-108. 2006.

RELLOSO M. KROEGER, A. P. PELLO, O. M. RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. L. LA ROSA, G. DE. LONGO, N. NAVARRO, J. MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A. SÁNCHEZ-MATEOS, P. CORBÍ, A. L. DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF- β and Anti-Inflammatory Agents. **J. Immunol.**, 168: 2634-2643. 2002.

REY, F. A. HEINZ, F. X. MANDL, C. KUNZ, C. HARRISON, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2Å resolution. **Nature** 375: 291-298. 1995.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244-51, 1997.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, p. 2773-2786, 2010;

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; BERNAL-RUBIO, D., et al. Inhibition of Type I IFN Response in Human Dendritic Cells by Dengue Virus Infection Requires a Catalytically Active NS2B3 Complex. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 9760-9774, 2010a.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; BERNAL-RUBIO, D.; KAMINSKI, D.; BOYD, K.; FERNANDEZ-SESMA, A. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. **Journal of virology**, v. 84, n. 9, p. 4845-50, 2010b.

ROTHMAN, A.L. Viral pathogenesis of dengue infections. In D. J. Gubler, G. Kuno. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International, New York, NY. 1997.

ROTHMAN, A. L. ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Viol.** 257: 1-6. 1999.

SAKUNTABHAI, A. TURBPAIBOON, C. CASADEMONT, I. CHUANSUMRIT, A. LOWHNOO, T. KAJASTE-RUDNITSKI, A. KALAYANAROOJ, S. M. TANGNARARATCHAKIT, K. TANGTHAWORNCHAIKUL, N. VASANAWATHANA, S. CHAIYARATANA, W. YENCHITSOMANUS, P. T. SURİYAPHOL, P. AYIRUTNAN, P. CHOKEPHAIBULKIT, K. MATSUDA, F. YOKSAN, S. JACOB, Y. LATHROP, G. M. MALASIT, P. DESPRÈS, P. JULIER, C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nat. Genet.**, 37(5):507-513. 2005.

SALAEMAE, W.; JUNAID, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; KATZENMEIER, G. Structure-guided mutagenesis of active site residues in the dengue virus two-component protease NS2B-NS3. **Journal of biomedical science**, v. 17, p. 68, 2010.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Monocytes Join the Dendritic Cell Family. *Cell*, v. 143, n. 3, p. 339-340, 2010.

SATTHAPORN, S.; EREMIN, O. Dendritic cells: Biological functions. **Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh**, v. 46, n. 1, p. 9-19, 2001.

SIMMONS, C. P. CHAU, T. N. THUY, T. T. TUAN, N. M. HOANG, D. M. THIEN, N. T. LIEN LE, B. QUY, N. T. HIEU, N. T. HIEN, T. T. MCELNEA, C. YOUNG, P.

WHITEHEAD, S. HUNG, N. T. FARRAR, J. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. **J. Infect. Dis.** 196 (3):416-424. 2007.

SCHATZMAYRY, H.; RITA MAFNA R. NOGUEIRA, R.; ROSA, A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro -1986 **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 81(2) :245-246, abr./jun. 1986

SUBRAMANYA S. KIM, S. S. ABRAHAM, S. YAO, J. KUMAR, M. KUMAR, P. HARIDAS, V. LEE, S. K. SCHULTZ, L. D. GREINER, D. MANJUNATH, N. SHANKAR, P. Targeted Delivery of Small Interfering RNA to Human Dendritic Cells To Suppress Dengue virus Infection and Associated Proinflammatory Cytokine Production. **J. Virol.**, 84 (5): 2490-2501. 2010.

SUN, P. FERNANDEZ, S. MAROVICH, M. A. PALMER, D. R. CELLUZZI, C. M. SUN, W. BURGESS, T. H.. Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. **Virol.**, 383: 207-215. 2008.

TALAVERA, D. CASTILLO, A. M. DOMINGUEZ, M. C. GUTIERREZ, A. E. MEZA, I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. **J. Gen. Virol.** 85: 1801-1813. 2004.

TAMURA, K. DUDLEY, J. NEI, M. KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24: 1596-1599. 2007.

