Andréia Manso de Matos

**Perfil fenotípico de linfócitos T CD8+ na fase aguda da
dengue**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

São Paulo
2011

Andréia Manso de Matos

**Perfil fenotípico de linfócitos T CD8+ na fase aguda da
dengue**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Matos, Andréia Manso de

Perfil fenotípico de linfócitos T CD8+ na fase aguda da dengue / Andréia
Manso de Matos. -- São Paulo, 2011.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Dengue 2.Linfócitos T CD8 positivos 3.Ativação celular
4.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-284/11

Dedico este trabalho às famílias das vítimas da dengue

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Esper Kallás pela imensa paciência durante a minha permanência no laboratório.

À minha família por ajudar a tornar meus sonhos possíveis.

À Dra Karina Carvalho pelo auxílio nos experimentos e principalmente por ter me ajudado a ser uma pessoa forte.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelas discussões enriquecedoras.

Aos colegas de laboratório do LIM-60: Leandro, Rafael, Susan, Thaís e Bianca, por todo carinho e ajuda neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

À Universidade de São Paulo pelo alojamento concedido.

À equipe do Instituto de Medicina Tropical por todo auxílio laboratorial e principalmente pela amizade.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Alergia e Imunopatologia, Tânia e Andréia, pela ajuda com as questões burocráticas.

À querida Cândida e ao Issler por torcerem sempre por mim me incentivando durante todo esse tempo.

Sumário

Resumo.....	12
Abstract	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Resumo do Histórico da Dengue.....	14
1.2. O Vírus	17
1.2.1. Ciclo de Replicação do Vírus.....	20
1.2.2. Classificação dos Sorotipos.....	22
1.3. Dengue no Brasil.....	23
1.4. Patogênese da Dengue.....	26
1.4.1. Ligação do vírus a célula.....	26
1.4.2. Dengue grave.....	27
1.4.3. Resposta Imune de Células T:	30
1.4.4. Linfócitos T de Memória e contribuições na patogênese da doença	31
1.5. Quadro clínico do paciente.....	32
1.6. Diagnóstico	35
1.6.1 Isolamento viral:.....	35
1.6.2. Testes sorológicos:	36
1.6.3. Ensaio de neutralização:	37
1.6.4. Transcriptase reversa PCR (RT-PCR):.....	37
1.6.5. RT-PCR em tempo real:	37
1.6.6. Detecção de antígeno:	38
1.6.7. Teste de Avididade de IgG	38
1.7.Tratamento	38
2. OBJETIVOS	39
3. MÉTODOS	40
3.1. Integrantes da pesquisa.....	40
3.2. Critérios de inclusão para coleta de sangue periférico	40
3.3. Recrutamento	40
3.4. Procedimento de coleta e preparo das amostras	41
3.5. Variáveis Hematológicas – Hemograma	42
3.6. Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico - CMSP.....	43
3.7. Técnica de citometria de fluxo	44

3.7.1 Contagem de Células T CD4+ e CD8+	44
3.7.2. Marcação de moléculas de superfície e intracelular em CMSP.	44
3.8. Métodos utilizados para o diagnóstico da doença	48
3.8.1. Teste rápido (Dengue Duo - Bioeasy)	48
3.8.2. Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)	48
3.8.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	49
3.9. Análise Estatística	49
4. RESULTADOS	50
4.1. Características dos indivíduos envolvidos no estudo	50
4.2. Parâmetros hematológicos.....	53
4.2.1. Plaquetas	53
4.2.2. Leucócitos	53
4.2.3. Linfócitos	54
4.3. Linfócitos T	56
4.3.1. Linfócitos T CD3+	56
4.3.2. Linfócitos T CD4+	57
4.3.3. Linfócitos T CD8+	59
4.3.4. Razão CD4/CD8.....	60
4.4. Linfócitos T CD8+ e carga viral	61
4.5. Proliferação de linfócitos T CD8+	62
4.6. Ativação de linfócitos T CD8+	63
4.7. Subpopulações de linfócitos T CD8+ <i>naïve</i> e de memória	64
4.7.1. Linfócitos T CD8+ <i>Naïve</i>	65
4.7.2. Linfócitos T CD8+ de Memória Central	65
4.7.3. Linfócitos T CD8+ de Memória Efetora (CD45RA+)	66
4.7.4. Linfócitos T CD8+ de Memória Efetora (CD45RA-)	67
4.7.5. Linfócitos T CD8+ de Memória Altamente Diferenciada (CD45RA+).....	68
4.7.6. Linfócitos T CD8+ de Memória Altamente Diferenciada (CD45RA-).....	69
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	78
7. ANEXOS.....	79
7.1. Anexo A - Aprovação CAPPesq	79
7.2. Anexo B – Submissão para publicação de artigo científico	80
8. REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
APC	Aloficocianina
C	Proteína do Capsídeo
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCR7	Receptor de Quimiocina do tipo 7
CD	Designação de grupos
DEN	Vírus da dengue
DMSO	Dimetil-sulfóxido
EBV	Vírus <i>Epstein Barr</i>
E	Proteína do envelope viral
<i>et al</i>	E outros
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz
FSC-H	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz que mede a altura
FSC-A	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz que mede a área
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígeno leucocitário Humano da subclasse DR
HLA-DQ	Antígeno leucocitário Humano da subclasse DQ
HLA-DP	Antígeno leucocitário Humano da subclasse DP
IFN- α/β	<i>Interferon</i> alfa e beta
IFN- α	<i>Interferon</i> alfa
IFN- γ	<i>Interferon</i> gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	Quilobase
IL-2	Interleucina 2
IMT	Instituto de Medicina Tropical
LIM-60	Laboratório de Investigação Médica 60

mL	Mililitro
M	Molar
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2 A/B	Proteínas não estruturais 2 A e B
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4 A/B	Proteínas não estruturais 4 A e B
NS5	Proteína não estrutural 5
NK	Matadoras naturais
nm	Nanômetro
°C	Grau centígrado
prM	Proteína precursora de membrana
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PE	Ficoeritrina
PercP	Proteína clorofilperidina
R10	Meio RPMI suplementado com 10% de SFB
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura para células desenvolvido pelo instituto <i>Roswell Park Memorial</i>
RT	Transcriptase reversa
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	<i>Side Scatter</i> – dispersão lateral da luz
SSD	Síndrome do choque da dengue
TDR	Pesquisa e treinamento em doenças tropicais
TEM	Células T de memória efetora
TEMRA	Células T de memória efetora altamente diferenciada
TNF-a	Fator de necrose tumoral alfa
OMS	Organização mundial da saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Países e áreas em risco de transmissão de dengue	16
Figura 2: Distribuição temporal do <i>A. aegypti</i> nas Américas	17
Figura 3: Ciclos de transmissão do vírus da dengue	18
Figura 4. Estrutura viral	20
Figura 5. Ciclo de replicação viral	21
Figura 6 – Curso clínico da dengue	33
Figura 7. Estratégia de análise para avaliar a ativação de células T naïve e de memória.	46
Figura 8. Estratégia de análise para avaliar a expressão do Ki67 em células T CD8+.	47
Figura 9. Alterações plaquetárias	53
Figura 10. Leucopenia	54
Figura 11. Avaliação de linfócitos totais em pacientes com dengue e em voluntários saudáveis	55
Figura 12. Avaliação de linfócitos T CD3+	57
Figura 13. Avaliação de linfócitos T CD4+.	58
Figura 14. Avaliação de linfócitos T CD8+.	60
Figura 15. Avaliação da razão CD4/CD8.	61
Figura 16. Análise de Correlação entre carga viral versus número absoluto de linfócitos T CD8+ em pacientes acometidos por dengue observados em diferentes dias de sintomas.	61
Figura 17. Proliferação de Linfócitos T CD8+	63
Figura 18. Ativação de linfócitos T CD8+	64
Figura 19. Ativação de Linfócitos T CD8+ naïve.	65
Figura 20. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória central	66
Figura 21. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória efetora CD45RA+	67
Figura 22. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória efetora CD45RA-	68
Figura 23. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória altamente diferenciada CD45RA+	69
Figura 24. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória altamente diferenciada	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas de pacientes com dengue e dos indivíduos saudáveis	50
Tabela 2: Características laboratoriais de pacientes com dengue e indivíduos saudáveis	51
Tabela 3: Características demográficas e hematológicas dos pacientes do estudo	52

Matos, AM. Perfil fenotípico de linfócitos T CD8+ na fase aguda da dengue. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011

Resumo

A dengue é uma doença infecciosa aguda causada pelo vírus DEN do gênero *Flavivirus* e é transmitida pela picada de um mosquito vetor, principalmente o *Aedes aegypti*. Existem quatro sorotipos do vírus da dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) e sua incidência tem aumentado dramaticamente nos últimos 50 anos, inclusive no Brasil. O objetivo deste trabalho é caracterizar subpopulações de linfócitos T, principalmente linfócitos T CD8+, provenientes de pacientes infectados quanto a sua capacidade proliferativa, seu estado de ativação e memória celular. Os pacientes foram recrutados no Hospital Ana Costa de Santos, SP, no ano de 2010, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O diagnóstico de dengue foi realizado utilizando o teste rápido Dengue Duo e os parâmetros imunológicos foram analisados no citômetro de fluxo. Foi coletado sangue periférico para criopreservação de células mononucleares e separação de soro para detecção da carga viral. Pacientes com dengue apresentaram maior proliferação de linfócitos T CD8+ quando comparados com indivíduos saudáveis. Foi ainda observado que tal proliferação celular foi evidente nos dias cinco e seis de sintomas. Quando marcadores de ativação celular foram analisados por citometria de fluxo, observou-se um aumento de linfócitos T CD8+ expressando CD38 e HLA-DR nos pacientes, quando comparados com indivíduos saudáveis. Da mesma forma, a ativação celular também aumentou com o passar dos dias de sintomas com destaque para o quinto e sexto dia. Este aumento na ativação das células juntamente com os dias de sintomas, foi igualmente observado em várias subpopulações de células T de memória. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre o número absoluto de linfócitos T CD8+ e a carga viral. Juntos, os resultados desse estudo sugerem que a infecção por DEN leva a um aumento da ativação de células T CD8+.

Descritores: Dengue; Linfócitos T CD8 positivos; Ativação Celular; Citometria de Fluxo

Matos, AM. *Phenotypic profile of CD8+ T cells in acute dengue infection* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011

Abstract

Dengue is an acute disease caused by DEN, a *Flavivirus* transmitted by a mosquito vector, primarily *Aedes aegypti*. There are four serotypes of dengue viruses (DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4) and their incidences have increased dramatically over the past 50 years, including in Brazil. The goal of this study is to characterize subpopulations of T lymphocytes, mainly CD8+ T cells, from infected patients. Status of cell activation, and memory cell profiles were assessed. Patients were recruited at Hospital Ana Costa, Santos-SP, Brazil, in 2010, after having signed an informed consent form. The serologic diagnosis of dengue was carried out using a rapid test and immunological parameters were analyzed in flow cytometer. Peripheral blood was collected for cryopreservation of mononuclear cells and separation of serum for viral load testing. Dengue patients showed higher proliferation of CD8+ T cells compared to healthy subjects. Cell proliferation was more evident in the fifth and sixth days of symptoms. We observed increased frequency of CD8+ T cells expressing activation markers CD38 and HLA-DR in patients, when compared to healthy subjects. Similarly, T cell activation also increased along with the passing days of symptoms hitting on the fifth and the sixth days. Such augment in cellular activation along with the days of symptoms was equally observed in the several memory T cell compartments. Furthermore, we observed a negative correlation between the absolute number of CD8+ T lymphocytes and viral load. Together, the results of this study suggest that dengue virus infection leads to an increased activation of CD8+ T cells.

Descriptors: Dengue; CD8 positive T Lymphocytes; Cellular Activation; Flow Cytometry

1. INTRODUÇÃO

A dengue consiste em uma doença aguda viral, causada por um flavivírus que é responsável por um grande número de casos nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. É um importante problema de saúde pública, já que o controle da transmissão via picada de um mosquito vetor, é difícil. Está associada à morbidade e mortalidade significativas e medicamentos antivirais ou vacinas eficazes não são disponíveis.

1.1. Resumo do Histórico da Dengue

A primeira descrição precisa da dengue foi feita por Benjamin Rush em 1780 durante uma epidemia na Filadélfia, Estados Unidos, sendo denominada de “febre quebra-ossos”, pois os sintomas eram similares ao de um reumatismo, com dores nas articulações e músculos (Rush, 1805)

O agente responsável pela transmissão do vírus causador da doença foi primeiramente descrito no início do século XX, por Graham Harris seguido de Ashburn e Craig. Por meio de experimentos de transmissão viral, demonstrou-se que várias espécies de mosquitos, como *Culex quinquefasciatus*, seriam capazes de transmitir o vírus da dengue. Em ensaios subsequentes, o mosquito *Aedes aegypti* demonstrou possuir a maior capacidade de se infectar e de transmitir a doença, e, portanto, foi considerado como o vetor mais comum (Vazeille-Falcoz *et al.*, 1999).

Nesta época, o vírus da dengue já tinha se disseminado pelos trópicos em virtude do progresso das navegações e consequente comércio marítimo, transferência de animais, populações humanas e, principalmente, de doenças transmissíveis entre o ocidente e o oriente. O mosquito foi capaz de manter seu ciclo reprodutivo em reservatórios de água de navios, infectando os tripulantes. A doença tornou-se endêmica em regiões tropicais e, à medida que os navios chegavam aos portos, tanto o vírus como o mosquito eram introduzidos (Gubler, 2002).

Devido ao lento transporte marítimo, as epidemias ocorriam em intervalos de 10 a 40 anos. A ocorrência temporalmente isolada das epidemias dificultou a introdução de diferentes tipos do vírus em uma mesma região. Durante a Segunda Guerra Mundial, houve uma mudança radical na dinâmica de transmissão da doença,

com crescente multiplicação do mosquito. Isso ocorreu em consequência do deslocamento de tropas, alterações ecológicas e aumento de grupos vivendo em situação precária de saneamento (Gubler, 2002).

O efeito da doença durante a guerra, entre as décadas de 1940 e 1950, estimulou as operações militares americanas a pesquisar a dengue. Ainda, houve uma grande necessidade de se obter um agente imunizante capaz de proteger contra a doença. Os avanços dos estudos, com destaque aos conduzidos por Albert Sabin, contribuíram com a identificação de distintos tipos do vírus DEN, denominados sorotipos. Foram também caracterizadas as manifestações clínicas nos casos de re-infecção por sorotipos diferentes e a ocorrência de mais de um sorotipo viral na mesma região. Nessa época, a imunidade tipo-específica para dengue foi associada a anticorpos neutralizantes contra o vírus (Sabin, 1952).

A existência de sorotipos distintos identificados por Albert Sabin foi confirmada posteriormente por Hammon. Seus estudos demonstraram a ausência de proteção cruzada entre os sorotipos e a existência de associações de intensidade variável entre sorotipos e as respectivas manifestações clínicas (Hammon *et al.*, 1960). Assim, observou-se que o espectro clínico da doença incluía desde a evolução benigna, conhecida como febre da dengue (FD), até quadros mais graves como a síndrome hemorrágica e o choque associado dengue (FHD/SSD) (Halstead, 1988).

Nas Américas, a FHD foi primeiramente reportada em Cuba em 1981 após a introdução do sorotipo viral dois, proveniente do Sudeste Asiático (Rico-Hesse, 1990; Rico-Hesse *et al.*, 1997). A partir de então, outros países das Américas relataram associação com este sorotipo, porém com genótipo diferente (Rico-Hesse, 1990).

Nos últimos cinquenta anos, a incidência de dengue aumentou em trinta vezes devido à sua expansão geográfica (Figura 1). Na presente década, a doença foi identificada também em áreas rurais. No Brasil, uma análise de fatores de risco foi realizada em uma área rural da Amazônia, verificando a presença de anticorpos anti-DEN ao analisar indivíduos que sofreram soro conversão, após 6 a 12 meses de seguimento (da Silva-Nunes *et al.*, 2008). Estima-se que 50 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente no mundo, porém o número e a frequência de casos graves pode variar entre os países. Além desta estimativa, sabe-se ainda que

aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países atingidos pela dengue (OMS, 2009).

Figura 1: Países e áreas em risco de transmissão de dengue. A transmissão é documentada preferencialmente nas áreas tropicais e subtropicais do globo, incluindo países nas Américas, África e Ásia. Adaptado de documento da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2009).

A epidemia de dengue hemorrágica se concentrou no sudeste asiático durante os anos 70 devido ao fato das ilhas do pacífico serem isoladas e, principalmente, pelo sucesso da erradicação do mosquito *A. aegypti* pelo programa de combate a febre amarela nas Américas. Com o fracasso deste programa, porém, o mosquito foi reintroduzido atingindo diversas regiões (Figura 2). Isto se deve a progressiva urbanização, ao crescimento populacional e ao aumento da mobilidade de pessoas ao redor do mundo, fazendo com que ocorresse um aumento do impacto desta doença na saúde pública (Gubler, 2006). Além disso, a perspectiva do aquecimento global traz a preocupação da expansão das áreas em direção aos pólos, aumentando a necessidade do desenvolvimento de uma vacina preventiva eficaz (Swynghedauw, 2009).

Figura 2: Distribuição temporal do *A. aegypti* nas Américas. Os mapas mostram a retração da presença do mosquito de 1930 a 1970, seguida de nova expansão até 2001, quando é encontrado em uma vasta extensão do continente. Extraído de (Gubler, 2002).

1.2. O Vírus

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Outras doenças virais como as causadas pelo vírus do oeste do Nilo, o da encefalite japonesa e da febre amarela, também estão incluídos nesta classificação (Halstead, 2008).

Acredita-se que o vírus tenha emergido de vetores silváticos como o *Aedes spp.* provenientes de florestas do Sudeste Asiático e da África e, nestes locais, fora mantido um ciclo entre o vetor e primatas não humanos (Kyle e Harris, 2008).

Os vírus circulantes de florestas são filogeneticamente distintos daqueles do ciclo urbano, embora algumas cepas possam ocasionalmente provocar doença em humanos (Wang *et al.*, 2000). Estudos revelaram que espécies silváticas de *Aedes* provenientes da África, foram altamente suscetíveis a alguns sorotipos do vírus, tanto em ciclos silváticos quanto endêmicos. A princípio esta afirmação justificou o aumento na capacidade de adaptação do vírus em mosquitos peri-domésticos como *A. aegypti* e *A. albopictus* (Diallo *et al.*, 2005). Os ciclos periódicos de infecção entre

o *A. aegypti* e o homem, permitiu que houvesse a manutenção da circulação viral nas regiões (Figura 3) (Gubler, 2004).

Figura 3: Ciclos de transmissão do vírus da dengue. No ciclo silvático o vírus circula entre macacos e mosquitos em florestas. O ser humano é infectado quando entra na floresta e é picado por mosquitos infectados. No ciclo urbano, o vírus é transmitido entre seres humanos através da picada de mosquitos infectados. Adaptado de (Gubler, 2004).

Os diferentes tipos do vírus da dengue (sorotipos) evoluíram de forma independente a partir de um vírus silvático ancestral e se tornaram distintos evolutivamente (Wang *et al.*, 2000).

Em geral, os *Flavivirus* apresentam características muito semelhantes entre si. A organização genômica, as estratégias de replicação viral e o perfil diversificado de manifestação clínicas em humanos, são exemplos destas homologias (Chambers *et al.*, 1990). Além disso, em testes sorológicos há reatividade antigênica cruzada, pois compartilham de um mesmo grupo de epítomos na proteína do envelope viral (E) (Gubler, 1998).

Quanto à morfologia os *Flavivirus* possuem aproximadamente 50 nm de diâmetro e são formados externamente por uma bicamada lipídica, que compõe o envelope viral. No interior deste envelope há um capsídeo icosaédrico onde o genoma encontra-se inserido (Rice *et al.*, 1985) (Figura 4B).

O material genético é constituído de uma fita simples de RNA com polaridade positiva, tamanho aproximado de 11 kb que é traduzido em um precursor de poliproteínas. A partir desta molécula precursora, originam-se 10 proteínas

classificadas como estruturais e não estruturais: C, prM e E; e NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e NS5, respectivamente (Perera e Kuhn, 2008). Por meio dessas proteínas o vírus consegue utilizar a maquinaria da célula hospedeira para completar seu ciclo infeccioso (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009).

O vírus da dengue, em sua conformação imatura, apresenta projeções na região do envelope, compostas por dímeros de proteína (E) associados a proteínas precursoras de membrana (prM). O peptídeo “pr” é clivado da prM durante o processo de maturação mas a proteína M ainda permanece unida a E (Perera e Kuhn, 2008).

As proteínas mais importantes para a replicação viral tem se limitado as NS2B-NS3 e NS5. Porém estudos destacam a relevância da proteína NS4A como responsável pelo rearranjo das membranas internas células, permitindo a síntese e a montagem viral (Miller *et al.*, 2007).

A NS1 está relacionada à defesa viral, pois age inibindo a ativação do sistema complemento. A NS3 tem função enzimática na formação de poliproteínas virais, agindo como a protease e a helicase. A proteína NS4B promove a união entre as proteínas e é também conhecida como bloqueadora da resposta de interferon tipo I (IFN- α/β) (Chambers *et al.*, 1990). A NS5 representa a enzima RNA polimerase, responsável pela replicação do RNA viral juntamente com a glicoproteína E (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009).

As Figuras 4A e 4B trazem os detalhes da organização genômica viral e a função das proteínas.

Figura 4: Estrutura viral. A. A poliproteína precursora é clivada em três proteínas estruturais (em verde) e sete proteínas não estruturais (em vermelho) e neste esquema estão descritas as funções dessas proteínas durante a infecção. Adaptado de (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009). B. Desenho esquemático do vírus mostrando suas proteínas estruturais – adaptado de (Trust, 2011).

1.2.1. Ciclo de Replicação do Vírus

O vírus entra na célula alvo através de receptores de endocitose e são dirigidos ao endossomo, cuja acidez do meio é capaz de induzir uma mudança conformacional na glicoproteína do envelope viral (E), induzindo a fusão do vírus com a membrana do endossomo (Bressanelli *et al.*, 2004). Em seguida há a liberação do genoma viral que é formado por uma fita de RNA simples, positiva. Este genoma é processado e traduzido em poliproteínas virais estruturais e não estruturais.

Simultaneamente à síntese protéica, ocorre a replicação do RNA de fita positiva, formando um RNA complementar, de fita negativa que é utilizado como molde para que ocorra a transcrição de novos RNAs de fita positiva. O RNA positivo formado pode iniciar um novo ciclo de tradução ou se agrupar dentro de vírions na superfície do retículo endoplasmático. Os vírions são transportados para a face côncava do complexo de Golgi (trans-Golgi) onde há clivagem de proteínas gerando partículas infecciosas maduras que são liberadas por exocitose (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009).

Figura 5: Ciclo de replicação viral. As etapas do ciclo de replicação do vírus é dividida didaticamente em números: (1) Internalização da partícula viral. (2) Fusão da vesícula endocitótica + endossomo. (3) Liberação do RNA de fita simples positiva no citoplasma. (4) Formação das poliproteínas virais. (5) Replicação do RNA (+) formando RNA complementar (-). (6) Formação do vírion no retículo endoplasmático. (7) Amadurecimento da partícula viral infecciosa no complexo de Golgi. (8) Brotamento da partícula viral.

1.2.2. Classificação dos Sorotipos

O vírus da dengue pode ser classificado em diferentes sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Sabin, 1952). O seqüenciamento de ácidos nucleicos confirmou a homologia dos 4 sorotipos bem como sua organização genética, permitindo uma classificação abrangente e precisa do vírus da dengue (Rico-Hesse, 1990).

Baseado na análise das sequências completas do gene do envelope (E), DEN-1 possui de quatro a cinco genótipos distintos incluindo o clado silvático (Zhang *et al.*, 2005). DEN-2 está dividido em seis subtipos designados: Silvático, Americano, Cosmopolita, Asiático 1, Asiático 2 e Americano-Asiático (Wang *et al.*, 2000). DEN-3 está subdividido em quatro genótipos (Holmes e Twiddy, 2003) e o DEN-4 em dois genótipos endêmicos e um genótipo silvático (Wang *et al.*, 2000), além de ser o sorotipo mais divergente seguido de DEN-2, DEN-1 e DEN-3 (Zanotto *et al.*, 1996).

Análises genômicas realizadas em isolados de DEN-2 provenientes do Brasil, identificaram a co-circulação de duas linhagens distintas dos genótipos Americano e Asiático (Miagostovich *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2010). Um estudo recente demonstrou que a circulação do vírus no estado do Rio de Janeiro, em 2007 e 2008, foi geneticamente distinta de isolados de 1990 a 1998, sugerindo uma evolução local da cepa de DEN-2 ou seria uma co-circulação de linhagens distintas no país (Oliveira *et al.*, 2010).

Nosso grupo publicou um estudo recente de caracterização filogenética deste sorotipo onde foram analisados os níveis moleculares e filogenéticos virais causadores da epidemia ocorrida em 2010, nas cidades de Guarujá e Santos bem como nas áreas em torno. As análises filogenéticas de DEN-2, baseadas nas sequências dos genes de parte do envelope, mostraram que o vírus causador da presente epidemia tratava-se de um taxa irmão identificadas nas amostras de dois anos antes nas cidades do Rio de Janeiro e Ribeirão Preto. A presença do *A. aegypti* e frequentes viagens entre as regiões são circunstâncias necessárias para a disseminação do vírus a partir de pacientes virêmicos que se deslocam entre essas cidades (Romano *et al.*, 2010).

1.3. Dengue no Brasil

Os primeiros relatos de dengue no país ocorreram no início do século XX, em São Paulo, SP e Niterói, RJ (Pedro, 1923). Mais tarde, em 1953/1954, um inquérito sorológico realizado em indivíduos residentes na Amazônia brasileira encontrou soros reagentes para anticorpos contra o vírus da dengue, levantando-se a hipótese de que o vírus já havia circulado e/ou circulava nessa região (Causey, 1962).

Em 1955 o mosquito *A. aegypti* foi considerado erradicado do país, após uma campanha que durou mais de vinte anos. Outros 17 países das Américas também obtiveram sucesso na erradicação. O Brasil foi reinfestado em 1967, quando o mosquito foi detectado no Pará e em São Luis do Maranhão, que foi novamente controlado em 1973. Em 1976 houve outra re-infestação, com início em Salvador, Bahia, que permitiu a reintrodução do *A. aegypti* progressivamente em praticamente todo o país (Franco, 1976), situação que perdura até hoje.

A primeira evidência de ocorrência recente de epidemia de dengue no Brasil é de 1982, quando foram isolados os sorotipos DEN-1 e DEN-4, em Boa Vista, Roraima (Osanai, 1984). Essa epidemia foi rapidamente eliminada, e o vírus da dengue não se expandiu para outras áreas, pois o *A. aegypti* ainda não estava disperso no território brasileiro e o combate a esse vetor praticamente o eliminou da cidade de Boa Vista em poucos meses (Donalisio, 1995).

O sorotipo DEN-1 foi reintroduzido no Brasil em 1986, no Rio de Janeiro e se disseminou pelas cidades vizinhas. Nesta mesma época atingia Ceará e Alagoas e, em 1987, Pernambuco. Já os estados de São Paulo, Bahia e Minas Gerais foram acometidos por surtos localizados em pequenas cidades e não houve notificações de casos graves (Teixeira, 1999).

Nos dois anos subseqüentes a doença passou por um período de baixa endemicidade, porém, em 1990, houve um aumento da transmissão do DEN-1 e a introdução do DEN-2. A entrada deste sorotipo trouxe os primeiros diagnósticos de dengue hemorrágica - FHD (Teixeira Mda *et al.*, 2005). No Brasil, o DEN-2 foi identificado pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro em 1990, responsável pelos primeiros casos de FHD e SSD (Nogueira *et al.*, 1993). Em seguida houve um rápido alastramento deste sorotipo em todo o país (de Souza *et al.*, 1995;

Vasconcelos *et al.*, 1995) tornando-se endêmico em algumas áreas (Siqueira *et al.*, 2005) e causando formas clínicas graves (Nogueira *et al.*, 2007).

No início dos anos 90, a dengue se manteve quase que inteiramente restrita a cidades dos Estados do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e Pernambuco, com poucas notificações de casos oriundos do Mato Grosso e do Mato Grosso do Sul (Teixeira, 1999).

Em janeiro de 2001, foi confirmada a introdução no país de DEN-3, isolado de um indivíduo residente no Rio de Janeiro (Nogueira *et al.*, 2005). Esse sorotipo foi responsável pela epidemia de 2002 do Brasil. Após esse ano houve uma queda de incidência de notificações (De Simone *et al.*, 2004).

A partir de 2005, foi retomada a tendência de crescimento, e, em 2008, dados preliminares revelam que mais de 700 mil casos de dengue foram registrados no Ministério da Saúde (SVS, 2008).

Em 2010, ao analisar as variações no número de casos, observa-se que 18 das 27 unidades federadas apresentaram um aumento no total de casos notificados nas 17 primeiras semanas do ano, quando comparados ao mesmo período de 2009. Somente na região Sudeste foi notificado 369.836 casos, dos quais 50,3% se concentraram em São Paulo, seguido de Minas Gerais - 42,8%, Espírito Santo - 3,9% e Rio de Janeiro 3,1%. Dos casos registrados no Estado de São Paulo, 34,5% pertenciam aos municípios de Ribeirão Preto - 13,8%, São José do Rio Preto - 6,1%, Araçatuba - 5,9%, Guarujá - 4,4% e Santos - 4,2%. Quanto ao monitoramento da circulação viral, foram notificados DEN-1, DEN-2 e DEN-3 (SVS, 2010).

Em 2008 foi constatado que três pacientes foram infectados por DEN-4 em Manaus, no Amazonas (Figueiredo *et al.*, 2008). Estes estudos foram contestados por alguns pesquisadores, inclusive pelo Ministério da Saúde (de Melo *et al.*, 2009).

No entanto, após 28 anos sem registros de casos de DEN-4 no país, em 2011 este sorotipo ressurgiu. Segundo o Instituto Evandro Chagas, referência para o Ministério da Saúde na região Norte do Brasil, somente este ano foram confirmados 18 casos de DEN-4 em Roraima (Alencar/Sesau, 2011). No estado de São Paulo, foi registrado o primeiro caso em São José do Rio Preto no mês de abril, e até o momento, 10 novos casos já foram notificados em todo o estado (Coissi, 2011). No

entanto as informações a este respeito podem sofrer alterações a qualquer momento, pois alguns municípios ainda não notificaram o número de novos casos.

No início de 2010 vários surtos foram documentados em muitas regiões do Brasil, com a co-circulação dos três sorotipos (DEN-1, 2 e 3). Até o final de março de 2010, o centro de vigilância epidemiológica do estado de São Paulo reportou mais de 34 mil casos de dengue, sendo mais de 800 somente na região costeira como em Santos e Guarujá, onde foram observadas apresentações clínicas graves (64 mortes relacionadas com dengue ocorreram ao mesmo tempo no estado de São Paulo (CVE, 2010).

Um importante acontecimento relacionado à FHD no Brasil é a observação de que até 2006 os casos predominavam na faixa etária de 20 a 40 anos de idade, porém em 2007 verificou-se que 53% dos casos ocorreram entre menores de quinze anos de idade (Teixeira *et al.*, 2008).

Dados do Ministério da Saúde de 2007 revelam que o mosquito está presente em mais de quatro mil municípios do país (Tauil, 2010). Isto pode ser justificado pelas condições socioambientais de muitas regiões, aliadas à ineficiência dos programas de combate ao vetor (Kyle e Harris, 2008).

Em suma, o Brasil está se consolidando como o país com maior número absoluto de casos de dengue no mundo. A ocorrência de surtos tem sido substituída progressivamente por estados endêmicos da doença, com o potencial de surgirem regiões hiperendêmicas. A reintrodução do DEN-4 em 2011 abre caminho para uma potencial nova epidemia, já que as condições para transmissão existem em várias regiões. A seguir, podemos ter os quatro sorotipos em muitas regiões, o que aumenta a possibilidade de ocorrência de formas graves da doença, especialmente em crianças.

1.4. Patogênese da Dengue

1.4.1. Ligação do vírus a célula

Pouco ainda se sabe a respeito das células-alvo do vírus da dengue. Ensaios experimentais com DEN sugerem que o início da infecção seja no próprio sítio de inoculação do vírus, a partir da picada do mosquito. Os alvos iniciais, portanto, podem ser as células de Langerhans da pele e células dendríticas do sangue periférico (Marovich *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2000).

Halstead, em 1988, confirmou que as principais células alvo são de linhagem fagocitária mononuclear (Halstead, 1988). Outros tipos de células humanas incluindo hepatócitos, linfócitos, células endoteliais, neurônios e células musculares também são alvos do vírus. A replicação viral nestas células *in vivo*, no entanto, ainda não é muito bem caracterizada (Thepparit e Smith, 2004; Warke *et al.*, 2008). Além disso, células B, NK, T CD4+ e T CD8+ podem ser alvos de infecção viral *in vivo* e *in vitro* (Warke, 2003).

Já foi descrito que macrófagos da derme também são permissivos a entrada de DEN, porém estas células apresentam certa resistência em relação à propagação e a replicação viral. Isto sugere uma primeira linha de defesa contra o alastramento do vírus, logo no sítio inicial da infecção (Kwan *et al.*, 2008).

Em relação aos receptores do vírus presentes nas células, já foram descritos o DC-SIGN, que é específico de células dendríticas (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003) e o receptor de manose nos macrófagos (Miller *et al.*, 2008). Ambos estão incluídos na família de receptores de lectina tipo C (CLR), denominados de receptores de reconhecimento de patógeno (PRR). São expressos por células de linhagem mielóide incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, apresentando um papel fundamental na ativação da defesa imune do hospedeiro (Robinson *et al.*, 2006).

O DC-SIGN é especializado na captura e apresentação do patógeno. A infecção mediada por este receptor é essencial para a maturação das células dendríticas. Neste processo, ocorre a migração de células de Langerhans para os linfonodos, local de processamento e apresentação de antígenos para células T, dando início a resposta imune adaptativa (Mellman e Steinman, 2001). Estas células,

portanto, apresentam um papel crítico no início da disseminação viral e na patogênese da doença. Além disso, já foram identificados polimorfismos relacionados a este receptor com conseqüente aumento da gravidade da doença (Sakuntabhai *et al.*, 2005).

Outros tipos de CLRs importantes foram descritos, como o receptor de manose (MR) que se liga a proteína E dos diferentes sorotipos da dengue (Miller *et al.*, 2008), e o CLEC5A, também conhecidos como MDL-1 (Chen *et al.*, 2008). CLEC5A é exclusivamente expresso em monócitos e macrófagos. Em contraste com o DC-SIGN, ele não promove a entrada do vírus na célula e somente induz a produção de citocinas próinflamatórias (Chen *et al.*, 2008).

A ligação do vírus ao receptor celular é efetivada também na presença de anticorpos facilitadores da entrada viral na célula (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003). Neste processo, anticorpos pré-existentes com baixa capacidade de neutralização, se ligam a vírus livres, formando complexos vírus-anticorpo. Células do sangue periférico que expressam receptores Fc de imunoglobulina, podem se ligar e internalizar tais complexos de vírus-anticorpo, independente de receptores virais (Boonnak *et al.*, 2008). Este fenômeno pode facilitar a infecção, dando origem ao que é descrito como “incremento dependente por anticorpos” (ou *antibody-dependent enhancement* ou ADE) (Halstead, 1988).

1.4.2. Dengue grave

As formas graves da dengue vêm sendo motivo de grande discussão e estudo devido às suas sérias conseqüências. Algumas hipóteses são postuladas para explicar este acometimento.

Existem evidências de que infecções sequenciais por sorotipos diferentes do vírus tenham uma papel importante na patogênese da dengue grave. Como mencionado no tópico anterior, este fato é caracterizado pela replicação viral descontrolada devido à facilitação da entrada do vírus no interior da célula, mediada por anticorpos de infecção pregressa, fenômeno este conhecido como ADE.

Embora existam evidências clínicas e epidemiológicas que corroboram essa hipótese (Bravo *et al.*, 1987), tem-se observado que outros fatores também podem

estar associados a formas graves da dengue, como o aumento de produção de citocinas vasoativas consequente da ativação de linfócitos T (Anderson *et al.*, 1997; Dejnirattisai *et al.*, 2008).

A super ativação destas células pode ser explicada pela reatividade cruzada dos linfócitos T de memória. Esta afirmação condiz com a teoria do “pecado original antigênico”, que é definida como uma rápida expansão de células de memória provenientes de uma infecção pregressa, porém apresentando baixa afinidade no processo de reconhecimento do antígeno durante a infecção causada por sorotipo heterólogo. Isto faz com que a resposta imune não seja eficiente e haja uma ativação anômala de células T produtoras de citocinas inoportunas (Imrie *et al.*, 2007).

Não só a exposição prévia a sorotipo heterólogo justifica a possibilidade de haver doença grave em infecções subsequentes. É sabido que a proteína NS1 do vírus pode induzir doença autoimune em alguns pacientes. Anticorpos dirigidos contra a proteína NS1 apresentam reatividade cruzada com plaquetas sanguíneas e células endoteliais, culminando em disfunções plaquetárias e danos no próprio endotélio (Lin *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006).

Existem poucos estudos que relacionam HLA com infecções graves causadas por DEN. É sabido que a infecção por DEN, assim como por outros membros da família *Flaviviridae*, leva a aumento da expressão de moléculas HLA de classe I e II nas células infectadas (King *et al.*, 2003). Também já foram descritas associações da patogênese grave com alelos de HLA de classe I e polimorfismos genéticos ligados a estes alelos, ao passo que o HLA II foi caracterizado como controlador da doença (Nguyen *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se que o HLA-A*11:01 é um haplótipo comum encontrado em áreas endêmicas acometidas por DEN e tem sido associado à maior suscetibilidade a doença (Stephens *et al.*, 2002).

Em relação aos polimorfismos descritos em casos hemorrágicos de dengue, pode-se citar aqueles relacionados aos genes do TNF- α e dos receptores DC-SIGN, Fc γ e de vitamina D (Chao *et al.*, 2008; Chaturvedi *et al.*, 2006; Fernandez-Mestre *et al.*, 2004).

Estudos que buscaram relacionar o efeito da ativação do sistema complemento na patogênese da doença identificaram, através de ensaios experimentais, que a proteína C1q tem um papel fundamental na inibição do

fenômeno ADE. Deficiências desta proteína, portanto, levam a infecção grave por dengue (Mehlhof *et al.*, 2007). Em um relato de caso, ocorrido em Cingapura, foi demonstrada uma deficiência parcial da proteína C4 do sistema complemento que desencadeou deposição de complexos imunes e vasculite na retina de uma paciente infectada (Chang *et al.*, 2007).

Vários estudos procuraram relacionar cepas do vírus da dengue com o agravamento da doença (Pandey *et al.*, 2000). Estudos epidemiológicos sugerem que DEN-3 está associado a maior frequência de formas graves da doença (Lanciotti *et al.*, 1994). Leitmeyer *et al.* 1999 reportaram diferenças nas proteínas estruturais de amostras de casos tanto de dengue clássica quanto hemorrágica (Leitmeyer *et al.*, 1999).

Um estudo que avaliou a presença de doenças como diabetes, alergia e hipertensão envolvendo pacientes com dengue sugere que essas co-morbidades sejam um fator de risco para o desenvolvimento de FHD (Figueiredo *et al.*, 2010). O autor ainda constata que os pacientes nesta situação devem ser mantidos sob constante monitoramento e observação hospitalar. Isso se deve ao fato do sistema imune de indivíduos alérgicos, por exemplo, por estarem mais ativados, apresentam sinais de inflamação em tecidos e capilares (Edwards, 2008; Trivedi e Lloyd, 2007). Ainda, se os pacientes estiverem utilizando esteróides para o tratamento de alergias, é possível que haja inflamação e liberação de citocinas pro-inflamatórias nos tecidos, particularmente no endotélio. Uma explicação alternativa para esse achado pode ser que, com o uso de esteróides, há chances de aumento do risco de desenvolver FHD pela facilitação da replicação viral (Figueiredo *et al.*, 2010).