UBOL, S. CHAREONSIRISUTHIGUL, T. KASISITH, J. KLUNGTHONG, C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. **Virology** 376 (2): 290-296. 2008.

VAUGHN, D. W. Invited commentary: Dengue lessons from Cuba. **Am. J. Epidemiol.** 152 (9): 800-803. 2000.

ZUKER, M. MATHEWS, D. H. TURNER, D. H. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In J. Barciszewski, and B. F. C. Clark (ed), RNA Biochemistry and Biotechnology. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA. 1999.

WARKE, R. V. XHAJA, K. MARTIN, K. J. FOUNTIER, M. F. SHAW, S. K. BRIZUELA, N. BOSCH, N. DE. LAPOINTE, D. ENNIS, F. A. ROTHMAN, A. L. BOSCH, I. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. **J. Virol.** 21: 11822-11832. 2003.

WHO - World Health Organization, Impact of dengue.
<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>. Accessed on 11/01/2011. 2009.

WHO - World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>.

Accessed on 02/18/2010. . 1997.

YEN, Y. T. CHEN, H. C. LIN, Y. D. SHIEH, C. C. WU-HSIEH, B. A. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. **J. Virol.** 82 (24): 12312-12324. 2008.

10. ANEXOS

Tabela 10.1: Descrição dos genes modulados nas mdDCs infectadas com a cepa DENV/3/5532, comparadas com os valores de intencidade de expressão nas mdDCs infectadas com mock.

Função Geral	Função Específica	Processo Biológico	Gene ID (Affymetrix)	Simbolo do Gene	Nome do Gene	Entrez	6h	12h	24h	48h
Resposta Imune	Atividade 2'-5'-oligoadenilato sintetase	Processos de Catabolismo de RNA	7958913	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	4939	0.53	0.58	1.17	2.23
	Ligante de ATP	ND	8015511	DHX58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	79132	0.33	0.47	0.77	1.24
			7967117	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	8638	0.24	0.45	0.84	1.82
		Atividade de Nucleotidiltransferase	7958895	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	4940	0.35	0.54	1.09	2.50
	Atividade Quimiocina	Quimiotaxia	8006608	CCL4L1	Chemokine (C-C motif) ligand 4-like1	9560	-0.72	-1.21	-0.39	0.34
		Regulação da replicação do genoma viral	8014369	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	6348	-0.40	-1.20	-0.38	0.28
	Atividade Receptor de Citocina	Regulação positiva da proliferação de células T	8115570	IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)	3593	0.09	-0.45	0.21	1.44
		Ligante de Proteínas	7922337	TNFSF18	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	8995	0.50	-0.23	0.56	1.83
	Ligante de DNA	Resposta Imune Inata	8059650	SP110	SP110 nuclear body protein	3431	0.37	0.53	0.98	1.49

	Atividade GTPase		8068713	MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	4599	0.39	0.60	1.53	2.58
			8068697	MX2	Myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	4600	0.51	0.82	1.69	2.77
	Resposta Inflamatoria	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos	7905047	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)	2209	-0.72	-0.05	-0.69	-1.26
		Quimiotaxia	8101126	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3627	-1.21	-0.50	-0.12	1.55
			8101131	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	6373	0.10	-0.09	-0.56	1.81
		Resposta Imune Inata	8112428	CD180	CD180 molecule	4064	-1.13	-0.07	-0.52	-0.31
		Regulação Negativa de proliferação de células T ativadas	8146092	IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	3620	0.05	-0.70	-0.36	1.16
	ND	Ligante de Proteínas	7921434	AIM2	AIM2 absent in melanoma 2	9447	0.20	0.31	0.17	1.46
		Ligante de Carbohidratos	7953737	CLEC6A	C-type lectin domain family 6, member A	93978	-0.44	-0.83	-1.15	-0.17
	Resposta a vírus	Envelhecimento	7976443	IFI27	Interferon, alpha-inducible protein 27	3429	-0.09	0.35	0.29	1.79
		Transporte de Íons de Cálcio	8006453	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	6355	-0.21	-0.89	0.14	2.41
		Resposta a proteínas mal dobradas do Retículo Endoplasmático	8051501	EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	5610	0.40	0.55	1.12	1.85
		Resposta Imune Inata	8160559	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	23586	0.41	0.73	1.30	2.07
			8103563	DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	55601	0.15	0.51	0.78	1.49