O entendimento de como se estabelecem as formas graves da dengue está relacionado a uma teoria de multicausalidade. Vários fatores de risco podem estar relacionados: individuais, como idade, sexo, raça, estado nutricional, pré-existência de enfermidades crônicas, presença de anticorpos, intensidade da resposta imunológica a infecções anteriores (ADE); fatores virais, como virulência da cepa circulante, sorotipo viral envolvido em cada evento epidemiológico; e os fatores epidemiológicos, como competência vetorial, densidade vetorial, intervalo de tempo entre as infecções por diferentes sorotipos e intensidade da circulação viral (Martinez-Torres, 1990).

Esta é uma tentativa de explicação mais totalizadora, ao reconhecer que o resultado das apresentações epidemiológicas e clínicas no indivíduo e nas populações dependem de todos os elos e fatores interligados.

1.4.3. Resposta Imune de Células T:

O papel protetor dos linfócitos T durante infecções virais vem sendo bem estabelecido (Byrne e Oldstone, 1984). Os linfócitos T CD4⁺ controlam a infecção viral através de mecanismos como o aumento de respostas de linfócitos B e linfócitos T CD8⁺, produção de citocinas inflamatórias e antivirais, citotoxicidade contra células infectadas além de estimular a memória imunológica (Hasenkrug *et al.*, 1998; Lechner *et al.*, 2000; Matloubian *et al.*, 1994; Thimme *et al.*, 2001). De um modo similar, os linfócitos T CD8⁺ controlam a infecção viral através da citotoxicidade direta em células infectadas bem como a produção de citocinas como IFN- γ (Borrow *et al.*, 1994; Virgin *et al.*, 2009).

Diversos achados sugerem que ambos os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ possuem uma relação direta na melhora do quadro clínico de indivíduos infectados por DEN. As respostas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ DEN específicas já foram observadas em humanos durante infecções primárias por DEN e os resultados indicam que este tipo de infecção induz o aparecimento de linfócitos T CD4⁺ de memória de reação cruzada (Kurane *et al.*, 1989). Os linfócitos T de reatividade cruzada proliferam e produzem IFN- γ após estímulo com uma cepa viral de outro sorotipo, e demonstra atividade citotóxica contra células autólogas infectadas com DEN de uma infecção heteróloga (Bukowski *et al.*, 1989; Livingston *et al.*, 1995). Baseado nestes achados alguns autores sugerem que linfócitos T de reatividade cruzada a sorotipos do vírus DEN podem contribuir para a patogênese de FHD/SSD devido a produção de IFN- γ , que promove o aumento do número de receptores Fc- γ e consequentemente aumenta o número de células infectadas por DEN devido ao aumento da formação de complexos vírus-anticorpo. Além disso, há ainda a lise de células infectadas por DEN durante infecções secundárias com o vírus de sorotipo heterólogo. Recentemente tem sido demonstrado que linfócitos T CD8⁺ podem ter um papel

direto na proteção contra desafios com DEN realizados em modelos murinos de infecção (Yauch *et al.*, 2009). Estudos semelhantes investigaram o papel de linfócitos T CD4+, demonstrando a mesma eficácia (Yauch *et al.*, 2010).

1.4.4. Linfócitos T de Memória e contribuições na patogênese da doença

As células envolvidas no processo de memória imunológica são de fundamental importância para a resposta imune, pois elas persistem por tempo prolongado no hospedeiro e são rapidamente ativadas nos casos de reencontros com o patógeno, resultando em intensa proliferação, além de estimular outras células. É desta maneira que surgem as respostas rápidas e efetivas, pois estas células são capazes de secretar citocinas imediatas em resposta a um estímulo antigênico previamente conhecido (Butcher e Picker, 1996).

Quanto ao perfil funcional dos grupos de linfócitos T de memória, estes podem ser classificados como: - células T de memória central (TCM): quase nenhuma função efetora, porém são capazes de se auto-renovarem e secretarem a citocina IL-2 principalmente; - células T de memória efetora (TEM): tem função efetora imediata e secretam IL-2 e IFN- γ ; - células T de memória altamente diferenciada (TEMRA): grande potencial efetor, porém pequena capacidade de replicação, além de ser secretor único de IFN- γ (Geginat *et al.*, 2003; Tomiyama *et al.*, 2002).

Embora os mecanismos de geração e manutenção das células T de memória ainda não estejam completamente esclarecidos, sabe-se que estas células e as *naïve* apresentam diferenças entre si quanto à expressão de moléculas em sua superfície. A principal molécula é a glicoproteína CD45, considerada a mais abundante presente nos leucócitos. O CD45 é uma tirosina fosfatase com função enzimática, envolvida na transmissão de sinais entre células B e T e atuando na regulação da proliferação destes linfócitos previamente estimulados por antígenos (Trowbridge e Thomas, 1994). Diferentes isoformas de CD45 são geradas durante um *splicing* alternativo celular. A variação das isoformas está relacionada com o processo de diferenciação, o perfil de ativação e função celular (Beverley *et al.*, 1992). Na maioria dos casos é possível distinguir linfócitos T de memória de linfócitos T *naïve* através da

identificação da expressão das isoformas CD45RO e CD45RA, respectivamente (Michie *et al.*, 1992).

Além do CD45, duas outras moléculas de superfície são capazes de distinguir linfócitos T *naïve* dos de memória: CD27 e CCR7. A molécula co-estimulatória CD27, quando expressa, determina diferentes estágios de diferenciação de células T (Hamann *et al.*, 1999). A molécula CCR7 é um receptor de quimiocinas como a CCL19 e CCL21. A sinalização via CCR7 é responsável pela migração dos linfócitos T *naïve* através das vênulas endoteliais altas em direção aos linfonodos (Forster *et al.*, 1999).

As células T *naïve* são caracterizadas como CD45RA+, CCR7+ e CD27+, já as TCM como CD45RA-CCR7+ e CD27+. Em contraste, as TEM são caracterizadas como CD45RA-CCR7- CD27+ e as TEMRA como CD45RA+/-CCR7-CD27- (Sallusto *et al.*, 1999).

Até o momento não existem trabalhos retratando o fenótipo dos linfócitos T de memória na dengue em relação aos marcadores acima citados. O que se sabe é que o perfil de resposta de células T de memória específica nessa infecção pode ser responsável por quadros graves da doença durante a infecção secundária. Isso se deve a reatividade cruzada desses linfócitos em relação à primeira infecção por um dos quatro sorotipos de DEN. A hipótese é de que, em infecções secundárias heterólogas, ocorra imunopatologias devido a produção alterada de citocinas ocasionada pela ativação e expansão dessas células de memória durante a fase aguda da doença (Friberg *et al.*, 2011).

1.5. Quadro clínico do paciente

A infecção por dengue é uma doença sistêmica e dinâmica. Tem um espectro clínico amplo incluindo manifestações graves e não graves (Edelman, 2007). Após o período de incubação a doença se inicia abruptamente e apresenta-se sob três fases distintas: febril, crítica e de recuperação (Figura 6).

Apesar da complexidade desta doença, o manejo clínico é relativamente simples, barato e muito eficaz através de medidas de intervenções já bem estabelecidas.

Figura 6: Curso clínico da dengue. A figura mostra os principais achados clínicos, temporalmente apresentados com achados laboratoriais, viremia e produção de anticorpos específicos. Adaptado de documento da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2009).

Um estudo realizado durante a epidemia de dengue em Vitória-ES, em 2002 e 2003, mostrou que aproximadamente 20% dos pacientes infectados por DEN apresentaram comprometimento do sistema nervoso central (SNC). Os pacientes foram classificados de acordo com a presença ou não de encefalites, encefalopatias e meningites (Domingues *et al.*, 2008).

Outro estudo teve como objetivo determinar se a infecção secundária por DEN-3 ou se a quantidade viral estavam relacionadas ao agravamento clínico em uma coorte de pacientes adultos (Guilarde *et al.*, 2008). DEN-3 foi o sorotipo predominante deste estudo, sugerindo que a infecção primária com esse sorotipo pode levar a acometimentos clínicos graves em adultos. Esta mesma análise foi feita no trabalho de (Harris *et al.*, 2000), confirmando, portanto, que o potencial de virulência do vírus é uma fator de risco para a ocorrência de doença grave

(Anantapreecha *et al.*, 2005; Balmaseda *et al.*, 2006; Rosen, 1989; Vaughn *et al.*, 2000).

Mortes relacionadas à dengue estão freqüentemente associadas à FHD/SSD. Embora nenhuma vacina ou droga anti-viral estejam disponíveis, o quadro grave da doença pode ser controlado com o monitoramento dos sinais iniciais de alerta e hidratação venosa. Durante o início da fase febril cujos sintomas incluem febre, mal-estar, dor de cabeça e dores no corpo, não é possível prever quais pacientes irão evoluir para doença grave. Somente após o período da defervescência podem aparecer alguns sintomas como sangramento, trombocitopenia, ascite, derrame pleural, dores abdominais, agitação e/ou sonolência, vômitos persistentes e uma redução brusca de temperatura associada à transpiração profusa, adinamia e, às vezes desmaio, pode ser indicativo de extravasamento de plasma e iminência de choque. Nesta fase, os pacientes devem receber reposição de líquido para que sejam evitadas alterações hemodinâmicas a fim de estabilizar a pressão arterial. (Martinez Torres, 2006; Nimmannitya, 1987; OMS, 2009; TDR/WHO, 2009).

As infecções primárias são pouco graves e ocasionalmente há fatalidade nos casos de dengue hemorrágica ou choque. Neste processo pode ocorrer uma série de eventos que podem resultar em falência de múltiplos órgãos e morte.

Os sintomas gerais relacionados à dengue são resultado, portanto, da viremia e da produção de citocinas inflamatórias, como febre, mal estar, fadiga e indisposição. A mialgia, contudo, parece resultar de infiltração mononuclear perivascular, uma das principais características da doença (Malheiros *et al.*, 1993).

Após alguns dias é comum o aparecimento de exantema e, em alguns casos, petéquias. Estima-se que cerca de 80% das infecções são assintomáticas, o que torna a detecção de casos difícil em situações de epidemias (Lei, 2009).

As crianças costumam apresentar quadros menos típicos de dengue, com irritabilidade, congestão de mucosas e orofaringe, sintomas inespecíficos do trato respiratório superior e exantema. Pode, portanto, facilmente ser confundida com quadros respiratórios comuns e com doenças exantemáticas da infância (Nogueira, 2005).

Após a infecção, os sintomas iniciam ao redor do quarto ao sétimo dia (período de incubação). Os sintomas gerais, principalmente febre e mialgia,

costumam durar por três a quatro dias, quando se inicia a defervescência e aparecimento de exantema, macular ou rendilhado. Ao final do período exantemático, pode ser notado o aparecimento de petéquias, especialmente nas dobras dos membros, face interna de coxa e axilas (Vita, 2009).

Episódios de sangramento discretos são comuns, como sangramento gengival e epistaxe e não devem ser necessariamente considerados indicadores de doença grave, se ocorrerem em baixa intensidade. É fundamental ter atenção especial em pacientes que possuem condições predisponentes a sangramento, como úlcera péptica, hipermenorragia e alterações prévias da coagulação. A hepatite é comum, exteriorizada por discreta hepatomegalia ao exame físico. Estudo realizado na Tailândia mostrou que 11% dos pacientes com dengue apresentavam níveis de transaminases até dez vezes os limites superiores (Montenegro *et al.*, 2006)

Pode ocorrer transmissão perinatal da dengue, se o parto ocorrer entre zero e oito dias após o início da viremia. Nestes casos, o vírus é transmitido ao recém-nato antes de ocorrer transmissão de anticorpos maternos. Caracteriza-se por quadro grave, com alta viremia, diáteses hemorrágicas e choque, incluindo sangramento intracerebral (Sirinavin *et al.*, 2004).

1.6. Diagnóstico

Devido à dificuldade em se diagnosticar clinicamente o paciente com dengue, pela existência de uma heterogeneidade em suas apresentações clínicas, o diagnóstico laboratorial se torna crucial. Dentre os métodos disponíveis considera-se como os mais aceitos, os testes: isolamento viral, detecção do genoma viral por técnicas de biologia molecular e o teste de sorologia. Em geral, a utilização de teste rápido pode comprometer a sensibilidade e especificidade do resultado, portanto é essencial que sejam utilizados testes diagnósticos alternativos (OMS, 2009).

1.6.1 Isolamento viral:

Para o isolamento viral, utiliza-se soro proveniente do sangue periférico de casos suspeitos de dengue na fase virêmica, - 3 a 5 dias de sintomas. O soro é

incubado juntamente à linhagem celular C6/36 do mosquito *Aedes albopictus*, embora outras linhagens de mosquito ou de mamíferos, como Vero e LLC-MK2, possam ser utilizadas (Ajello, 1979; Race *et al.*, 1979). A finalidade desta incubação é que o vírus consiga se replicar na respectiva linhagem celular e, para a detecção deste ensaio, utiliza-se anticorpos monoclonais específicos ao vírus utilizando a técnica de imunofluorescência e a de PCR (Guzman e Kouri, 2004; Henschal *et al.*, 1983; Kao *et al.*, 2001). Amostras como plasma, leucócitos e sangue total de tecidos obtidos em autópsias também podem ser utilizados (Rosen *et al.*, 1999).

1.6.2. Testes sorológicos:

São os testes mais utilizados para o diagnóstico de infecção por dengue pela facilidade na execução e seu preço acessível. Quando há uma infecção por dengue em indivíduos que tenham sofrido uma infecção anterior, ocorre uma resposta imune secundária gerando altos níveis de IgG através do estímulo de células B de memória provenientes de uma infecção pregressa bem como uma resposta de IgM de uma infecção corrente. Devido aos altos níveis de IgG competindo com IgM pela ligação ao antígeno, um ensaio de captura de IgM pode ser utilizado (Hunsperger *et al.*, 2009).

O ensaio de ELISA também tem sido utilizado para distinguir infecção por dengue aguda primária e secundária através da verificação da taxa de anticorpos IgM e IgG (Innis *et al.*, 1989) e pelos testes de quantificação de títulos de IgG (Vaughn *et al.*, 1999). Outro método de ELISA baseado no teste de avididade de IgG também tem sido utilizado para identificar dengue primária e secundária (de Souza *et al.*, 2004; Matheus *et al.*, 2005). Um estudo avaliou a sensibilidade e as especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e valores preditivos negativos (VPN) de três métodos de ELISA (teste de avididade de IgG, títulos de IgG e a taxa IgM/IgG) para discriminar infecção viral por dengue primária e secundária (de Souza *et al.*, 2007).

1.6.3. Ensaio de neutralização:

A técnica de neutralização por redução de placas (TNRP) e ensaios de micro neutralização é utilizada para definir sorotipos infectantes seguinte a uma infecção primária. Estes testes são principalmente para pesquisas e estudos de vacinas (Thomas *et al.*, 2009) (Roehrig *et al.*, 2008).

1.6.4. Transcriptase reversa PCR (RT-PCR):

Muitos ensaios de RT-PCR têm sido descritos nos últimos 10 anos. Existem diferentes protocolos de amplificação. O mais comum é o Nested RT-PCR ou RT-PCR multiplex (Harris *et al.*, 1998). O Nested envolve uma transcrição reversa inicial e amplificação utilizando primers para regiões conservadas do genoma seguido de um segundo passo de amplificação sorotipo específico. Os produtos desta reação são separados por eletroforese em gel de agarose o qual permite que os diferentes sorotipos sejam diferenciados com base no tamanho (Raengsakulrach *et al.*, 2002).

1.6.5. RT-PCR em tempo real:

Esta técnica é um ensaio de passo único que permite que cópias do genoma viral sejam quantificadas no plasma. A vantagem deste ensaio é a capacidade de estimar a quantidade relativa de vírus nas diversas fases da doença (Vaughn *et al.*, 2000).

Esta técnica já foi anteriormente descrita e avaliada pelo nosso grupo em um trabalho que compara a viabilidade de um kit comercial com um teste de PCR multiplex “in house” em uma série de casos suspeitos de dengue, recrutados em uma ampla área central do Brasil e observando a co-circulação de DEN-1, DEN-2 e DEN-3, no ano de 2005, a fim de avaliar o desempenho de ensaios moleculares em diagnósticos de dengue (Levi *et al.*, 2007).

1.6.6. Detecção de antígeno:

Antígenos de dengue podem ser detectados em tecidos como fígado, baço e linfonodos bem como em tecidos cadavéricos, utilizando enzimas e substratos colorimétricos com anticorpos-alvo para antígenos específicos de dengue (Hall *et al.*, 1991; Pelegrino *et al.*, 1997).

1.6.7. Teste de Avidéz de IgG

Este teste é baseado no fato de que na infecção primária, a resposta de anticorpos IgG específicos se inicia apresentando baixa avidéz de anticorpos IgG. Estes, com o passar dos dias de infecção, caracterizam-se por se tornarem anticorpos de alta avidéz. Em infecções secundárias, a rápida resposta de anticorpos é caracterizada pela produção de anticorpos de alta avidéz (Steiner e Eisen, 1967). Este teste foi muito utilizado no diagnóstico de infecções virais agudas (Gray, 1995; Meurman *et al.*, 1992; Soderlund *et al.*, 1995; Tuokko, 1995) para discriminar infecções recentes primárias de reinfecções e reativação (Blackburn *et al.*, 1991; Enders e Knotek, 1989; Tuokko, 1995), para estimar a eficácia de vacinas (de Souza *et al.*, 1997) e para identificar falhas em vacinas (Paunio *et al.*, 2003; Paunio *et al.*, 2000). Portanto, o principal objetivo do teste de avidéz de IgG, no diagnóstico por dengue, é diferenciar infecções primárias e secundárias (de Souza *et al.*, 2004).

1.7.Tratamento

O tratamento para os casos de dengue é simples, incluindo abundância de líquidos orais durante o período febril e a administração de Paracetamol. A dose diária deste medicamento não pode ser ultrapassada a fim de se evitar intoxicação relacionada a função hepática. Em relação ao choque da dengue, quando este tornar-se prolongado ou recorrente, devem ser administrados fluidos intravenosos cuidadosamente levando em consideração a idade do paciente e a quantidade, para se evitar sobrecarga de líquido, pois isto poderia acarretar em edema pulmonar (Balmaseda *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

1. Descrever o número e a percentagem dos linfócitos T CD8+ circulantes na fase aguda da dengue
2. Avaliar as variações ocorridas neste perfil de linfócitos T CD8+ em relação aos dias de sintomas e carga viral
3. Verificar o perfil de ativação nas subpopulações de linfócitos T CD8+

3. MÉTODOS

3.1. Integrantes da pesquisa

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos com diagnóstico clínico e laboratorial confirmado como dengue aguda e indivíduos assintomáticos que residem em áreas não significativamente acometidas pela dengue, denominados neste trabalho como controles saudáveis.

Os pacientes foram avaliados por infectologistas e por médico clínico geral do Hospital Ana Costa de Santos, SP, de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde de 2009.

Para que os voluntários pudessem fazer parte deste estudo, alguns critérios foram estabelecidos, detalhados a seguir.

3.2. Critérios de inclusão para coleta de sangue periférico

- Idade igual ou superior a 18 anos completos;
- Quadro sugestivo de dengue em região endêmica para a doença, com até cinco dias de duração dos sintomas;
- Presença de febre e pelo menos dois dos seguintes achados clínicos: dores musculares e/ou nas articulações, dores de cabeça, fraqueza, náuseas, vômito, diarreia, exantema e petéquias;
- Detecção de antígenos circulantes da dengue pelo teste rápido Dengue Duo.

3.3. Recrutamento

Trata-se de um estudo de corte transversal. Todos os indivíduos incluídos leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (número do processo: 0652/09).

Os voluntários não foram submetidos a qualquer forma de intervenção experimental envolvendo drogas ou vacinas, havendo apenas os riscos inerentes à punção venosa.

3.4. Procedimento de coleta e preparo das amostras

A coleta das amostras foi realizada nas salas de atendimento do pronto socorro, que durante a epidemia, aguardavam a liberação da internação ou que recebiam a hidratação venosa. O principal critério estabelecido pelo Hospital para admissão dos pacientes para internação, a princípio, foi presença de plaquetas com contagem 20.000 ou menor. No entanto nos leitos, os pacientes encontravam-se sob diferentes tipos de sintomas graves como presença de sangramento ou ascite. As amostras coletadas restringiam-se a pacientes do Hospital Ana Costa de Santos, porém muitos pacientes que vinham até o Hospital para serem atendidos, eram oriundos de outras cidades da baixada santista, muitas vezes devido à superlotação dos leitos por se tratar de hospitais com menor capacidade de admissão dos mesmos.

Dos infectados pelo vírus, 74 amostras foram utilizadas para ensaios imunológicos em sangue fresco, onde foram detectados os valores percentuais e absolutos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Dessas 74 amostras, 30 foram selecionadas para serem submetidas a testes específicos em células mononucleares do sangue periférico (CMSP), que avaliaram a proliferação e a ativação de linfócitos T CD8⁺ e suas subpopulações de memória: *naïve*, memória central (TCM); memória efetora (TEM) e memória efetora altamente diferenciada (TEMRA). Como controles saudáveis, foram selecionados 17 indivíduos e, de cada indivíduo participante da pesquisa, foram coletados 50 ml de sangue venoso periférico.

A coleta de sangue periférico realizou-se através de punção venosa em membro superior de indivíduos tanto infectados pelo vírus da dengue, como saudáveis. Foi utilizada a técnica de coleta a vácuo que compreende na punção da veia do paciente permitindo que o sangue flua diretamente para o tubo de coleta a vácuo. Esta técnica é ideal, pois possibilita a coleta de vários tubos e se caracteriza por ser um sistema fechado e sem a necessidade de manuseio com as amostras. Em todo o momento da coleta foram utilizadas luvas de procedimento e o material

biológico e perfuro cortante eram descartados em locais adequados – lixo branco e caixas amarelas descarpac, respectivamente. A sala de coleta do Hospital Ana Costa contava com o material necessário para coleta e amparo do indivíduo doente como mesas, compartimentos para estocagem de material plástico, gaze, luvas, entre outros, além de possuir macas para melhor acomodar aqueles que chegavam muito indispostos até o local

O material coletado foi encaminhado no mesmo dia para o Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM-60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foi processado no dia seguinte.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados em cabine de segurança biológica devidamente esterilizada. Foi realizada a separação das células mononucleares e posterior criopreservação em nitrogênio líquido com a finalidade de estocá-las e conservá-las para futuros ensaios imunológicos. Também foram separados e congelados 2,5 ml de plasma a -80°C e um tubo adicional sem anticoagulante para a obtenção do soro, que também foi preservado a -80°C . Uma pequena quantidade de sangue periférico foi separada para que fosse feito o hemograma de cada paciente no próprio laboratório do Hospital Ana Costa de Santos.

3.5. Variáveis Hematológicas – Hemograma

A leitura das variáveis hematológicas – hemograma – foi considerada a base para o diagnóstico da dengue. Essa leitura foi realizada por meio do hemocítômetro Horiba ABX Pentra (120 DF), com capacidade de leitura em média 1000 amostras/dia. Os exames foram liberados via interface eletrônica e os que apresentavam algum tipo de alteração na série vermelha ou presença de atipia celular eram digitados manualmente e as amostras eram conferidas em lâminas de microscópio. Os tubos contendo as amostras foram inseridos em estantes com capacidade para 10 amostras.

3.6. Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico - CMSP

O sangue coletado foi diluído em salina balanceada Hank (HBSS) (Gibco™), inserido posteriormente em uma solução de gradiente de densidade (Ficoll-Paque™ PLUS Amersham Biosciences) e submetido a uma centrifugação por 40 minutos. Após esta centrifugação é comum que as células mononucleares fiquem dispostas em uma região intermediária do tubo formando uma “nuvem” de coloração branca. Esta foi coletada, submetida a dois processos de lavagens com a solução de HBSS e centrifugadas por 10 minutos.

Para que fosse efetuado o processo de lise de qualquer vestígio de eritrócitos, foi adicionado um tampão denominado ACK Lysing Buffer (Gibco™), onde as células permaneceram em repouso por dois minutos e em seguida, para neutralizar a ação temporária deste tampão, foram adicionados 10 ml de meio de cultura R10, constituído de meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, solução tampão Hepes 1M, antibióticos, penicilina estreptomicina e mercaptoetanol, todos da marca Gibco™.

As células foram então centrifugadas e lavadas com meio R10 para realização da contagem em câmara de Neubauer (Boeco Germany). Para auxiliar esta contagem, foi feita uma diluição em uma solução azul de Tripán (Sigma®) 1:10.

Ajustada a concentração de células por mililitros, estas foram congeladas em meio contendo soro fetal bovino (SFB) 90% e dimetil sulfoxido (DMSO) (Hybri-Max®) em 1×10^7 células por criotubo (Sarstedt Ag & Co) e congeladas a -80°C por, no mínimo 24 horas e transferidas posteriormente para o nitrogênio líquido (-180°C).

Todas as amostras foram mantidas no próprio LIM-60, exceto o soro, que foi enviado ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Universidade de São Paulo, para ser submetido à análises moleculares.

3.7. Técnica de citometria de fluxo

3.7.1 Contagem de Células T CD4⁺ e CD8⁺

As contagens absolutas de células T CD4⁺ e CD8⁺ periféricas foram realizadas por citometria de fluxo com anticorpos monoclonais CD45, CD4, CD8 e CD3, conjugados aos fluorocromos aloficocianina (APC), isoticianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), e proteína de clorofila peridina (PerCP) respectivamente.

Cem microlitros de sangue total foram incubados com 20 µL do reagente *Multitest* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), o qual contém concentrações iguais

dos quatro anticorpos. Após incubação de 15 minutos, as amostras foram lisadas por adição de 2 ml de solução BD FACS Lysing (1:10). Após nova incubação por 15 minutos, as amostras foram lavadas com MACs Buffer e fixadas com PFA 1%.

A aquisição foi realizada em citômetro BD FACSCanto (BD) por meio do software BD FACS Diva. Os valores (células/mm³ de sangue) dessas populações celulares foram calculados com base no valor de referência dos linfócitos obtido no hemograma de cada paciente. Esse procedimento foi realizado em sangue fresco, porém outros ensaios foram realizados em células mononucleares descongeladas.

3.7.2. Marcação de moléculas de superfície e intracelular em CMSP.

Os ensaios em amostras descongeladas serviram para identificar indiretamente a capacidade proliferativa dos linfócitos T CD8⁺ e verificar perfil de ativação desses linfócitos e de suas subpopulações - *naïve* e de memória.

Para as análises de proliferação, foi realizada marcação intracelular para investigar a presença da molécula Ki67, presente em células que estão se dividindo. Além disso, para caracterizar o perfil de ativação dos linfócitos T CD8⁺ e suas subpopulações, foram utilizados os marcadores HLA-DR⁺ e CD38⁺.

O procedimento para marcação de moléculas de superfície e intracelular foi totalmente realizado em cabine de segurança biológica. As células mononucleares foram descongeladas e transferidas para placas em fundo “v”. Em seguida foram

marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para cada painel de interesse (proliferação de linfócitos T CD8⁺ e ativação de subpopulações de linfócitos T CD8⁺ *naïve* e de memória). Os anticorpos e os fluorocromos conjugados utilizados para análise de proliferação foram: CD3 – PerCP; CD8 – APC Cy7; Ki67 – FITC e aqueles utilizados para análise de ativação em linfócitos T CD8⁺ de memória foram: CD45RA – FITC; CCR7 – PeCy7; CD27 – APC Cy7; CD38 – Pe; HLA-DR – Alexa 700; CD8 – PerCP e CD3 – Pe Texas Red. Após a marcação das proteínas de superfície celular com esses anticorpos, as células passaram por um período de incubação. Em seguida foram lavadas e fixadas para serem adquiridas no citômetro. Para que a proteína Ki67 fosse detectada intracelularmente, houve uma etapa adicional nesse ensaio: as células foram fixadas e em seguida permeabilizadas para que o anticorpo pudesse entrar na célula.

Esses ensaios foram realizados com o citômetro de fluxo modelo LSRFortessa (BD), disponível no LIM-60, dotado de detectores capazes de adquirir e analisar eventos com até 13 cores.

Figura 7. Estratégia de análise para avaliar a ativação de células T naïve e de memória. Primeiramente foi feito um *gate* na região das células que passaram apenas uma vez em frente ao laser, denominados *singlets* determinado pelo tamanho em relação a altura (FSC-H) e em relação a área (FSC-A). Em seguida foi feito um *gate* na população de linfócitos totais seguido de um *gate* na população CD3+. A partir daí outros dois *gates* foram feitos nas populações de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Dentro da população de linfócitos T CD8+ foram avaliadas as subpopulações *naïve* e de memória a partir da análise booleana, que fez todas as combinações possíveis com os marcadores CCR7, CD45RA, CD27. Dentro de cada população (*naïve*, TCM, TEM e TEMRA), foi feito um *gate* em quadrante para avaliar a expressão dos marcadores de ativação HLA-DR e CD38.

Figura 8. Estratégia de análise para avaliar a expressão do Ki67 em células T CD8+. Foram selecionadas, primeiramente, células que passaram apenas uma vez em frente ao laser, denominados *singlets* (A) determinado pelo tamanho em relação a altura (FSC-H) e em relação a área (FSC-A). Em seguida a população de linfócitos totais foi delimitada por um *gate* (B) seguido da população CD3+ (C). Dentro da população de linfócitos T foi identificada a população de linfócitos T CD8+ (D). Dentro da população de linfócitos T CD8+ foi avaliada a expressão da molécula Ki67 (E).

A análise dos dados adquiridos no citômetro de fluxo foi realizada através do software FlowJo (Tree Star). A representação gráfica foi gerada a partir da captação da intensidade das fluorescências e transformação dos resultados finais em porcentagens. A Figura 6 demonstra uma das estratégias de análise desse trabalho. Nesta figura está esquematizado como é verificado o perfil de ativação das subpopulações de linfócitos T CD8+ *naïve* e de memória. Já a figura 7 representa a estratégia utilizada para detectar a proliferação dos linfócitos T CD8+ pela expressão de Ki67, expresso em células que estão em processo de divisão.

3.8. Métodos utilizados para o diagnóstico da doença

3.8.1. Teste rápido (Dengue Duo - Bioeasy)

O teste rápido aqui aplicado é um ensaio imunocromatográfico, que foi designado para a determinação qualitativa do antígeno do vírus da dengue, o NS1, e anticorpos específicos de classes IgG e IgM em amostras de soro ou de sangue total.

Este teste teve grande importância no diagnóstico preliminar da infecção inicial aguda por dengue. Ele apresenta uma membrana marcada com antígenos anti-dengue NS1 conjugado de ouro coloidal. A partir do momento que a amostra se une a este conjugado, ela desloca-se ao longo de uma membrana cromatográfica. Se alcançar a região T é indicativo de positividade para a amostra, ou seja, houve a formação do complexo anticorpo-antígeno-anticorpo.

Ao lado direito deste dispositivo encontra-se o teste DENGUE IgG/IgM que é definido como um ensaio imunocromatográfico de fase sólida para detecção rápida, qualitativa e diferencial de anticorpos IgM e IgG para o vírus da dengue em amostras de soro e sangue total.

O teste rápido Dengue IgM/IgG foi capaz de auxiliar no diagnóstico de infecções primária e secundária da dengue.

3.8.2. Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)

Em geral, o teste de ELISA é uma técnica utilizada para o diagnóstico sorológico de doenças através da detecção de anticorpos específicos.

O método de ELISA utilizado neste estudo é denominado Platelia™ - Dengue antígeno NS1. Consiste em uma detecção qualitativa e semi-quantitativa do antígeno NS1 do vírus da dengue a partir do soro dos pacientes supostamente infectados e de controles saudáveis. Este teste utiliza um anticorpo monoclonal murino (MAb), que já vem impregnado na membrana da placa, para a captura e revelação do ensaio.

As amostras e os controles são incubados com um conjugado por 90 minutos a 37°C nos poços da placa sensibilizada. Se o antígeno NS1 estiver presente na amostra, é formado um imuno-complexo MAb – NS1 – Mab/peroxidase. Após a

etapa de lavagem, a presença do imuno-complexo é demonstrada pela distribuição, em cada poço da placa, de uma solução de cromógeno iniciando uma reação que faz com que apareça cor. Após trinta minutos de incubação em temperatura ambiente, a reação enzimática é bloqueada pela adição de uma solução ácida.

A leitura da densidade óptica obtida com o aparelho de espectrofotômetro de 450/620 nm é proporcional a quantidade de antígeno NS1 presente na amostra. A presença do antígeno NS1 em uma amostra individual é determinada pela comparação da leitura da densidade óptica da amostra em relação à densidade óptica do calibrador.

3.8.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O RNA de DEN-2 foi quantificado a partir de amostras de soro proveniente de sangue periférico coletado em tubo seco (sem anticoagulante) e foram processados no mesmo dia da coleta.

O gene do RNA viral foi amplificado em um ensaio quantitativo de RT-PCR (*reverse transcriptase – polymerase chain reaction*).

As amostras dos pacientes foram submetidas ao teste de carga viral a partir da técnica de PCR em Tempo Real que tem a finalidade de quantificar o vírus circulante. A detecção de RNA viral através da técnica de Multiplex RT-PCR, foi capaz de determinar o sorotipo do vírus.

3.9. Análise Estatística

Os resultados dos ensaios laboratoriais foram analisados, descrevendo o comportamento de sub-populações de linfócitos T, utilizando o *software GraphPad Prism 5[®]*. O teste t Mann Whitney foi utilizado para comparar um parâmetro entre dois grupos. O Teste *One Way Anova - Kruskal–Wallis*, seguido do pós teste *Dunn's Multiple Comparison* foi utilizado para comparações entre mais de dois grupos ou comparações de vários parâmetros. O teste *Spearman r* foi utilizado para medir o grau de associação ou relação linear mútua entre variáveis X e Y.

4. RESULTADOS

4.1. Características dos indivíduos envolvidos no estudo

As amostras do presente estudo foram coletadas durante a epidemia de dengue ocorrida na Baixada Santista no período de fevereiro a maio de 2010. Foram incluídos 74 pacientes com diagnóstico confirmado para dengue. Também fizeram parte da pesquisa 17 voluntários clinicamente saudáveis (controles saudáveis) e as características demográficas de ambos os grupos estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características demográficas de pacientes com dengue e dos indivíduos saudáveis.

Variável	Dengue (n=74)	Controle Saudável (n=17)
Idade, em anos (Mediana e interquartil 25% - 75%)		
Feminino	44 (31-54)	40 (34-55)
Masculino	38 (30-47)	25 (23-31)
Gênero (%)		
Feminino	58	65
Masculino	42	35

Dos 74 indivíduos infectados, 58% apresentaram positividade no teste de sorologia que detectou a presença de anticorpos IgG, o que pode ser considerado compatível com reinfecção.

A primeira investigação laboratorial se deu a partir da obtenção do hemograma completo dos integrantes. Neste exame, foi observado uma queda em alguns parâmetros como plaquetas e leucócitos. Os indivíduos envolvidos no estudo foram caracterizados também de acordo com a quantidade de vírus circulante no plasma sanguíneo e, além disso, foi observado o perfil de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Estes resultados estão demonstrados na Tabela 2 de um modo comparativo entre pacientes infectados e controles saudáveis e na Tabela 3, estão demonstradas as características hematológicas e demográficas dos integrantes acometidos por dengue.

Tabela 2. Características laboratoriais de pacientes com dengue e indivíduos saudáveis

	Dengue (n=74)	Controle Saudável (n=17)	P
Plaquetas (mm ³)	152.000 (105.000 - 200.000) ^a	226.000 (171.000 - 303.000)	0,0004
Hemoglobina (%)	13 (12 - 15)	14 (13 - 16)	0,0217
Hematócrito (%)	40 (36 - 43)	45 (41 - 49)	0,0006
Leucócitos (mm ³)	4.800 (3.400 - 6.400)	8.100 (6.140 - 9.335)	0,0001
Linfócitos (%)	29 (20 - 37)	33 (28 - 40)	0,2136
Linfócitos (mm ³)	1.285 (840 - 2136)	2.220 (1.920 - 2.700)	0,0001
Linfócitos T CD4+ (células/μL)	560 (344 - 873)	916 (762 - 1092)	0,0014
Linfócitos T CD8+ (células/μL)	279 (165 - 465)	465 (346 - 592)	0,0254
Carga Viral (cópias/mL)	525 (128 - 302.803)	NR ^c	
Carga Viral (log ₁₀)	2.7 (2.1 - 7.3)	NR ^c	
IgG reagente na fase aguda (%)	58%	-	

^a Interquartil 25% - 75%^b Significância estatística (teste Mann Whitney) avaliando diferenças entre pacientes com dengue e controle. Valor de p: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001^c NR – Não realizado

Tabela 3. Características demográficas e hematológicas dos participantes do estudo.

ID (n°)	Gênero	Dias de Sintomas	Idade (anos)	Dengue Duo NS1/IgM/IgG	Carga viral (cópias/ml)	Plaquetas (cels/μl)	Linfócitos (cels/μl)	Células T (cels/μl)	Células CD8+ T (cells/μl)
5	F	6	77	- / + / +	284	10.000	3136	2684	1839
6	M	5	27	- / + / +	87	42.000	1500	665	120
7	F	5	67	- / + / +	84	56.000	6201	4545	1882
14	F	1	35	- / + / +	107	253.000	1779	1315	310
15	F	6	53	- / + / +	141	42.000	4264	3164	1826
26	M	4	46	+ / + / +	11994	237.000	1168	710	375
27	F	4	29	- / - / -	666	216.000	974	731	139
29	F	1	55	- / - / -	2840000	113.000	644	411	186
31	F	1	31	+ / - / -	45839	147.000	840	659	182
32	M	1	26	- / - / -	59	234.000	2126	1490	666
34	M	3	50	+ / - / -	14200000	158.000	2236	1623	268
35	F	4	37	- / - / -	164	149.000	2349	1724	386
37	F	2	46	- / - / -	896004	132.000	792	602	147
40	F	6	37	- / + / +	0	152.000	1963	1627	542
41	F	3	30	- / - / -	114	361.000	2141	1674	465
45	M	5	53	- / + / +	0	20.000	2368	1428	416
58	F	2	24	- / - / +	352	297.000	4132	2835	998
65	M	5	49	+ / + / -	205151	119.000	1190	499	191
66	M	2	30	- / + / +	1983	237.000	1285	1086	443
67	M	3	33	- / - / -	11828	137.000	986	621	207
69	M	2	56	- / - / -	20700000	122.000	955	716	298
70	F	3	50	- / - / -	383	255.000	1680	1211	345
71	M	6	27	+ / + / +	265	237.000	1418	1106	310
98	F	5	22	- / - / +	858	71.000	2436	1898	970
99	F	3	83	+ / - / -	1680000	127.000	1605	1445	352
100	F	1	31	- / - / -	188	222.000	2139	1546	540
102	F	2	26	- / - / -	7370000	154.000	992	675	152
106	F	4	82	- / + / +	400455	10.000	2442	1702	175
111	F	4	54	+ / + / +	674	95.000	1343	1121	294
138	F	6	70	- / + / +	237	24.000	2419	1340	331

4.2. Parâmetros hematológicos

4.2.1. Plaquetas

Na infecção por dengue é comum a diminuição no número de plaquetas circulantes no sangue periférico durante a fase virêmica ao analisar o exame hemograma. A Figura 1A mostra o decréscimo significativo do número absoluto de plaquetas de pacientes acometidos por dengue [M:152 (IQR:110-207)] comparado com indivíduos saudáveis [M:226 (IQR:166-310)] ($p<0.0001^{***}$). Quando estratificada por dias de sintomas (figura 1B), a análise mostra que há uma diminuição destas plaquetas no decorrer do tempo: 1 e 2 dias: [M:174 (IQR: 147-232)]; 3 e 4 dias: [M: 153(IQR: 115-206)] e 5 e 6 dias: [M: 94(IQR: 28-154)] quando comparadas com o controle ($p<0,0001^{***}$), e após o período de viremia, os valores voltam a se estabilizar tendendo a normalidade que vai de 140.000 a 450.000/mm³ de sangue.