			8103601	DDX60L	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60 L	91351	0.08	0.79	1.35	2.13
			8056285	IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1	64135	0.25	0.32	0.65	1.64
		Processo catabolico dependente de modificações proteicas	7896817	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	9636	0.02	0.23	0.65	1.75
		ND	8007446	IFI35	Interferon-induced protein 35	3430	0.29	0.33	0.74	1.52
			7902553	IFI44	Interferon-induced protein 44	10561	0.46	0.55	1.61	2.41
			7902541	IFI44L	Interferon-induced protein 44-like	10964	0.31	0.64	1.47	2.97
			7929065	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	3434	0.54	1.01	2.66	4.10
			7929047	IFIT2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	3433	0.43	0.77	2.48	3.85
			7929052	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	3437	0.28	0.20	1.27	2.34
			7929072	IFIT5	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	24138	0.61	0.28	0.73	1.56
			7938035	TRIM22	Tripartite motif-containing 22	10346	0.04	0.38	0.59	1.15
			7946089	TRIM5	Tripartite motif-containing 5	85363	0.56	0.47	0.57	1.17
		Regulação negativa de atividade de caspase	7914127	IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	2537	0.44	0.44	0.67	1.55
		Regulação negativa de proliferação celular	7945371	IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3 (9-27)	10410	0.15	0.62	0.41	1.86
		Regulação negativa de reprodução viral	7958884	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	4938	0.03	0.44	1.15	2.11

		Regulação positiva da produção de interleucina-6	8098611	TLR3	Toll-like receptor 3	7098	-0.08	0.44	-0.20	1.13
		Ligante de Proteínas	8024792	EBI3	Epstein-Barr virus induced 3	10148	-0.01	-0.13	0.29	1.40
		Somitogeneses	7937335	IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	8519	0.16	0.30	1.09	1.88
		Replicação de genoma viral	8006602	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	6351	-1.36	-1.59	-0.52	0.40
	Atividade Transdutor de Sinal	Via de sinalização proteica acoplada a proteína G	7908388	RGS1	regulator of G-protein signaling 1	5996	-0.44	-0.45	0.20	1.18
	Transdutor de Sinal	ND	8115327	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	6678	0.12	-0.12	-0.06	-1.11
	Receptor transmembrana da proteína tirosina quinase via de sinalização	Diferenciação de células mieloides	8095343	STAP1	Signal transducing adaptor family member 1	26228	0.12	0.26	0.64	1.99
	Ligante de Receptor de Fator de Necrose Tumoral	Indução de apoptose via sinalização extracelular	8092169	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	8743	0.25	0.33	1.06	2.25
Atividade Catalítica	Atividade Hidrolase	ND	8048717	SGPP2	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	130367	0.06	-1.15	-0.10	-0.15
	ND	Redução oxidativa	8117034	GMPR	Guanosine monophosphate reductase	2766	0.05	0.42	0.62	1.22
	Atividade Oxidoreductase		8146105	IDO2	Indoleamine 2,3-dioxygenase 2	169355	0.27	0.15	0.13	1.17
			8140840	STEAP4	STEAP family member 4	79689	0.02	-2.13	-1.38	-2.11
	Atividade serina/treonina proteíno fosfatase	Defosforilação proteica de amino ácidos	8101701	PPM1K	Protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	152926	0.13	0.38	0.41	1.32
	Resposta à vírus	Resposta de defesa contra vírus	8040080	RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	91543	-0.09	0.65	1.72	3.62

	Atividade ligante de Cadeia-muito-longa-de-ácido-graxo-CoA e de Cadeia-longa-de-ácido-graxo-CoA ligase activity	Processo metabólico de cadeias-muito-longa e cadeias-longa de ácidos graxos	7983650	SLC27A2	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	11001	-0.13	-0.42	0.22	1.25
Adesão Celular	Anti-apoptose	Regulação positiva de adesão célula-substrato	8096301	SPP1	Secreted phosphoprotein 1	6696	-0.51	-1.11	-0.65	-0.09
	Ancoragem de citoesqueleto na membrana plasmática	Ligante de Proteínas	8102998	GYPA	Glycophorin A (MNS blood group)	2993	0.30	0.04	-1.29	-0.14
	Ligante de Ácido Hialurônico		8045688	TNFAIP6	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	7130	-0.64	-0.99	0.04	1.39
	Via de sinalização mediada-por-integrina		8131666	ITGB8	Integrin, beta 8	3696	-0.49	-0.86	-0.07	1.16
	ND	Ligante de Heparina	8131844	GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	10457	-1.55	-1.01	-0.52	-0.41
		Ligante de Carbohidratos	8064716	SIGLEC1	Sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	6614	0.20	0.45	0.94	1.31
Proliferação Celular	Ligante de ATP	Atividade Transferase	8037298	CD177	KIT v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	3815	1.24	-1.58	1.24	-0.47
	Atividade de citocina	Regulação positiva da replicação de DNA	8095744	AREG	Amphiregulin	374	1.70	0.22	-0.39	0.39
	ND	Atividade de fator de transcrição	7907171	BLZF1	Basic leucine zipper nuclear factor 1	8548	0.33	0.35	0.31	1.13
	Proteólise	Atividade Metabólica	8118345	CFB	Complement factor B	629	0.10	0.00	0.08	1.12
	Response to vírus	Diferenciação de células mieloides	8091327	PLSCR1	Phospholipid scramblase 1	5359	-0.02	-0.02	0.89	1.65
Atividade Inibidora de	ND	ND	8171105	CRLF2	Cytokine receptor-like factor 2	64109	-0.16	0.13	0.28	1.47

Peptidase										
		Atividade inibitória de endopeptidase de serina	8021645	SERPINB10	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	5273	-0.06	-0.06	-0.06	1.56
	Atividade inibitória de endopeptidase tipo serine	Coagulação Sanguínea	8141016	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	7980	-0.43	0.32	-0.20	1.16
Atividade Transferase	Ligante de ATP	Atividade de Quinase	8050102	CMPK2	Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	129607	0.11	0.43	0.65	1.72
		Fosforilação de aminoácido de proteínas	7926821	MASTL	Microtubule associated serine/threonine kinase-like	84930	0.40	0.15	0.39	1.12
	Atividade Hidrolase	Processo metabólico de nucleotídeos	8138941	NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III	51251	0.17	0.83	0.73	1.43
	ND	Atividade Transferase ribosil ADP NAD ⁺	8090018	PARP9	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	83666	0.26	0.16	0.42	1.18
Interação Célula-Célula e Célula-Matrix	Ligante de Íon Zinc	ND	8073056	APOBEC3A	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	200315	-0.05	-0.31	0.44	2.24
		Proteolises	8115490	ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta)	8728	0.01	-0.20	-0.16	1.17
Bigante de Ciclina	Proteína de processo catabólico dependente de modificação	Atividade ácida de ligase de aminoácidos	8096335	HERC6	Hect domain and RLD 6	55008	0.19	0.33	1.32	2.53
		Atividade ligase de ubiquitinas em proteínas	8096361	HERC5	Hect domain and RLD 5	51191	0.22	0.92	1.94	3.10
Dedo de Zinco	ND	ND	8124498	ZNF204	Zinc finger protein 204 (pseudogene)	7754	0.59	0.87	1.14	0.28
			7953733	ZNF705A	Zinc finger protein 705 ^a	440077	1.22	0.10	-0.93	0.19
			7924821	ZNF847P	Zinc finger protein 847 (pseudogene)	401983	0.48	1.65	-0.90	-0.92
Desmossomo	Ligante de Íon Cálcio	Ligante de Proteínas	8020779	DSG2	Desmoglein 2	1829	0.34	0.04	0.21	1.26