Figura 9. Alterações plaquetárias. A: Número absoluto de plaquetas de controles saudáveis comparados com pacientes acometidos por dengue ($p<0.0001^{***}$). **B:** Número de plaquetas de controles saudáveis comparados com pacientes infectados em diferentes dias de sintomas ($p<0,0001^{***}$).

4.2.2. Leucócitos

Além da diminuição no número de plaquetas, na dengue também é comum o decréscimo no número de leucócitos. A Figura 7A mostra esta diminuição nos indivíduos infectados [M: 4400 (IQR: 3275 - 6400)] comparados com os saudáveis

[M: 8100 (IQR: 6140 - 9335)], ($p < 0,0001^{***}$). Ao analisar os leucócitos em diferentes dias de sintomas (Figura 7B), é possível observar que há uma queda significativa nos dias 1 e 2 [M: 5100 (IQR: 3750 - 6450)] e 3 e 4 [M: 3600 (IQR: 3100 - 5100)] em relação ao controle ($p < 0,0010^{***}$). No entanto não se observa diferença estatisticamente significante entre os dias de sintomas.

Figura 10. Leucopenia. A: Número absoluto de leucócitos de controles saudáveis comparados com indivíduos infectados pelo vírus da dengue ($p < 0,0001^{***}$). B: Número absoluto de infectados em diferentes dias de sintomas ($p < 0,0010^{***}$).

4.2.3. Linfócitos

Quanto à contagem de linfócitos, foi possível verificar uma linfopenia. As análises em porcentagem da Figura 9A mostram que não houve diferença significativa entre o grupo de indivíduos infectados por dengue comparados aos saudáveis ($p = 0,1995$), porém na figura 9B, os linfócitos apresentaram-se aumentados nos pacientes com 5 e 6 dias de sintomas [M: 35 (IQR: 28 - 44)] comparados com os dias 1 e 2 [M: 29 (IQR: 16-33)] ($p = 0,0281^*$). No entanto, ao observar o número absoluto de linfócitos nos indivíduos saudáveis [M: 2.220 (IQR: 1.910-3.120)] comparados aos pacientes acometidos por dengue [M: 1277 (IQR: 826 - 2129)] (Figura 9C), nota-se uma diminuição significativa deste parâmetro ($p < 0,0001^{***}$).

Figura 11. Avaliação de linfócitos totais em pacientes com dengue e em voluntários saudáveis.
A: Porcentagem de linfócitos de indivíduos saudáveis comparados com pacientes acometidos por dengue. **B:** Porcentagem de linfócitos de controles saudáveis comparados com pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas. **C:** Número absoluto de linfócitos de indivíduos saudáveis comparados com infectados por dengue **D:** Número absoluto de linfócitos de controles saudáveis comparados com pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas.

Foi observado também, na Figura 9D, um decréscimo destes valores nos períodos de sintomas: 1 e 2 dias [M: 1108 (IQR: 816 - 1605)] e 3 e 4 [M: 1008 (IQR: 816 - 1605)], comparados aos controles saudáveis, mas houve um aumento no número de linfócitos nos dias 5 e 6 [M: 2387 (IQR: 1361 - 3310)], comparados aos outros dias de sintomas ($p < 0.0001^{***}$).

4.3. Linfócitos T

4.3.1. Linfócitos T CD3+

A expressão de CD3 foi analisada tanto em indivíduos saudáveis como em pacientes acometidos por dengue. A análise da expressão deste marcador em porcentagem (Figura 10A), mostra que não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis [M:71 (67-76)] comparado aos infectados [M:69 (63-76)] ($p=0.4604$). Isto também foi observado nos pacientes em diversos dias de sintomas: 1 e 2 dias: [M:68 (56-74)]; 3 e 4 dias [M:70 (63-78)] e 5 e 6 dias [M:74 (65-79)] ($p=0.2710$) comparados com os saudáveis (Figura 10B). Na análise do número absoluto destes linfócitos (Figura 10C), foi possível observar uma diminuição da expressão de CD3+ em pacientes com dengue [M: 811 (IQR: 578 - 1455)] quando comparados com indivíduos saudáveis [M: 1559 (IQR: 1412 - 2055)] ($p<0.0001^{***}$). Além disso, a Figura 10D mostra um aumento no número absoluto destes linfócitos nos dias 5 e 6 de sintomas [M: 1528 (IQR: 979 - 2693)] comparados aos dias 1 e 2 [M: 757 (IQR: 413 - 1163)] e 3 e 4 [M: 710 (IQR: 561 - 1211)]. Ao analisar o perfil de expressão da proteína CD3 nos indivíduos saudáveis [M:1559 (IQR:1412-2055)] comparado com os pacientes infectados nos grupos de dias 1 e 2, 3 e 4, nota-se uma queda dos linfócitos na fase precoce de sintomas ($p<0.0001^{***}$).

Figura 12. Avaliação de linfócitos T CD3+. A. Porcentagem de linfócitos T CD3+ de indivíduos saudáveis comparado com saudáveis B. Porcentagem de linfócitos T CD3+ de controles saudáveis comparados com pacientes infectados em diferentes dias de sintomas. C. Número absoluto de linfócitos T CD3+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes infectados. D. Número absoluto de linfócitos T CD3+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes infectados e em diferentes dias de sintomas.

4.3.2. Linfócitos T CD4+

Outra subpopulação de linfócitos T analisada neste estudo é a que expressa a molécula CD4. A Figura 11 mostra a análise em porcentagem e em número absoluto dos pacientes com dengue e dos indivíduos saudáveis. Na figura 11A nota-se um aumento na porcentagem de linfócitos T CD4+ nos pacientes acometidos por dengue [M:64 (IQR:58-69)] comparado com indivíduos saudáveis [M:53 (IQR:51-63)] ($p=0.0052^{**}$). Na figura 11B também foi verificado um aumento destes linfócitos

nos pacientes com sintomas nos dias 3 e 4 [M:68 (IQR:60-73)] comparados com aqueles com sintomas nos dias 5 e 6 [M:60 (IQR:45-66)] e aos saudáveis ($p=0.0009^*$). Há também uma diminuição do número absoluto em indivíduos acometidos por dengue [M:558 (330–891)] quando comparado com os indivíduos saudáveis [M:916 (756–1152)], $p=0.001^{**}$. Observando os dias de sintomas, constata-se um aumento de linfócitos T CD4+ em indivíduos nos dias 5 e 6 [M: 926 (IQR: 634 - 1079)] de infecção quando comparados com indivíduos nos dias 1 e 2 de [M: 440 (IQR: 246 - 759)], $p=0.0004^{***}$. Outra diferença significativa foi observada entre o controle e os dias 1 e 2, bem como nos dias 3 e 4 de sintomas [M:473 (328-861)].

Figura 13. Avaliação de linfócitos T CD4+. A. Porcentagem de linfócitos T CD4+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes acometidos por dengue. B. Porcentagem de linfócitos T CD4+ pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas. C. Número absoluto de linfócitos T CD4+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes com dengue. D. Número absoluto de linfócitos T CD4+ de controles saudáveis comparados com pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas.

4.3.3. Linfócitos T CD8+

Outra subpopulação de linfócitos T analisada neste estudo foi aquela que expressa a molécula CD8. Na Figura 12 que trata da análise em porcentagem e em números absolutos destas células em pacientes com dengue e indivíduos saudáveis, foi possível observar que não houve diferença na porcentagem de linfócitos T CD8+ entre indivíduos acometidos por dengue [M:31 (IQR:26-39)] quando comparados com os saudáveis [M:29 (19-34)] $p=0.1192$. A análise também mostra um aumento destas células no dias de sintomas 5 e 6 [M:38 (29-53)] comparadas aos dias 3 e 4 [M:28 (24-35)] e ao controle $p=0.0127^*$. Em número absoluto é possível observar um decréscimo de linfócitos T CD8+ em indivíduos acometidos por dengue [M:260 (162-409)] quando comparados a indivíduos saudáveis [M: 465 (IQR: 329-605)], $p=0.0087^{**}$. Além disso, há um aumento no número de linfócitos T CD8+ em indivíduos acometidos por dengue nos dias 5 a 6 [M: 534 (IQR: 285 - 1644)] quando comparados com indivíduos acometidos por dengue nos dias 1 a 2 [M: 253 (IQR: 151 - 358)] e 3 a 4 [M: 201 (158 - 345)]. Observa-se também uma queda deste marcador no dias 1 e 2 bem como nos dias 3 e 4 quando comparados ao controle $p=0.0001^{***}$.

Figura 14. Avaliação de linfócitos T CD8+. A. Porcentagem de linfócitos T CD8+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes acometidos por dengue $p=0.1192$. B. Porcentagem de linfócitos T CD8+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes infectados e em diferentes dias de sintomas $p=0.0127^*$. C. Número absoluto de linfócitos T CD8+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes infectados $p=0.0087^{**}$. D. Número absoluto de linfócitos T CD8+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes infectados e em diferentes dias de sintomas $p=0.0001^{***}$.

4.3.4. Razão CD4/CD8

Foi analisada a razão CD4/CD8 nos controles saudáveis e em pacientes com dengue, nos dias 1 e 2, 3 e 4, e 5 e 6 após o início dos sintomas. A Figura 13 demonstra diminuição da razão em pacientes com dengue na fase mais tardia da doença, ou seja, nos dias 5 e 6 após o início dos sintomas [M: 2 (1-2)].

Figura 15. Avaliação da razão CD4/CD8. Análise da razão CD4/CD8 de indivíduos saudáveis comparados aos pacientes infectados por dengue em diferentes dias de sintomas $p=0,033^*$

4.4. Linfócitos T CD8+ e carga viral

Em seguida foi constatada a existência de uma correlação negativa entre linfócitos T CD8+ e a carga viral dos pacientes. Indivíduos com elevada carga viral apresentando de 1 a 4 dias de sintomas tiveram um perfil diminuído do número absoluto de linfócitos T CD8+, não ultrapassando 450 células/μL. Esta correlação foi estatisticamente significativa nos dias 1 e 2 ($r = -0,6$)** e 5 e 6 ($r = -0,5$)*.

Figura 16. Análise de Correlação entre carga viral *versus* número absoluto de linfócitos T CD8+ em pacientes acometidos por dengue observados em diferentes dias de sintomas. A linha horizontal pontilhada foi traçada arbitrariamente em 1.050 cópias/ml, enquanto a linha vertical pontilhada foi traçada arbitrariamente em 450 células/ μ l. Estes valores foram escolhidos para identificar três grupos de resultados, nos respectivos quadrantes.

4.5. Proliferação de linfócitos T CD8+

A partir das análises que demonstraram o aumento da expressão de linfócitos T CD8+ nos dias de sintomas 5 e 6, houve a necessidade de investigar qual seria o perfil de proliferação destes linfócitos nos diferentes dias de sintomas também. Portanto, foram realizados ensaios imunológicos, utilizando a técnica de citometria de fluxo, para detecção da proteína Ki67 que neste caso é expressa durante o ciclo celular. Na figura 8 estão demonstrados gráficos com análises tanto em porcentagem como em número absoluto. Nas análises em porcentagem os indivíduos acometidos por dengue [M:4 (IQR:2-14)] apresentaram maior proliferação de linfócitos T CD8+ quando comparados com indivíduos saudáveis [M: 1 (IQR:1-2)], $p < 0,0001$ ***. Nos dias de sintomas 5 e 6 [M:20 (IQR:10-31)] houve maior proliferação de linfócitos T CD8+ quando comparados com os dias 1 e 2 [M:2 (IQR:1-3)] e ao controle, $p < 0,0001$ ***. As análises em número absoluto puderam demonstrar que os indivíduos acometidos por dengue [M:14 (IQR:7-40)] também tiveram maior proliferação celular quando comparado com indivíduos saudáveis [M:4 (IQR:3-12)], $p = 0,0016$ **. Nos dias de sintomas 5 e 6 [M:113 (IQR:21-418)] houve maior proliferação de linfócitos T CD8+ quando comparados com os dias 1 e 2 [M:11 (IQR:3-16)] e ao controle, $p = 0,0002$ ***.

Figura 17. Proliferação de Linfócitos T CD8+. A. Porcentagem de linfócitos T CD8+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes acometidos por dengue. B. Porcentagem de linfócitos T CD8+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes infectados em diferentes dias de sintomas. C. Número absoluto de indivíduos saudáveis comparados com linfócitos T CD8+ de pacientes com dengue. D. Número absoluto de linfócitos T CD8+ de indivíduos saudáveis comparados com pacientes infectados em diferentes dias de sintomas.

4.6. Ativação de linfócitos T CD8+

Após as análises que constatarem a proliferação dos linfócitos T CD8+, sentiu-se necessidade de saber também a respeito do estado de ativação destas células. Para isso, ensaios imunológicos foram realizados utilizando anticorpos monoclonais anti-HLA-DR e anti-CD38, que estão comumente expressos em linfócitos T ativados. A Figura 16 mostra tanto análises de porcentagem como de número absoluto de linfócitos T CD8+ expressando estes marcadores de ativação. Indivíduos infectados por dengue nos dias 5 e 6 de sintomas [M:34 (IQR:20–59)]

apresentam maior expressão de HLA-DR⁺ e CD38⁺ quando comparados com indivíduos saudáveis [M: 3 (IQR:3–5)], $p<0,0001^{***}$. A mesma análise, agora em números absolutos, mostra que os indivíduos com dengue nos dias 5 a 6 de sintoma [M:114 (IQR: 45–1110)] apresentam maior expressão dos marcadores HLA-DR⁺ e CD38⁺ quando comparados com indivíduos saudáveis [M:14 (IQR:12–21)], $p<0,0001^{***}$.

Figura 18. Ativação de Linfócitos T CD8⁺. **A.** Expressão de marcadores de ativação de linfócitos T CD8⁺ expressando CD38⁺ e HLA-DR⁺ em porcentagem de indivíduos saudáveis comparados aos pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas. **B.** Expressão de marcadores de ativação de linfócitos T CD8⁺ (CD38⁺ e HLA-DR⁺) em número absoluto de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas e comparados aos indivíduos saudáveis.

4.7. Subpopulações de linfócitos T CD8⁺ *naïve* e de memória

A próxima etapa de investigação foi verificar o estado de ativação de quatro subpopulações de linfócitos T CD8⁺: *naïve* ; memória central (TCM); memória efetora (TEM) e memória efetora altamente diferenciada (TEMRA). Estas subpopulações foram classificadas de acordo com a expressão dos marcadores CCR7 CD45RA e CD27. O perfil de ativação foi analisado através da expressão dos marcadores HLA-DR e CD38 para cada subpopulação de linfócitos T CD8⁺. Estas análises estão demonstradas em valor percentual e absoluto dos indivíduos infectados em diferentes dias de sintomas e comparados com os controles saudáveis.

4.7.1. Linfócitos T CD8+ *Naïve*

A subpopulação de linfócitos T CD8+ *naïve* analisada neste estudo, caracteriza-se por expressar simultaneamente os marcadores de superfície CCR7, CD45RA e CD27. A Figura 10 mostra o perfil de ativação desta população de células através da análise dos marcadores HLA-DR e CD38. Os resultados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que apresentaram diferentes dias de sintomas comparados com o controle e, estas análises, estão demonstradas em porcentagem e em número absoluto.

Figura 19. Ativação de Linfócitos T CD8+ *naïve*. A) Expressão de marcadores de ativação (CD38 e HLA-DR) de linfócitos T CD8+ *naïve* em porcentagem de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas e comparados com controles saudáveis mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa. B) Expressão dos mesmos marcadores de ativação de linfócitos T CD8+ *naïve* em número absoluto de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas e comparados aos controles saudáveis, mostrando novamente a ausência de significância estatística.

4.7.2. Linfócitos T CD8+ de Memória Central

Dentre os marcadores já estudados que definem o fenótipo de células de memória central, neste trabalho foi considerada a subpopulação de linfócitos T CD8+ que fenotipicamente caracterizaram-se como: CCR7+ CD45RA- e CD27+. A Figura 18 mostra o perfil de ativação destes linfócitos, em porcentagem e em número absoluto, ao analisar os marcadores HLA-DR e CD38. O Gráfico de resultados em porcentagem indica que os indivíduos infectados, apresentando sintomas nos dias 5 e

6 do período de viremia [M:54 (IQR:40-74)], possuem um perfil mais ativado, ou seja, expressam HLA-DR juntamente com CD38 em maior proporção quando comparados com os indivíduos saudáveis [M:5 (IQR:4-10)] $p<0.0001^{***}$. Já em número absoluto esta análise não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos de dias de sintomas comparados aos saudáveis.

Figura 20. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória central. A) Análise da porcentagem da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória central de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas comparados aos controles saudáveis. B) Análise em número absoluto da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória central de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas e comparados aos controles saudáveis.

4.7.3. Linfócitos T CD8+ de Memória Efetora (CD45RA+)

A outra subpopulação analisada foi a de memória efetora (TEM). Neste trabalho esta subpopulação foi caracterizada baseada nos seguintes marcadores: CCR7- CD45RA+ e CD27+. As Figuras 19A e 19B mostram o perfil de ativação destes linfócitos, baseado nos marcadores HLA-DR e CD38, em porcentagem e em número absoluto, respectivamente. Na Figura 12A, observa-se que os indivíduos infectados, apresentando sintomas nos dias 5 e 6 do período de viremia [M:26 (IQR:14-47)], expressam uma porcentagem significativamente aumentada dos marcadores HLA-DR e CD38 simultaneamente, quando comparados com os indivíduos saudáveis [M:4 (IQR:3-6)] ($p<0.001^{**}$). Já em número absoluto (Figura 19B) esta análise não mostrou diferença significativa entre os grupos de dias de sintomas comparados aos saudáveis.

Figura 21. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória efetora CD45RA+. A) Análise da porcentagem da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória efetora de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas comparados aos controles saudáveis. B) Análise em número absoluto da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória efetora de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas e comparados aos controles saudáveis.

4.7.4. Linfócitos T CD8+ de Memória Efetora (CD45RA-)

A mesma subpopulação de linfócitos T CD8+ de memória efetora da seção anterior foi analisada, porém caracterizada fenotipicamente como: CCR7- CD45RA- e CD27+. As Figuras 20A e 20B mostram o perfil de ativação desta população, baseado nos marcadores HLA-DR e CD38, em porcentagem e em número absoluto, respectivamente. Na Figura 20A, observa-se que os indivíduos infectados, apresentando sintomas nos dias 5 e 6 do período de viremia [M:39 (IQR:29-76)], expressam uma porcentagem significativamente aumentada dos marcadores HLA-DR e CD38 simultaneamente, quando comparados com os indivíduos saudáveis [M:4 (IQR:3-7)] ($p < 0.0001^{***}$). Para a análise de expressão dos marcadores CD38+ e HLA-DR- também ocorreu uma diferença nos dias 5 e 6 de sintomas [M:17 (IQR:10-28)] comparados ao controle [M:3 (IQR:2-4)] ($p < 0.01$). Em número absoluto (Figura 20B), a análise mostrou diferença significativa entre os mesmos grupos da figura 13A (CD38+HLA-DR+ e CD38+HLA-DR-). Ao analisar a expressão de CD38 e HLA-DR simultaneamente, foi constatado um aumento de sua expressão nesta subpopulação nos dias 5 e 6 de sintomas [M:167 (IQR:82-1423)] comparados ao controle [M:18 (13-36)] ($p < 0.01^*$). Houve um aumento também na expressão de

CD38+HLA-DR- nos dias 5 e 6 de sintomas [M:83 (48-215)] comparados ao controle [M:10 (5-22)] ($p<0.01^*$).

Figura 22. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória efetora CD45RA-. A) Análise da porcentagem da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória efetora de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas comparados aos controles saudáveis. B) Análise em número absoluto da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória efetora de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas e comparados aos controles saudáveis.

4.7.5. Linfócitos T CD8+ de Memória Altamente Diferenciada (CD45RA+)

Linfócitos T CD8+ de memória efetora altamente diferenciada foram caracterizados fenotipicamente como: CCR7- CD45RA+ e CD27-. As Figuras 21A e 21B mostram o perfil de ativação desta população, baseado nos marcadores HLA-DR e CD38, em porcentagem e em número absoluto, respectivamente. Na Figura 21A, observa-se que não existe diferença significativa entre os indivíduos infectados em diferentes dias de sintomas comparados aos controles saudáveis. No entanto verifica-se que há uma tendência no aumento da expressão dos marcadores HLA-DR e CD38 dos indivíduos infectados nos dias de sintomas 5 e 6 comparados com os indivíduos saudáveis. Na análise em número absoluto (Figura 21B) também não houve diferença significativa entre os grupos porém nota-se a mesma tendência que na Figura 21A ao analisar a expressão de CD38 e HLA-DR simultaneamente. Esta tendência também é visualizada e quando se analisa o fenótipo CD38+HLA-DR-.