Atividade de Fator de Crescimento	Ligante de Protein	Regulação positiva de diferenciação de macrófagos	7903786	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	1435	0.10	-1.20	-0.24	0.10
Hemopoiese	Diferenciação de Linfócitos	Diferenciação celular em progenitor de linfócitos	7970737	FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3	2322	0.16	0.19	0.11	1.26
Atividade de Canal de Íon	Complexo de Canal de Na ⁺ Voltagem Exclusivo	Transporte de Íons Sódio	8086283	SCN11A	Sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha subunit	11280	0.18	-0.04	0.10	1.52
Atividade Ligase	Ligante de GTP	Processo de biosíntese de nucleotídeos cíclicos	8097957	GUCY1A3	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	2982	-0.08	-0.26	-0.23	1.48
Ligante de Ácido Nucleico	Ligante de RNA	ND	7985777	ISG20	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	3669	-0.18	0.39	0.33	1.32
Atividade de Nucleosídeo-trifosfatase	Ligante de ATP	Dobramento de proteínas mediado por chaperona que requerem cofator	8158560	TOR1B	Torsin family 1, member B (torsin B)	27348	0.31	0.53	0.41	1.33
Crescimento de Órgãos	ND	ND	8148572	LY6E	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	4061	0.24	0.35	0.81	1.34
Atividade Peptidase	Atividade Hidrolase	Processo de catabolismo de proteínas dependente de ubiquitina	8074606	USP18	Ubiquitin specific peptidase 18	11274	0.16	0.53	1.64	3.12
Atividade de Receptor	Processos Metabólicos	Indução de apoptose via sinalização extracelular	8094240	CD38	CD38 molecule	952	-0.10	-0.22	0.52	1.69
Regador da apoptose	ND	ND	8004184	XAF1	XIAP associated factor 1	54739	0.18	0.27	0.74	1.43
		Ligante de Proteínas	8021470	PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	5366	0.15	-0.35	0.44	1.17
Atividade de Fator de Transcrição	Ligante de DNA Sequencia-especifica	Desenvolvimento de organismo multicelular	8088285	HESX1	HESX homeobox 1	8820	0.39	0.39	0.82	2.47
Tradução	ND	Constituinte estrutural de ribosse	8017262	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	83990	0.00	0.94	0.91	2.12

Atividade de Transporte	Atividade Hidrolase	Transporte intracelular de proteínas	8057959	PGAP1	Post-GPI attachment to proteins 1	80055	0.06	-0.01	0.88	1.33
ND	Ligante de Íon Cálcio	Ligante de Heparina	8089835	FSTL1	Follistatin-like 1	11167	-0.25	0.13	-0.13	1.24
	Membranda Intima Mitochondrial	Atividade de oxidação do citocromo-c	8168470	COX7B	Cytochrome c oxidase subunit VIIb	1349	-0.10	0.23	-0.21	-1.29
	ND	Processo de biosíntese de ácidos graxos	8112274	ELOVL7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)	79993	0.34	-0.21	-0.24	1.22
		ND	8020349	ANKRD20B	Ankyrin repeat domain 20B	729171	0.75	-1.44	0.35	0.12
			8012949	CDRT1	CMT1A duplicated region transcript 1	374286	-0.36	-1.17	0.36	-1.22
			7957508	CLLU1	Chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1	574028	0.03	0.08	1.22	0.44
			8149358	DEF109P1B	Defensin, beta 109, pseudogene 1B	641517	0.12	-1.32	0.14	-0.30
			7971296	EPST11	Epithelial stromal interaction 1 (breast)	94240	0.25	-0.10	0.62	1.15
			8155521	FAM27A	Family with sequence similarity 27, member A	548321	-1.15	0.28	-0.12	0.14
			8089478	GCET2	Germinal center expressed transcript 2	257144	0.08	-0.32	0.33	1.18
			8144526	LOC100129150	LP5624	100129150	-0.22	1.15	0.06	0.02
			7929533	LOC100131720	Hypothetical protein LOC100131720	100131720	-1.80	-1.28	-0.26	-0.13
			7980742	LOC283588	Hypothetical LOC283588	283588	-0.28	0.14	1.10	0.24
			8170257	LOC645188	Hypothetical LOC645188	645188	-0.65	-1.02	0.05	1.17

			7949410	MALAT1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	378938	-0.17	0.19	1.65	-0.41
			8177026	P2RY8	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8	286530	0.03	0.23	0.37	1.15
			8144802	PDGFRL	Platelet-derived growth factor receptor-like	5157	-0.35	0.11	0.64	2.16
			8052331	PNPT1	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	87178	0.27	0.67	1.09	1.85
			8151629	REXO1L1	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)-like 1	254958	-1.73	-0.21	-0.43	-0.04
			8076415	RNU13P1	Small nucleolar RNA, C/D box 13 pseudogene 1	6076	-2.05	0.15	0.03	-1.73
			7965036	RPL10P13	Ribosomal protein L10 pseudogene 13	390345	0.36	1.11	0.22	0.33
			8084732	RTP4	Receptor (chemosensory) transporter protein 4	64108	0.36	0.42	0.69	1.20
			8140967	SAMD9	Sterile alpha motif domain containing 9	54809	0.23	0.70	1.55	2.01
			8140971	SAMD9L	Sterile alpha motif domain containing 9-like	219285	0.31	0.21	0.52	1.30
			8151223	SLCO5A1	Solute carrier organic anion transporter family, member 5A1	81796	-0.17	0.23	0.11	1.33
			8014257	SLFN12L	Schlafen family member 12-like	342615	-0.16	0.67	0.84	1.11
		Ligante de Proteínas	7958377	BTBD11	BTB (POZ) domain containing 11	121551	-0.76	-0.40	-1.46	0.39
		Desenvolvimento dependente de Rhabdomere	8127396	EYS	Eyes shut homolog (Drosophila)	346007	0.47	-0.13	-0.09	1.24

	Ligante de RNA	Complexo Ribonucleoproteico	7982094	SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	6638	-0.36	-0.40	-0.18	-0.22
	Ligante à Seleno	Comportamento locomotor	8111915	SEPP1	Selenoprotein P, plasma, 1	6414	-0.15	0.10	1.28	0.76
	Ligante de Íon Zinco	Transporte de Íons Zinco	8101992	SLC39A8	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	64116	-0.01	-1.13	-0.56	-0.09

ND: Não Determinado;

Função Geral: é a descrição básica da ontologia do gene;

Função Específica: é a descrição da função específica do gene;

Processo Biológico: descrição do processo biológico ao qual o gene pode ser relacionado;

Gene ID: identificador do *cluster* de transcrição onde agrupa-se o gene, no *Human Gene chip 1 st v 1.0* (Affymetrix);

Simbolo do Gene: simbologia de acordo com Affymetrix;

Nome do Gene: nome do gene de acordo com o banco de dados ENTREZ;

ENTREZ: código do gene no banco de dados;

6h, 12h, 24h e 48h: variação, em Log_2 , de cada gene, em cada tempo de cultivo, após a diminuição de 2Log_2 ;

A classificação funcional dos genes foi obtida utilizando-se o pacote TANGO, do programa *Expander*, da consulta ao banco de dados *NCBI Entrez Gene* (www.ncbi.nih.gov) e da consulta ao banco de dados *Gene Ontology* (www.geneontology.org).

10.2 – Soluções:**NaCl 0,9%:**

9 g de NaCl;

1 L de H₂O Milique;

Filtrar em filtro 0,22 mm.

Tampão PBS/BSA/EDTA:

1 L Phosphate-Buffered Saline 1X
(PBS);

5 g Bovine Serum Albumin (BSA);

0,58 g Etilenodiaminotetracético
(EDTA);

Ajustar o pH para 7,2;

Filtra em filtro 0,22 mm.

Solução de Lise (NH₃Cl₂):

0,89 g Cloreto de Amônio (NH₄Cl);

0,034 g Etilenodiaminotetracético
(EDTA);

0,08 g Bicarbonato de Sódio
(NaHCO₃);

100 mL de H₂O Milique;

Filtrar em filtro de 0,22 mm;

Meio RPMI 1640 completo:

500 mL de RPMI 1640 + CH₂Na;

50 mL de Soro Fetal Bovino (SFB);

5,25 mL de Glutamina (10.000 U/mL);

5,25 mL de Penicilina/Streptomicina
(50 U/mL);

Filtrar em filtro de 0,22 mm;

Meio L15 completo para C6/36:

500 mL de L15;