Figura 23. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória altamente diferenciada CD45RA+. A) Análise da porcentagem da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória efetora altamente diferenciada de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas comparados aos controles saudáveis. B) Análise em número absoluto da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória efetora de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas e comparados aos controles saudáveis.

4.7.6. Linfócitos T CD8+ de Memória Altamente Diferenciada (CD45RA-)

A mesma subpopulação de linfócitos T CD8+ de memória efetora altamente diferenciada da seção anterior foi analisada, porém caracterizada fenotipicamente como: CCR7- CD45RA- e CD27-. As Figuras 22A e 22B mostram o perfil de ativação desta população, baseado nos marcadores HLA-DR e CD38, em porcentagem e em número absoluto, respectivamente. Na Figura 22A, observa-se que os indivíduos infectados, apresentando sintomas nos dias 5 e 6 do período de viremia [M:34 (IQR:15-52)], expressam uma porcentagem significativamente aumentada dos marcadores HLA-DR e CD38 simultaneamente, quando comparados com os indivíduos saudáveis [M:5 (IQR:2-9)] ($p < 0.01^*$). Para a análise de expressão dos marcadores CD38+ e HLA-DR- também ocorreu uma diferença nos dias 5 e 6 de sintomas [M:34 (IQR:15-47)] comparados ao controle [M:5 (IQR:2-10)] ($p < 0.01^*$). A análise do número absoluto (Figura 22B), mostra que não existe diferença significativa entre os indivíduos infectados em diferentes dias de sintomas comparados aos controles saudáveis. No entanto verifica-se que há uma tendência no aumento da expressão dos marcadores HLA-DR e CD38 dos indivíduos infectados

nos dias de sintomas 5 e 6 comparados com os indivíduos saudáveis e esta tendência também é visualizada ao analisar o fenótipo CD38+HLA-DR-.

Figura 24. Ativação de Linfócitos T CD8+ de memória altamente diferenciada. A) Análise da porcentagem da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória efetora altamente diferenciada de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas comparados aos controles saudáveis. B) Análise em número absoluto da expressão de HLA-DR e CD38 em linfócitos T CD8+ de memória efetora de pacientes com dengue em diferentes dias de sintomas e comparados aos controles saudáveis.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliados algumas variáveis hematológicas e o perfil fenotípico de linfócitos T CD4+ e CD8+, tanto em indivíduos saudáveis, como naqueles com diagnóstico laboratorial de dengue confirmado (os quais se encontravam na fase aguda da doença). Este estudo foi realizado durante uma epidemia na Baixada Santista, durante o primeiro semestre de 2010. Nosso grupo identificou a ocorrência de casos naquela região e foi o primeiro a determinar que se tratava de infecções causadas por DEN-2 (Romano *et al.*, 2010). A epidemia ocorreu em uma região que já havia sido acometida pela doença em anos anteriores, o que se refletiu na maioria (58%) dos pacientes incluídos apresentarem perfil sorológico compatível com infecção secundária, já que apresentavam positividade para anticorpos IgG na fase aguda da doença.

Já foi descrito que na infecção por DEN pode ocorrer uma anemia aplástica, responsável pela produção insuficiente, pela medula óssea, de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas (Albuquerque *et al.*, 2009). Não documentamos nenhum caso com essas características extremas, mas notamos um efeito supressor da produção de células pela medula óssea. Observamos uma queda estatisticamente significativa em várias variáveis mensuradas no hemograma, incluindo plaquetas, hemoglobina, leucócitos e linfócitos totais.

Em relação aos linfócitos T CD4+ e CD8+ foi constatado que houve uma diminuição significativa dessas células no início da infecção. Este quadro se reverteu no quinto e sexto dia de sintomas quando analisamos a frequência de linfócitos T CD8+, apresentando-se mais elevada. Quando analisamos a razão CD4/CD8, verificamos uma queda no quinto e sexto dia de sintomas. Também observamos uma correlação inversa entre o número absoluto de linfócitos T CD8+ e a carga viral dos pacientes, que foi variável ao longo dos dias de sintomas da dengue. Tais células apresentaram maior positividade para presença de Ki67 no quinto e sexto dias de sintomas, sugerindo aumento de proliferação que se seguiu a maior viremia documentada nos primeiros dias. Também constatamos, de forma marcante, o aumento progressivo da ativação de linfócitos T CD8+, especialmente no quinto e sexto dia de sintomas, nas subpopulações de memória central, efetora e altamente

diferenciada. Este trabalho é de extrema relevância, pois aborda análises das características hematológicas e imunológicas em pacientes na fase aguda da dengue. Seus resultados podem auxiliar os estudos relacionados ao entendimento da patogênese da doença além de definir marcadores laboratoriais que eventualmente indiquem seu prognóstico.

Atualmente não existe um consenso em relação ao papel do gênero do indivíduo no prognóstico da dengue. Neste trabalho, verificamos maior frequência de mulheres acometidas pela doença. É importante ressaltar, como descrito no trabalho de Gonzáles, que o gênero do paciente não interfere na gravidade da doença (Gonzalez *et al.*, 2008).

Ao analisarmos os resultados do hemograma verificamos uma diminuição de todos os parâmetros hematológicos na infecção por DEN, dentre eles a contagem de plaquetas, confirmando publicações anteriores sobre a apresentação laboratorial de dengue na fase aguda da doença (Gonzalez *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Um dos fatores que contribuem para essa diminuição é o fato do vírus conseguir infectar diretamente as plaquetas, destruindo-as (Wang *et al.*, 1995). A auto-imunidade também está envolvida neste processo através do mimetismo molecular onde anticorpos dirigidos contra a proteína não estrutural NS1 mostraram reatividade cruzada com plaquetas e células endoteliais humanas, facilitando o desencadeamento de eventos inflamatórios e consequente queda plaquetária (Lin *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011). Já foi relatado também que a hipertermia pode induzir uma série de respostas fisiológicas nas plaquetas incluindo eventos apoptóticos relacionados a despolarização da membrana interna da mitocôndria (Wang *et al.*, 2010). As plaquetas possuem um papel importante na manutenção da integridade do endotélio e na homeostase, e a sua queda interfere nos eventos normais de coagulação do indivíduo infectado, podendo resultar em quadros hemorrágicos, tendo um impacto direto no prognóstico da doença (Wang *et al.*, 2010). Por isso, em meio a uma epidemia, é natural que o parâmetro hematológico mais preocupante observado no hemograma seja a contagem de plaquetas. Durante a coleta das amostras em Santos, verificamos que o hospital manteve um monitoramento adequado desses pacientes não só em relação a contagem de plaquetas, mas também no que se refere aos

aspectos clínicos, devido a possibilidade de evolução rápida da doença para formas graves.

Na série eritrocítica, observamos um reflexo da supressão medular, caracterizado por uma queda na porcentagem de hemoglobina, que pode ter sido associada a sintomas como cansaço, tonturas, fraqueza, dores musculares e dificuldade respiratória (Varella, 2010). Já em relação ao hematócrito, apesar de ter sido detectada uma queda significativa dos mesmos em nosso trabalho, muitos estudos relatam evidências no aumento desses valores, muitas vezes em infecções graves onde há grande permeabilidade vascular (Vals, 2011). Nós acreditamos que a o fato de termos estudado pacientes com dengue clássica e usual concomitância de hidratação parenteral com solução glicofisiológica administrada a muitos dos pacientes durante o período em que permaneceram no hospital, possam explicar este achado. De fato, muitas das coletas das amostras de sangue foram realizadas no momento da hidratação.

Outros trabalhos descrevem que a depressão medular é responsável pela queda no número de leucócitos e linfócitos no sangue periférico (La Russa e Innis, 1995). A linfopenia observada neste estudo se deu entre o primeiro e o quarto dia de sintomas. Isso se deve, provavelmente, a razões como a infecção e destruição do linfócito, sequestro esplênico linfocitário, desvio para os linfonodos ou pelo simples fato de não terem tido tempo de proliferarem totalmente (Lopes, 2010). Sugerimos que a linfopenia observada neste estudo se trata de um efeito transitório inicial. Após os primeiros quatro dias de sintomas, os valores de leucócitos e linfócitos circulantes se restabeleceram.

Quanto à distribuição de linfócitos T, observamos uma queda na razão CD4/CD8 nos dias cinco e seis após o início dos sintomas. Essa inversão também ocorre em outras doenças virais, como a causada pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV). Essa reversão transitória na razão CD4/CD8 se deve ao aumento no número de células T CD8+, uma vez que durante a infecção primária pelo EBV ou durante a reativação da infecção, o hospedeiro promove uma resposta vigorosa de células T citotóxicas, necessária para o controle da infecção latente pelo vírus (Blumberg *et al.*, 1987; Tomkinson *et al.*, 1989). No caso da dengue, um estudo relata queda, no período de seis a dez dias após o início dos sintomas (Liu *et al.*, 2002), mas o autor

sugere que a patogênese ainda precisa ser melhor caracterizada para que se consiga elaborar uma hipótese sobre este fato. Um trabalho relatando a cinética do perfil de expressão de subpopulações de linfócitos T em bebês e crianças mostrou um decréscimo no número absoluto dessas células no estágio febril, sendo o menor valor detectado no primeiro dia de infecção, comparado aos dias subsequentes. Além disso, ao analisar os linfócitos T CD8+, foi constatado que houve um aumento demasiado destes linfócitos em torno de dois dias após o período febril, chegando a ultrapassar o limite da normalidade (Sarasombath *et al.*, 1988). Nossos resultados apontam para uma vigorosa proliferação de linfócitos T CD8+ como causa deste fenômeno. A identificação de aumento expressivo de células que expressam Ki67 ocorreu ao mesmo que o rebote no número de linfócitos T CD8+ circulantes e da queda na razão CD4/CD8. Verificamos uma maior proliferação celular no período final da viremia e neste mesmo período, verificou-se que as células estavam significativamente ativadas quando comparadas aos dias de sintomas anteriores e aos indivíduos saudáveis. Um dos primeiros trabalhos referente à ativação de linfócitos T mostrou que há maior liberação de CD8 solúvel em infecções graves comparadas com dengue clássica, sugerindo que os linfócitos T CD8+ estão ativados na infecção por dengue grave. Também foi detectado, em uma pequena porcentagem de pacientes com dengue clássica, um aumento de CD8 solúvel nos dias cinco e seis após o início dos sintomas, comparados aos indivíduos saudáveis (Kurane *et al.*, 1989). Já foi relatado também que as células T CD8+ expressando marcadores de ativação como HLA-DR, Q, P e grânulos citolíticos apresentaram-se significativamente aumentados em pacientes com dengue comparados a indivíduos saudáveis, e que esta ativação ocorre no período de viremia, podendo contribuir para o *clearance* viral (Azeredo *et al.*, 2006). Estudos revelaram que células T CD8+ expressando HLA-DR estavam significativamente presentes em casos de dengue grave. Apesar da ativação de células T CD8+ ser um evento esperado e estar associado a um melhor prognóstico durante infecções virais, é sabido que na infecção pelo HIV altos níveis de expressão de CD38 nas células T CD8+ estão relacionados com a rápida progressão da doença independente da carga viral plasmática detectada (Liu *et al.*, 1998) e recentemente foi considerado que baixos valores percentuais de células T CD8+ expressando HLA-DR é considerado um preditor de não progressão

a doença (Paul *et al.*, 2005). No trabalho de Azeredo mostra que o *status* de ativação imune na dengue encontrou-se significativamente aumentado comparado com os indivíduos saudáveis, relatando que isso poderia contribuir para o diagnóstico precoce de gravidade da doença. Porém não descartou a possibilidade das células T CD8+ ativadas contribuírem para eliminação do vírus (Azeredo *et al.*, 2006). As razões pelas quais a ativação de células T esteja associada à piora da dengue ainda são desconhecidas. Outros fatores como exaustão imunológica, hiporresponsividade de células T e alterações nos receptores de células T devem ser avaliados para verificar como a ativação dessas células poderia influenciar a gravidade da infecção. Acreditamos, portanto, que o *clearance* da infecção viral não ocorra devido ao simples aumento da contagem dessas células T CD8+, mas pelo aumento no estado de ativação, o que coincide com o desaparecimento da circulação viral.

Em seguida, avaliamos se o aumento na contagem do número absoluto de células T CD8+ poderia estar correlacionado ao controle da viremia com o passar dos dias de sintomas. Foi observada uma correlação negativa significativa, pois houve uma queda na viremia à medida que os linfócitos T CD8+ aumentavam no decorrer da fase aguda da doença. A bibliografia aborda que as células T CD8+ desempenham um papel importante no *clearance* viral devido sua habilidade em produzir vários fatores envolvidos na supressão da replicação do vírus (Guidotti & Chisari, 2001) bem como na lise de células infectadas (Carbone *et al.*, 1998). Dessa maneira, acreditamos que as células T CD8+ desempenham um papel fundamental no controle da viremia na infecção por DEN, porém outras células poderiam estar envolvidas nesse controle como as células dedriticas e as células NK logo no início da infecção (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005).

Em virtude do importante papel dos linfócitos T CD8+ na resposta imune da dengue, decidimos avaliar seu perfil de ativação das subpopulações de memória. Observamos que as células de memória central, efetora e as de memória efetora altamente diferenciadas obedeciam a um perfil de ativação crescente até o quinto e sexto dias, semelhante ao observado para células T CD8+ totais. Considerando os marcadores de ativação avaliados (HLA-DR+ e CD38+), todos os subtipos de memória apresentaram maior porcentagem de células expressando simultaneamente ambos os marcadores de ativação, nos dias cinco e seis de sintomas. Foi observado

que os linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos na patogênese da dengue, inclusive nas formas graves da doença (causada pela infecção por um sorotipo heterólogo, distinto daquele causador da infecção prévia) devido à sua ativação exacerbada que culmina na liberação de citocinas vasoativas e causam injúrias no endotélio do hospedeiro (An *et al.*, 2004; Rothman e Ennis, 1999). No entanto, apesar das células T CD8⁺ apresentarem um perfil exacerbado de ativação, elas parecem não possuir a capacidade de desempenhar sua função citotóxica protetora devido ao reconhecimento cruzado de baixa afinidade de antígenos do sorotipo heterólogo, resultando em uma imunopatologia no final da viremia (Friberg *et al.*, 2011; Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Considerando que aproximadamente 60% dos pacientes envolvidos neste estudo apresentaram sorologia positiva para anticorpos IgG específicos para dengue nos primeiros dias de sintoma (quadro sugestivo de infecção secundária), sugerimos que a ativação celular observada nas subpopulações de linfócitos T CD8⁺ de memória seja em resposta a infecção. A análise da resposta celular específica contra o vírus deveria ser realizada para confirmar a nossa hipótese. A associação entre a ativação celular observada e a gravidade da doença nos pacientes também seria um aspecto interessante a ser analisado, porém a inviabilidade do acompanhamento dos mesmos impossibilitou que esta análise fosse realizada.

A análise referente à expressão dos marcadores de ativação (HLA-DR⁺ e CD38⁺) nas subpopulações de linfócitos T CD8⁺ de memória TEM e TEMRA, foram avaliadas na presença e na ausência de expressão de CD45RA. Observamos maior ativação nas células de memória efetora expressando ou não este marcador, nos dias cinco e seis de sintomas, quando comparados aos indivíduos saudáveis. Em relação à população TEMRA expressando o marcador CD45RA, não foi observada diferença significativa quando avaliamos os mesmos parâmetros observados anteriormente. Porém, as análises de TEMRA, na ausência da expressão desse marcador, mostram diferença significativa na expressão dos marcadores de ativação no mesmo período de sintomas. Alguns estudos indicam que as células T de memória podem expressar ou não a molécula CD45RA e isso está relacionado com o tipo de resposta a diferentes antígenos e citocinas em relação a proliferação, diferenciação e resistência a morte (Appay *et al.*, 2002; Dunne *et al.*, 2002; Faint *et al.*, 2001). No

entanto, como o objetivo do nosso trabalho não envolveu a avaliação da capacidade funcional de células T CD8⁺ específicas a DEN, não foi possível definir um fenótipo preciso das diferentes células de memória analisadas. A escolha dos marcadores de memória utilizados em nosso estudo baseou-se em um trabalho da literatura que define o fenótipo de células T CD8⁺ de memória a partir da análise dos atributos funcionais da célula (Appay *et al.*, 2008). Para que os fatores envolvidos na resposta imune de células T sejam entendidos são necessários estudos longitudinais em humanos, considerando as mudanças ocorridas nas células T em relação ao estado de ativação e aos fatores específicos do hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

1. Linfócitos T estavam diminuídos entre o primeiro e quarto dias de sintomas. Houve uma reversão na razão CD4:CD8 nos dias cinco e seis de sintomas
2. Houve uma relação inversa entre o número de linfócitos T CD8+ e a magnitude da carga viral entre os dias 1 e 6 de sintomas da dengue.
3. Na fase mais tardia de sintomas os linfócitos T CD8+ estavam aumentados e proliferando mais que nos primeiros dias de infecção
4. Foi documentado um aumento significativo na ativação de linfócitos T CD8+, através da detecção das proteínas CD38 e HLA-DR na superfície celular. Esta ativação aumento no curso da doença, até o sexto dia de sintomas.
5. A subpopulação de linfócitos T CD8+ que mais respondeu com ativação celular foi a de linfócitos de memória efetora, mas o fenômeno também foi observado em linfócitos de memória central e altamente diferenciados.

7. ANEXOS

7.1. Anexo A - Aprovação CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0652/09**, intitulado: **"IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA DENGUE E RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR NA FASE AGUDA DA DOENÇA."** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Esper Georges Kallás**
Pesquisador (a) Executante: **Andréia Manso de Matos**

CAPPesq, 16 de Julho de 2009

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice - Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

7.2. Anexo B – Submissão para publicação de artigo científico

CD8+ T lymphocyte expansion, proliferation and activation in dengue fever

Suggested authors and order: Andréia Manso de Matos¹, Karina I. Carvalho¹, Daniela Santoro Rosa¹, Lucy Santos Villas-Boas², Wanessa Cardoso da Silva², Célia Luiza de Lima Rodrigues², Olímpia M. N. P. F. Oliveira³, José Eduardo Levi¹, Evaldo Stanislau A. Araújo³, Expedito Luna², Claudio Sergio Pannuti¹, Esper G. Kallas^{1†}

¹ Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia (LIM-60), SP, Brazil

² Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias – (LIMHC), SP, Brazil

³ Hospital Ana Costa, Santos, SP, Brazil

Key words: dengue, dengue fever, CD8, lymphocyte, T lymphocyte, activation

Running title: CD8+ T activation in dengue fever (33 characters with spaces)

Word count (excluding face pages, abstract, and references): XXX words

Authors' contribution: AMM, KIC, and EGK designed the study, AMM, KIC, OMNPFO, and ESAA identified the patients and obtained the samples; AMM, KIC, and DSR processed the samples; AMM, KIC, and DSR performed the immunology assays; AMM, LSVB, WCS, JEL, and CSP performed the virology assays; AMM, KIC, DSR, EL, and EGK analyzed the data; AMM, KIC, EL, CSP, and EGK wrote the manuscript; CSP and EGK obtained funds.

1 **Footnote page**

2
3 [†]Corresponding author: Esper Georges Kallas, M.D., Ph.D.
4 Universidade de São Paulo
5 Laboratório de Investigação Médica 60
6 Av. Dr. Arnaldo 455, terceiro andar
7 São Paulo, SP, 01246-903
8 Phone: (+55-11) 3061-8395
9 Fax: (+55-11) 3061-8392
10 esper.kallas@usp.br
11

12 **Funding**

13
14 The present work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento
15 Científico e Tecnológico, Brazilian Ministry of Science and Technology (CNPq, grant
16 #476088/2009-7 to EGK). AMM and EGK's scholarships were supported by CNPq.
17 KIC's scholarship was supported by the Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de
18 Nível Superior, Brazilian Ministry of Education. URL of CNPq: URL www.cnpq.br;
19 URL of CAPES: www.capes.gov.br. The funder had no role in study design, data
20 collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.
21

22 **Acknowledgments:**

23
24 We are in debt with Maria Candida Souza Dantas and Issler Moraes Silva for the grant's
25 administrative support, and Bianca Natali Santos and Fernanda Romano Bruno for the
26 laboratory support at the LIM-60.
27
28

1 **ABSTRACT** (max 300 words, currently with 207 words)

2

3 Dengue fever induces a robust immune response, also characterized by T cell activation.

4 The level of cell activation may, however, be associated with more severe disease. In this

5 study, we explored the level of CD8+ T lymphocyte activation in the first six days after

6 onset of symptoms during a DENV2 outbreak in the coast of São Paulo State, Brazil, in

7 the first semester of 2010. Using flow cytometry, we were able to detect progressive

8 increase of CD8+ T lymphocytes later in the disease course in 74 dengue fever cases,

9 associated with viral control. Peripheral blood mononuclear cells from 30 cases were

10 thawed and evaluated using expanded phenotyping. The observed expansion of CD8+ T

11 cells was coupled with higher proliferation status, measured by Ki67 expression.

12 Increased cell activation was observed also later in the course of clinical presentation, by

13 the expression of activation markers CD38 and HLA-DR. Such augmented cellular

14 activation of CD8+ T lymphocytes was observed in all memory subsets, but was more

15 pronounced in the effector memory compartment, mostly driven by CD38 expression.

16 Together, besides confirming that dengue virus infection leads to an increased activation

17 of CD8+ T cells, our results determine which subpopulation mostly reacts in response to

18 the virus later in the disease course.

1 INTRODUCTION

2 Dengue is the most prevalent arthropod-borne viral disease in tropical and subtropical
3 regions, affecting - approximately 50-100 million people annually [1]. The World Health
4 Organization estimates that nearly 40% of the world population lives in areas at risk for
5 dengue transmission. Dengue cases in Central and Latin America have increased almost
6 five-fold in the last 30 years. During 2008, up to one million cases were reported in
7 Americas, and the higher number of deaths occurred in the Southern Cone [2]. In the
8 latest decades, Brazil has been hardly hit by the disease, accounting for more than 60% of
9 the total reported cases of dengue in the Americas [2]. The continuing occurrence of the
10 disease in resource limited countries and the lack of novel therapeutic approaches or an
11 effective vaccine made dengue fever to be considered a neglected disease. Surveillance
12 for dengue is deprived in most countries, and no existing model for predicting an
13 outbreak in endemic regions is widely available. Therefore, it is mandatory to advance
14 the knowledge on disease pathogenesis, aiming at developing new strategies to fight the
15 epidemic. The mechanisms by which dengue virus (DENV) causes severe illness remain
16 to be elucidated. Both biological properties of the viral isolates -and immunogenic host
17 factors seem to contribute to the level of pathogenicity [3,4,5,6]. Whereas immunity
18 induced by natural infection is believed to provide serotype-specific lifelong protection,
19 previous infection by a distinct serotype is considered to increase the high risk for the
20 development of dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS)
21 [5,7]. The immunological processes occurring during dengue infection are not yet
22 completely defined, however, incidence of mild dengue manifestations and occasional
23 progression to the more severe disease forms likely reflect a complex interplay between
24 host and viral factors including cytokine production by inflammatory cells. Previous
25 studies reported increased levels of circulating cytokines and soluble receptors in DHF
26 patients when compared to those in dengue fever (DF), indicating that immune activation
27 may quite possibly be related to disease severity [8]. The mechanisms of T cell
28 activation are mostly focused on the classical pathway that is activation via binding of
29 specific T cell receptors (TCRs) and MHC molecules [9]. However, T cells may also be
30 activated after stimulation by 'bystander' or TCR independent signaling, for example by
31 cytokines or novel activating receptors [10]. Bystander T cell activation has been

1 demonstrated in models of viral infection such as herpes simplex virus, LCMV and HIV
2 leading to proliferation of memory T cells and subsequent production of cytokines, which
3 can induce protection or pathology [11,12]. In this work, we explored the state of CD8+
4 T cell activation in different memory compartments in the acute phase of dengue fever.
5
6

METHODS

Ethics Statement

All procedures adopted in this study were performed according to the terms agreed by the Institutional Review Board from the *Hospital das Clínicas*, University of São Paulo (CAPPesq - Research Projects Ethics Committee). This study was approved by CAPPesq under protocol 0652/09. Written informed consents were obtained from all study volunteers.

Clinical samples

Whole-blood samples were collected, using sterile EDTA Vacutainer tubes blood (BD Brazil, Curitiba, PR, Brazil), from patients with clinical suspected dengue fever at the Ana Costa Hospital, Santos, State of São Paulo, during the outbreak in the first semester of 2010, caused by DENV2 [13].

Serology

A commercial DENGUE DUO TEST BIOEASY (Standard Diagnostic Inc. 575-34, Korea), a rapid test kit, was used for dengue diagnosis, by detection of both dengue virus NS1 antigen and IgM- and IgG-specific antibodies in human serum. Samples were considered positive for acute dengue fever when NS1 or IgM bands were reagent in the testing kit. We also considered an acute case whenever DENV2 RNA was detected (see below).

Viral Loads

Duplicates (10 µL each) of RNA eluate were directly applied to a commercial dengue virus real-time kit (RealArt; artus/QIAGEN, Germany) in a final volume of 25 µL and were run on ABI 7300 real-time equipment (Applied Biosystems, Brazil). This method

consists of a one-step PCR capable of detecting and quantifying all four serotypes in a single TaqMan-like assay using 6-carboxyfluorescein as the reporter fluorophore. An internal control is added to the samples before extraction. This molecule serves as a molecular target for amplification in a parallel assay with a distinct fluorophore (VIC). This allows for the identification of extraction failures and/or PCR inhibition. The dengue virus load is obtained by plotting the sample cycle threshold (CT) on a curve generated by external quantified dengue virus RNA standards, also provided with the kit. This curve was generated for each PCR run. The mean value for samples analyzed in duplicate was adopted.

CD4+ and CD8+ T cell counting

Peripheral blood absolute CD4+ and CD8+ T cell counts were assessed using the BD Multitest CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC monoclonal antibody (mAb) cocktail (BD Biosciences, San Diego, CA), according to the manufacturer's instruction, using a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences). Cell surface staining was routinely performed on 100 µL fresh whole blood.

Cell separation and expanded peripheral blood lymphocyte immunophenotyping

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from fresh EDTA-treated blood by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation and frozen in liquid nitrogen as previously described [14]. Phenotyping experiments were run in thawed samples. Briefly, 10⁶ PBMC were centrifuged at 250xg for 10 minutes into a pellet, washed and resuspended in a cocktail of monoclonal antibodies. CD8+ T cell proliferative capacity was assessed by a Ki67 staining protocol. Initially, cells were surface stained with CD3-PerCP and CD8-APCCy7 for 30 minutes at 4°C in the dark. For Ki67 expression evaluation, cells were fixed, permeabilized and stained with a Ki67-FITC monoclonal antibody. Cells were washed twice and resuspended in 100 µl of fixation buffer (1% paraformaldehyde in PBS). The gating and analysis strategy is depicted in the Supplemental Figure 1 (minha figura complementar 1 so tem gate de CD8XSSC). To

1 characterize the activation profile of CD8+ T lymphocytes, we used the markers HLA-
2 DR+ and CD38+. For activation status in the memory CD8+T lymphocytes, cells were
3 surface stained with CD45RA-FITC, CCR7-PeCy7; CD27-APCCy7, CD38-PE; HLA-
4 DR-Alexa 700, CD8-???? and CD3 PerCP-Pe Texas Red (nao sei qual foi PercP e qual
5 foi PE-Texas RED). For each flow cytometry experiment performed in this paper,
6 unstained and all single-color controls were processed to allow proper compensation.
7 Also, fluorescence-minus-one (FMO) analysis strategy was performed for each
8 fluorochrome to ensure proper gating. Samples were acquired on a BD LSRFortessa (BD
9 Biosciences) flow cytometry equipped with detectors capable of acquiring and analyzing
10 events with up to 13 colors. At least 100,000 events were collected and then analyzed
11 with FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, version 8.7.1). The analysis strategy is
12 shown in Supplemental Figure 2 (a minha figura so tem dot plot HLA DR X CD38).

13 14 *Statistical analysis*

15
16 Because most continuous variables presented an overdispersed distribution, results were
17 summarized as medians and interquartile ranges (IQR) and compared across dengue
18 patient groups and non exposed controls, using nonparametric Kruskal-Wallis or Mann-
19 Whitney tests (continuous variables). When the Kruskal-Wallis test indicated a
20 significant difference ($P<0.05$) among more than two groups, a Dunn's multiple
21 comparison post tests were carried out to determine where the differences were.
22 Correlations were analyzed using Spearman rank correlation tests. The software Prism,
23 version 5.0, was used for analyses and generation of figures (GraphPad Software, San
24 Diego, CA).

RESULTS

Subjects and cell blood counts

Peripheral venous blood was obtained from 74 patients with acute dengue fever and 17 matched donors who were asymptomatic and negative for DENV IgM, NS1, and RNA. The overall dengue fever patients and healthy controls characteristics are depicted in Table 1. No differences were seen in gender and age distribution comparing both groups. As expected, dengue fever patients had lower number of thrombocytes (median 152,000 cells/ μ l, interquartile range 25%-75% [IQR], 110,000-207,000) when compared to controls (median 226,000 cells/ μ l, IQR, 166,000-310,000), $p < 0.0001$. Thrombocytes decreased along disease course, with median 174,000 cells/ μ l (IQR, 147,000-232,000) at days 1 and 2, 153,000 cells/ μ l (IQR, 115,000-206,000) at days 3 and 4, and 94,000 cells/ μ l (IQR, 28,000-154,000) at days 5 and 6 after the onset of symptoms.

Overall leukocyte counts were also lower (median 4,400 cells/ μ l, IQR, 3,275-6,400) compared to controls (median 8,100 cells/ μ l, IQR, 6,140-9,335), $p < 0.0001$. Numbers were lower at days 1 and 2 (median 5,100 cells/ μ l, IQR, 3,750-6,450) and 3 and 4 (median 3,600 cells/ μ l, IQR, 3,100-5,100), $p < 0.001$, but recovered in days 5 and 6 to levels compared to the control group.

A subset of 30 dengue fever patients (Table 2) were selected for expanded immunophenotyping experiments.

CD8+ T lymphocytes numbers increased late in the course of acute dengue fever

We first evaluated the percentages and the absolute numbers of CD8+ T lymphocytes in acute dengue fever patients. As shown in Figure 1A, the percentage of CD8+ T cells among overall circulating lymphocytes remained constant up to the fourth day after onset of symptoms. However, the distribution of values increased in days 5 and 6, with increased median of 38%, IQR, 29-53 ($p < 0.05$).

Absolute numbers of CD8+ T cells were lower from the first to the fourth days after onset of symptoms (median 253 cells/ μ l, IQR, 151-358 for days 1 and 2; median

201 cells/ μ l, IQR, 158-345 for days 3 and 4) when comparing dengue patients to healthy controls (median 465 cells/ μ l, IQR, 329-605). At the fifth and sixth days, we observed a higher number of cells (median 534 cells/ μ l, IQR, 285-1644), with wider distribution of values (Figure 1B). CD4:CD8 ratio were lower only in days 5 and 6 when compared to days 3 and 4, $p=0.03$, without detectable differences to controls (data not shown).

DENV viral load inversely correlated with the numbers of CD8+ T cells

DENV viral load was evaluated in the course of dengue fever. As expected, higher viral load was observed in the first and second days after onset of symptoms, as shown in Figure 2A, decreasing thereafter. Remarkably, DENV viral load negatively correlated with the number of circulating CD8+ T lymphocytes. As demonstrated in Figure 2, we could identify that higher viral load was observed only when CD8+ T lymphocytes remained below 450 cells/ μ l (arbitrary dotted line parallel to the y axis), whereas higher CD8+ T lymphocytes were associated with DENV load below 1,050 copies/ml (arbitrary dotted line parallel to the x axis). These results suggest a role of these cells in the control of DENV replication in the acute phase of disease. Of note, statistically significant correlations ($p<0.05$) were noted in days 1 and 2 ($r= -0.6$) and in days 5 and 6 ($r= -0.5$).

CD8+ T lymphocytes express Ki67 later in dengue fever

Samples from 30 patients with dengue fever were selected for the remaining experiments. The aim was to be representative of the disease natural history after onset of symptoms, up to the sixth day. Results are represented for days 1 and 2 (10 patients), 3 and 4 (ten patients), and 5 and 6 (10 patients), as detailed in Table 2, comparing to the 17 healthy controls.

We observed that more CD8+ T lymphocytes expressed Ki67 in dengue fever cases when compared to controls, either expressed in absolute numbers or percentage of stained cells (median 14 cells/ μ l, IQR, 7-40 vs. 4 cells/ μ l, IQR, 3-12, $p=0.002$; median 4%, IQR, 2-14 vs. median 1%, IQR, 1-2, $p<0.0001$). However, this increase in expression was remarkably driven by the values observed in days 5 and 6 (median 113 cells/ μ l, IQR,

21-418 and median 20%, IQR, 10-31), suggesting that these cells intensively proliferate later in the course of the disease (Figure 3).

Effector memory CD8+ T lymphocytes activate later in the course of dengue fever

We addressed the levels of CD8+ T lymphocytes activation using surface staining for the ectoenzyme CD38 and HLADR. Coinciding with CD8+ T lymphocyte expansion and proliferation, higher cell activation could be detected later in the course of disease, at days 5 and 6, comparing to controls either in percentages (median 34%, IQR, 20-59 vs. median 3, IQR, 3-5, $p<0.0001$) or in absolute numbers (median 114 cells/ μ l, IQR, 45-1110 vs. median 14 cells/ μ l, IQR, 12-21, $p<0.0001$), as depicted in Figure 4.

The cellular activation profile was vastly different when we analyzed the different subpopulations of CD8+ T lymphocytes. Using comprehensive staining panels, we did not observe statistically significant differences in activation of naïve cells (Figure 5A and 5B). On the other hand, higher activation was observed in days 5 and 6 in central memory (CM), effector memory (EM), and terminally effector memory (TEMRA) percentage of cells (Figure 5C, 5E, and 4G, respectively). Nevertheless, this effect was only sustained in the EM subpopulation when absolute numbers were evaluated (Figure 5F), suggesting that EM cells are the main drivers of such phenomenon.

DISCUSSION

The changes of lymphocyte subsets in dengue fever have long been recognized, including the CD8⁺ T lymphocytes [15,16]. Using samples collected in a DENV2 outbreak in the coast of the State of São Paulo, Brazil [13], we were able to demonstrate that CD8⁺ T cell numbers increase later in the course after onset of symptoms, associated with higher Ki67 expression, suggesting a proliferative rebound that follows the peak viremia. This phenomenon is related to the cellular immune response to DENV and is associated with increased cell activation, as suggested by others [17]. In this paper we explored in more detail the activation status of different CD8⁺ T cell subpopulations in adult patients with dengue fever. During high viral burden in dengue fever, several circulating cells are activated including monocytes [18], NK cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells [8,19,20]. This activation seems to be a natural immune response to the pathogen and reflects its efforts to control viral replication. In our results, the expanding number of CD8⁺ T cell responses in the course of disease was strongly associated with lower viremia, especially later in the disease course. However, exceedingly high levels of cellular activation may be harmful to the host and can be related to disease severity. A number of studies have found increased markers of immune cell activation in patients with dengue hemorrhagic fever (DHF) compared with patients with the less severe form of disease, dengue fever (DF) [21]. Indeed, children who developed DHF presented higher percentage of CD8 T cells and NK cells expressing CD69, an early activation marker than those with DF during the febrile period of illness [8]. Also, children admitted with acute dengue fever presented increased levels of NK cells and T lymphocyte activation and the severity of disease was associated with higher activation status, [20]. The increase in regulatory CD4⁺ T cell numbers have been described in patients with mild dengue fever, but this effect has not been observed in moderate or acute disease [22]. These results suggest that a counter-regulatory mechanism must be in place to contain uncontrolled cellular activation, aiming at protecting the host. In the last years much progress has been made in identifying different T cell memory subsets to dissect the heterogeneity of human immune responses [23]. In this paper, the activation status was evaluated in different CD8⁺ T subpopulations in adults with dengue fever using a comprehensive and complete

1 panel of antibodies. To our knowledge, the present study demonstrates for the first time
2 the activation status in different CD8⁺ T cells subpopulations in dengue fever patients.
3 The percentages and numbers of effector memory (TEM) cells, characterized by the
4 CCR7-CD27+CD45RA[±] phenotype [24], were the most activated in the course of
5 disease, as demonstrated by the expression of HLA-DR and CD38 molecules. Other
6 subpopulations also increased activation, such as central memory (TCM) and terminally
7 differentiated memory cells (TEMRA), but the significance was restricted to the
8 percentage and not the absolute numbers suggesting that TEM cells are the main drivers
9 of cellular activation in acute dengue fever. TEM cells have immediate effector function,
10 by secreting IL-2, IFN γ , and other cytokines in response to infectious pathogens [25,26].
11 DENV-reactive CD8⁺ T cells are important to contain viral replication [27] and may
12 display diverse responses to different epitopes [28]. DENV serotype-cross-reactivity of
13 CD8⁺T cells has also been demonstrated after primary infection [29]. Based on our
14 findings that different CD8⁺ T cell subpopulation present diverse levels of activation, we
15 believe it is important to investigate the status of CD8⁺ T cell differentiation when
16 analyzing antigen-specific responses. Considering the key role of CD8⁺ T cell activation
17 and antigen-specific responses in the pathogenesis of dengue fever, further investigation
18 must be conducted to explore the mechanisms of activation-regulatory pathways in
19 disease pathogenesis. A balance of such forces is key to control the virus and prevent the
20 development of severe disease.

1 **Table 1.**

2

3 Table 1. **Demographic characteristics of dengue patients and healthy donors.**

Characteristics	DENV infection (n=74)	Healthy Donnors (n=17)
Age, in years (Median and interquartile 25% - 75%)		
Female	44 (31-54)	40 (34-55)
Male	38 (30-47)	25 (23-31)
Gender (%)		
Female	58	65
Male	42	35

4

5

Table 2. Demographic and hematologic characteristics of study participants.

ID Number	Gender	Days of Symptoms	Age (years)	Dengue Duo NS1/IgM/IgG	DENV Load (copies/ml)	Platelets (cells/ μ l)	Lymphocyte count (cells/ μ l)	T cell count (cells/ μ l)	CD8+ T cell count (cells/ μ l)
5	F	6	77	- / + / +	284	10.000	3136	2684	1839
6	M	5	27	- / + / +	87	42.000	1500	665	120
7	F	5	67	- / + / +	84	56.000	6201	4545	1882
14	F	1	35	- / + / +	107	253.000	1779	1315	310
15	F	6	53	- / + / +	141	42.000	4264	3164	1826
26	M	4	46	+ / + / +	11994	237.000	1168	710	375
27	F	4	29	- / - / -	666	216.000	974	731	139
29	F	1	55	- / - / -	2840000	113.000	644	411	186
31	F	1	31	+ / - / -	45839	147.000	840	659	182
32	M	1	26	- / - / -	59	234.000	2126	1490	666
34	M	3	50	+ / - / -	14200000	158.000	2236	1623	268
35	F	4	37	- / - / -	164	149.000	2349	1724	386
37	F	2	46	- / - / -	896004	132.000	792	602	147
40	F	6	37	- / + / +	0	152.000	1963	1627	542
41	F	3	30	- / - / -	114	361.000	2141	1674	465
45	M	5	53	- / + / +	0	20.000	2368	1428	416
58	F	2	24	- / - / +	352	297.000	4132	2835	998
65	M	5	49	+ / + / -	205151	119.000	1190	499	191
66	M	2	30	- / + / +	1983	237.000	1285	1086	443
67	M	3	33	- / - / -	11828	137.000	986	621	207
69	M	2	56	- / - / -	20700000	122.000	955	716	298
70	F	3	50	- / - / -	383	255.000	1680	1211	345
71	M	6	27	+ / + / +	265	237.000	1418	1106	310
98	F	5	22	- / - / +	858	71.000	2436	1898	970
99	F	3	83	+ / - / -	1680000	127.000	1605	1445	352
100	F	1	31	- / - / -	188	222.000	2139	1546	540
102	F	2	26	- / - / -	7370000	154.000	992	675	152
106	F	4	82	- / + / +	400455	10.000	2442	1702	175
111	F	4	54	+ / + / +	674	95.000	1343	1121	294
138	F	6	70	- / + / +	237	24.000	2419	1340	331

FIGURE LEGENDS

Figure 1. CD8+ T lymphocytes in the course of dengue fever. (A) Percentage within T cells and (B) absolute numbers of CD8+ T lymphocytes in the peripheral blood from healthy controls and dengue fever patients at different days of symptoms. It was observed a significant change in the percentage of CD8+ T lymphocytes, between days 5 and 6 after the onset of symptoms in relation to healthy controls and days 3 and 4 of symptoms, as shown in A. However, decreased absolute CD8+ T lymphocyte numbers were documented in the first four days of symptoms when compared to healthy controls, returning to higher levels later in the disease's course, as shown in B.