25 mL de Soro Fetal Bovino (SFB);

1,5 mL de Gentamicina;

0,4 mL de Triptose;

Filtrar em filtro de 0,22 mm;

Azul de Cristal Violeta:

2,5 g de Cristal Violeta;

32 mL de Formamida 100%;

48 mL de H₂O;

1,7 g de NaCl;

223 mL de Etanol P.A.;

Tampão de Bloqueio:

50 mL de PBS 1X (Filtrar em filtro de
0,22 mm);

0,5 mL de Soro Humano estéril;

0,5 mL de SFB estéril;

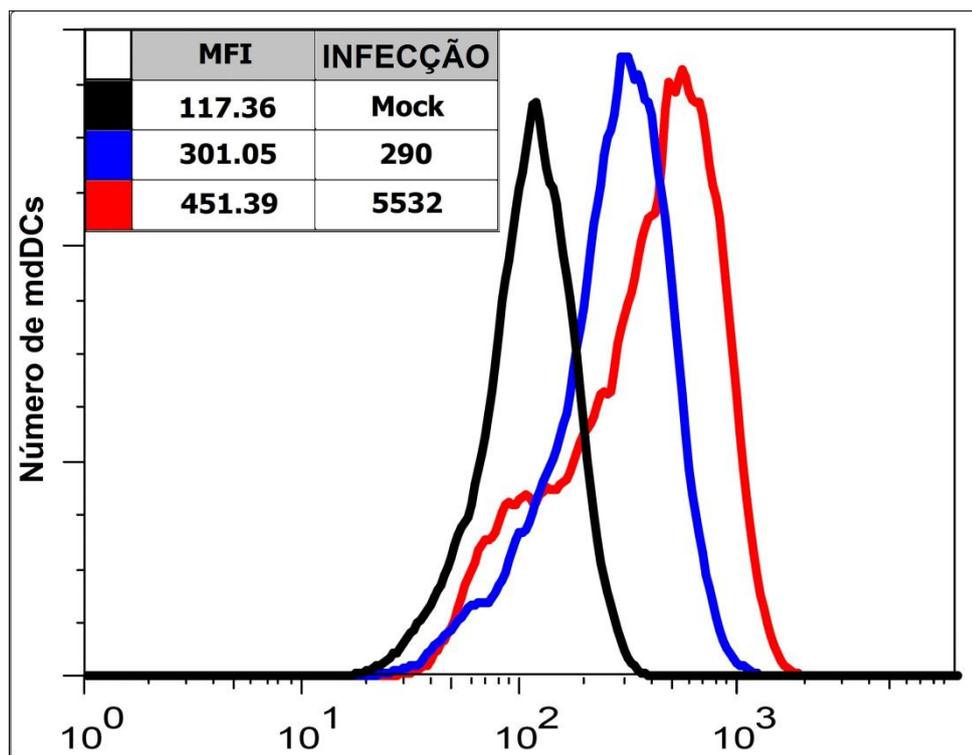


Figura 10.1: Histograma de análise da expressão de CD40 em mdDCs infectadas com DENV/3 ou mock. DENV/3/5532 induz um aumento mais significativo nos níveis de expressão nas moléculas associadas à maturação quando comparados com DENV/3/290 ou mock. Dado representativo de três experimentos independentes.

JVI Accepts, published online ahead of print on 30 March 2011

J. Virol. doi:10.1128/JVI.01915-10

Copyright © 2011, American Society for Microbiology and/or the Listed Authors/Institutions. All Rights Reserved.

1

1 **Dengue virus type-3 isolated from a fatal case with visceral complications**

2 **induces enhanced pro-inflammatory responses and apoptosis of human**

3 **dendritic cells**

4 Running title: **DENV-3 from fatal case induces inflammatory responses in**

5 **mdDCs**

6 Guilherme F. Silveira¹, Florencia Meyer^{1#}, Adriana Delfraro^{1,2}, Ana Luiza P.

7 Mosimann¹, Norma Coluchi³, Cyntia Vasquez³, Christian M. Probst⁴, André Báfica⁵,

8 Juliano Bordignon^{1*}, Claudia N. Duarte dos Santos^{1*}