Figure 2. Correlation of CD8+ T lymphocyte numbers and DENV viral load. In A, viral load was determined on different days of symptoms and a significant decrease was observed in days 5 and 6 when compared to days 1 and 2 after the onset of symptoms (p value= 0.0136). In B, a negative correlation was observed between 1 and 2 days of symptoms ($r = -0.5900$, $p = 0.0019$) and 5 and 6 days of symptoms ($r = -0.4705$, $p = 0.0488$). Dashed lines are arbitrarily set at 450 CD8+ T lymphocytes/ μ L and 1050 copies of RNA/ml.

Figure 3. Proliferation of CD8+ T lymphocytes in dengue fever. (A) Percentage and (B) absolute numbers of Ki67+ within CD8+ T lymphocytes in the peripheral blood from healthy controls and dengue fever patients at different days of symptoms.

Figure 4. Activation of CD8+ T lymphocytes in dengue fever. (A) Percentage and (B) absolute numbers of three subpopulations within CD8+ T lymphocytes in the peripheral blood from healthy controls and dengue fever patients at different days of symptoms: HLADR+, CD38+HLADR+, and CD38+. Only the dual positive subpopulation significantly increased during the course of dengue fever, either in their percentage or absolute numbers.

Figure 5. Activation of CD8⁺ T lymphocytes subpopulations in dengue fever.

Percentage and absolute numbers of naïve (A and B), central memory (C and D), effector memory (E and F), and terminal effector memory (G and H) T CD8⁺ cells are shown. Increased percentages of activated cells were observed mostly in dual positive CD38+HLA-DR+ central memory (TCM) ($p<0.001$) effector memory (TEM) ($p<0.0001$) and terminal effector memory (TEMRA) ($p<0.01$) T cells, although the percentage of CD38+HLA-DR- effector memory ($p<0.01$) and terminal effector ($p<0.01$) T cells were also augmented in dengue fever.

Supplementary Figure 1. Strategy analysis to assess the expression of Ki67 in CD8⁺ T

cells. Gate on single cells was determined by the size in relation to forward scatter height (FSC-H) and relative area (FSC-A). The total lymphocyte population was delimited by a gate followed by CD3⁺ population. Within the T lymphocyte population was identified population of CD8⁺ T cells. Within the population of CD8⁺ T cells was evaluated the expression of the molecule Ki67.

Supplementary Figure 2. Strategy analysis to assess the activation of naïve and

memory CD8⁺ T cells. Gate on single cells was determined by the size in relation to height (FSC-H) and relative area (FSC-A). Then a gate was made in the total lymphocyte population followed by a gate on the CD3⁺ population. Thereafter, two other gates were made in populations of T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺). Within the population of CD8⁺ T lymphocyte subpopulations were evaluated naïve and memory from the Boolean analysis, which was made all possible combinations with the markers CCR7, CD45RA, CD27. Within each population (naïve, TCM, TEM and TEMRA) a quadrant gate was done to evaluate the expression of activation markers HLA-DR and CD38.

Figure 1

Figure 2

A

B

Figure 3

A

B

Figure 4

1 **Figure 5**

2
3
4

Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2

REFERENCES

1. Halstead S (1980) Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 58: 1-21.
2. PAHO (2008) Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Pan American Health Society.
3. Messer W, Vitarana U, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala L, et al. (2002) Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 66: 765-773.
4. Malavige G, Fernando S, Fernando D, Seneviratne S (2004) Dengue viral infections. *Postgrad Med J* 80: 588-601.
5. Halstead S (1988) Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476-481.
6. Halstead S (2007) Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652.
7. Endy T, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn D, Green S, et al. (2004) Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 189: 990-1000.
8. Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, et al. (1999) Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 180: 1429-1435.
9. Mathew A, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. (1999) Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. *J Immunol* 162: 5609-5615.
10. Suwannasaen D, Romphruk A, Leelayuwat C, Lertmemongkolchai G (2010) Bystander T cells in human immune responses to dengue antigens. *BMC Immunol* 11: 47.
11. Bangs SC, McMichael AJ, Xu XN (2006) Bystander T cell activation--implications for HIV infection and other diseases. *Trends Immunol* 27: 518-524.
12. Kim SK, Brehm MA, Welsh RM, Selin LK (2002) Dynamics of memory T cell proliferation under conditions of heterologous immunity and bystander stimulation. *J Immunol* 169: 90-98.
13. Romano CM, de Matos AM, Araujo ES, Villas-Boas LS, da Silva WC, et al. (2010) Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One* 5: e11811.
14. Goncalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, et al. (2010) CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun* 78: 4763-4772.
15. Sarasombath S, Suvatte V, Homchampa P (1988) Kinetics of lymphocyte subpopulations in dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 19: 649-656.
16. Liu CC, Huang KJ, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, et al. (2002) Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J Med Virol* 68: 241-252.

- 1 17. Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, et al. (2006)
- 2 Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion
- 3 molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease.
- 4 Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 437-449.
- 5 18. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, et al. (2008)
- 6 Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness
- 7 demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases
- 8 compared to classic dengue fever. Virology 376: 429-435.
- 9 19. Corley RB, LoCascio NJ, Ovnicek M, Haughton G (1985) Two separate functions of
- 10 class II (Ia) molecules: T-cell stimulation and B-cell excitation. Proc Natl Acad
- 11 Sci U S A 82: 516-520.
- 12 20. Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, et al. (2008) Dengue in
- 13 Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with
- 14 age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate
- 15 with disease severity. J Infect Dis 198: 516-524.
- 16 21. Mathew A, Rothman AL (2008) Understanding the contribution of cellular
- 17 immunity to dengue disease pathogenesis. Immunol Rev 225: 300-313.
- 18 22. Luhn K, Simmons CP, Moran E, Dung NT, Chau TN, et al. (2007) Increased
- 19 frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. J
- 20 Exp Med 204: 979-985.
- 21 23. Zielinski CE, Corti D, Mele F, Pinto D, Lanzavecchia A, et al. (2011) Dissecting the
- 22 human immunologic memory for pathogens. Immunol Rev 240: 40-51.
- 23 24. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of
- 24 memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.
- 25 Nature 401: 708-712.
- 26 25. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F (2003) Proliferation and differentiation
- 27 potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or
- 28 homeostatic cytokines. Blood 101: 4260-4266.
- 29 26. Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M (2002) Differentiation of human CD8(+) T
- 30 cells from a memory to memory/effector phenotype. J Immunol 168: 5538-
- 31 5550.
- 32 27. Guidotti LG, Chisari FV (2001) Noncytolytic control of viral infections by the innate
- 33 and adaptive immune response. Annu Rev Immunol 19: 65-91.
- 34 28. Bashyam HS, Green S, Rothman AL (2006) Dengue virus-reactive CD8+ T cells
- 35 display quantitative and qualitative differences in their response to variant
- 36 epitopes of heterologous viral serotypes. J Immunol 176: 2817-2824.
- 37 29. Friberg H, Burns L, Woda M, Kalayanarooj S, Endy TP, et al. (2011) Memory CD8+
- 38 T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly
- 39 cross-reactive. Immunol Cell Biol 89: 122-129.
- 40
- 41

8. REFERÊNCIAS

- Ajello CA Evaluation of *Aedes albopictus* tissue culture for use in association with arbovirus isolation. *J Med Virol* (1979) 3: 301-306.
- Albuquerque PL, Silva Junior GB, Diogenes SS, Silva HF Dengue and aplastic anemia--a rare association. *Travel Med Infect Dis* (2009) 7: 118-120.
- Alencar/Sesau R. Roraima continua em alerta para a dengue. Agência Roraimense de Notícias, Roraima, (2011) Vol. 2011.
- An J, Zhou DS, Zhang JL, Morida H, Wang JL, Yasui K Dengue-specific CD8⁺ T cells have both protective and pathogenic roles in dengue virus infection. *Immunol Lett* (2004) 95: 167-174.
- Anantapreecha S, Chanama S, A An, Naemkhunthot S, Sa-NGasang A, Sawanpanyalert P, Kurane I Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol Infect* (2005) 133: 503-507.
- Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol* (1997) 71: 4226-4232.
- Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* (2002) 8: 379-385.
- Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* (2008) 73: 975-983.
- Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, de Oliveira-Pinto LM Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2006) 101: 437-449.
- Balmaseda A, Hammond SN, Perez L, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, Cuadra R, Rocha J, Perez MA, Silva S, Rocha C, Harris E Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* (2006) 74: 449-456.

- Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, Harris E Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* (2005) 73: 1059-1062.
- Beverley PC, Daser A, Michie CA, Wallace DL Functional subsets of T cells defined by isoforms of CD45. *Biochem Soc Trans* (1992) 20: 184-187.
- Blackburn NK, Besselaar TG, Schoub BD, O'Connell KF Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J Med Virol* (1991) 33: 6-9.
- Blumberg RS, Paradis T, Byington R, Henle W, Hirsch MS, Schooley RT Effects of human immunodeficiency virus on the cellular immune response to Epstein-Barr virus in homosexual men: characterization of the cytotoxic response and lymphokine production. *J Infect Dis* (1987) 155: 877-890.
- Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P, Porter K, Rudiman IF, Yuwono D, Puthavathana P, Marovich MA Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol* (2008) 82: 3939-3951.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* (1994) 68: 6103-6110.
- Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1987) 81: 816-820.
- Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, Heinz FX, Rey FA Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* (2004) 23: 728-738.
- Bukowski JF, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Ennis FA Dengue virus-specific cross-reactive CD8+ human cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* (1989) 63: 5086-5091.
- Butcher EC, Picker LJ Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* (1996) 272: 60-66.

- Byrne JA, Oldstone MB Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J Virol* (1984) 51: 682-686.
- Causey ORT, M. Virus antibody survey on sera of residents of the Amazon valley in Brazil. *Revista Serviços Especiais de Saúde Pública* (1962) 12: 91-101.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* (1990) 44: 649-688.
- Chang PE, Cheng CL, Asok K, Fong KY, Chee SP, Tan CK Visual disturbances in dengue fever: an answer at last? *Singapore Med J* (2007) 48: e71-73.
- Chao YC, Huang CS, Lee CN, Chang SY, King CC, Kao CL Higher infection of dengue virus serotype 2 in human monocytes of patients with G6PD deficiency. *PLoS One* (2008) 3: e1557.
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2006) 47: 155-166.
- Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, Lee CK, Chiou TW, Wong CH, Hsieh SL CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* (2008) 453: 672-676.
- Coissi J. São Paulo Registra Dez Casos de Dengue Tipo 4 São Paulo, (2011) Vol. 2011.
- CVE. Dados Provisórios do CVE - Dengue. São Paulo, (2010) Vol.
- da Silva-Nunes M, de Souza VA, Pannuti CS, Speranca MA, Terzian AC, Nogueira ML, Yamamura AM, Freire MS, da Silva NS, Malafronte RS, Muniz PT, Vasconcelos HB, da Silva EV, Vasconcelos PF, Ferreira MU Risk factors for dengue virus infection in rural Amazonia: population-based cross-sectional surveys. *Am J Trop Med Hyg* (2008) 79: 485-494.
- de Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis* (2009) 3: e390.

- De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, Souza RV, Teixeira Filho G, Miagostovich MP Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2004) 98: 553-562.
- de Souza RV, da Cunha RV, Miagostovich MP, Timbo MJ, Montenegro F, Pessoa ET, Nogueira RM, Schatzmayr HG An outbreak of dengue in the State of Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1995) 90: 345-346.
- de Souza VA, Fernandes S, Araujo ES, Tateno AF, Oliveira OM, Oliveira RR, Pannuti CS Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. *J Clin Microbiol* (2004) 42: 1782-1784.
- de Souza VA, Pannuti CS, Sumita LM, de Andrade Junior HF Enzyme-linked immunosorbent assay-IgG antibody avidity test for single sample serologic evaluation of measles vaccines. *J Med Virol* (1997) 52: 275-279.
- de Souza VA, Tateno AF, Oliveira RR, Domingues RB, Araujo ES, Kuster GW, Pannuti CS Sensitivity and specificity of three ELISA-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. *J Clin Virol* (2007) 39: 230-233.
- Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, Malasit P, Xu XN, Screaton G, Mongkolsapaya J A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol* (2008) 181: 5865-5874.
- Diallo M, Sall AA, Moncayo AC, Ba Y, Fernandez Z, Ortiz D, Coffey LL, Mathiot C, Tesh RB, Weaver SC Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence. *Am J Trop Med Hyg* (2005) 73: 445-449.
- Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci* (2008) 267: 36-40.
- Donalisio MRC O enfrentamento de epidemias: as estratégias e perspectivas do controle do dengue. Tese de Doutorado Thesis, Universidade de Campinas, Campinas (1995).

- Dunne PJ, Faint JM, Gudgeon NH, Fletcher JM, Plunkett FJ, Soares MV, Hislop AD, Annels NE, Rickinson AB, Salmon M, Akbar AN Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood* (2002) 100: 933-940.
- Edelman R Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis* (2007) 45 Suppl 1: S56-60.
- Edwards A The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy* (2008) 38: 1063-1064; author reply 1064-1065.
- Enders G, Knotek F Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Infection* (1989) 17: 218-226.
- Faint JM, Annels NE, Curnow SJ, Shields P, Pilling D, Hislop AD, Wu L, Akbar AN, Buckley CD, Moss PA, Adams DH, Rickinson AB, Salmon M Memory T cells constitute a subset of the human CD8+CD45RA+ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *J Immunol* (2001) 167: 212-220.
- Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe* (2009) 5: 318-328.
- Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* (2004) 64: 469-472.
- Figueiredo MA, Rodrigues LC, Barreto ML, Lima JW, Costa MC, Morato V, Blanton R, Vasconcelos PF, Nunes MR, Teixeira MG Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: results of a case control study. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) 4: e699.
- Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourao MP, Costa CA, Farias IP Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis* (2008) 14: 667-669.
- Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* (1999) 99: 23-33.

Franco O A História da Febre Amarela no Brasil *Superintendência de Campanhas de Saúde Pública Brasília: Ministério da Saúde* (1976)

Friberg H, Burns L, Woda M, Kalayanarooj S, Endy TP, Stephens HA, Green S, Rothman AL, Mathew A Memory CD8⁺ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunol Cell Biol* (2011) 89: 122-129.

Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* (2003) 101: 4260-4266.

Gonzalez AL, Martinez RA, Villar LA [Clinical evolution of dengue in hospitalized patients]. *Biomedica* (2008) 28: 531-543.

Gray JJ Avidity of EBV VCA-specific IgG antibodies: distinction between recent primary infection, past infection and reactivation. *J Virol Methods* (1995) 52: 95-104.

Gubler DJ Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* (1998) 11: 480-496.

Gubler DJ Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* (2002) 10: 100-103.

Gubler DJ The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (2004) 27: 319-330.

Gubler DJ Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp* (2006) 277: 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253.

Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB, Jr., Feres VC, Rocha B, Levi JE, Souza VA, Boas LS, Pannuti CS, Martelli CM Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis* (2008) 197: 817-824.

Guzman MG, Kouri G Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* (2004) 8: 69-80.

- Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F, Peters CJ Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. *Am J Trop Med Hyg* (1991) 45: 408-417.
- Halstead SB Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* (1988) 239: 476-481.
- Halstead SB Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* (2008) 53: 273-291.
- Hamann D, Kostense S, Wolthers KC, Otto SA, Baars PA, Miedema F, van Lier RA Evidence that human CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol* (1999) 11: 1027-1033.
- Hammon WM, Rudnick A, Sather GE Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science* (1960) 131: 1102-1103.
- Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaseda A Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* (1998) 36: 2634-2639.
- Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, Cuadra R, Rocha J, Idiaquez W, Alonso RE, Delgado MA, Campo LA, Acevedo F, Gonzalez A, Amador JJ, Balmaseda A Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* (2000) 63: 5-11.
- Hasenkrug KJ, Brooks DM, Dittmer U Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *J Virol* (1998) 72: 6559-6564.
- Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* (1983) 32: 164-169.
- Holmes EC, Twiddy SS The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* (2003) 3: 19-28.

- Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, Pelegrino JL, Vazquez S, Artsob H, Drebot M, Gubler DJ, Halstead SB, Guzman MG, Margolis HS, Nathanson CM, Rizzo Lic NR, Besoff KE, Kliks S, Peeling RW Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis* (2009) 15: 436-440.
- Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbataar M, Kitsutani P, Effler P, Zhao Z Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. *J Virol* (2007) 81: 10081-10091.
- Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* (1989) 40: 418-427.
- Kao CL, Wu MC, Chiu YH, Lin JL, Wu YC, Yueh YY, Chen LK, Shaio MF, King CC Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. *J Clin Microbiol* (2001) 39: 3672-3677.
- King NJ, Shrestha B, Kesson AM Immune modulation by flaviviruses. *Adv Virus Res* (2003) 60: 121-155.
- Kurane I, Meager A, Ennis FA Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. *J Exp Med* (1989) 170: 763-775.
- Kwan WH, Navarro-Sanchez E, Dumortier H, Decossas M, Vachon H, dos Santos FB, Fridman HW, Rey FA, Harris E, Despres P, Mueller CG Dermal-type macrophages expressing CD209/DC-SIGN show inherent resistance to dengue virus growth. *PLoS Negl Trop Dis* (2008) 2: e311.
- Kyle JL, Harris E Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* (2008) 62: 71-92.
- La Russa VF, Innis BL Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillieres Clin Haematol* (1995) 8: 249-270.
- Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* (1994) 75 (Pt 1): 65-75.

- Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* (2000) 191: 1499-1512.
- Lei HY Transient hemophagocytic activity in dengue immunopathogenesis. *J Formos Med Assoc* (2009) 108: 595-598.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, Ramos C, Rico-Hesse R Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* (1999) 73: 4738-4747.
- Levi JE, Tateno AF, Machado AF, Ramalho DC, de Souza VA, Guilarde AO, de Rezende Feres VC, Martelli CM, Turchi MD, Siqueira JB, Jr., Pannuti CS Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of dengue virus in samples collected during an outbreak in Goiania, Central Brazil, in 2005. *J Clin Microbiol* (2007) 45: 1893-1897.
- Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, Hsiao YL, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Lin YS Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest* (2008) 88: 1079-1089.
- Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol* (2006) 19: 127-132.
- Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, Liu HS, Liu CC, Anderson R, Lei HY Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* (2011) 236: 515-523.
- Liu CC, Huang KJ, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Lei HY Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J Med Virol* (2002) 68: 241-252.
- Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Kaplan AH, Detels R, Giorgi JV CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* (1998) 18: 332-340.
- Livingston PG, Kurane I, Dai LC, Okamoto Y, Lai CJ, Men R, Karaki S, Takiguchi M, Ennis FA Dengue virus-specific, HLA-B35-restricted, human CD8+

cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. Recognition of NS3 amino acids 500 to 508 by CTL clones of two different serotype specificities. *J Immunol* (1995) 154: 1287-1295.

Lopes ACG, H.Z.W; Lima, C.S.P. 2010. *Interpretação Clínica do Hemograma*: (2010).

Malheiros SM, Oliveira AS, Schmidt B, Lima JG, Gabbai AA Dengue. Muscle biopsy findings in 15 patients. *Arq Neuropsiquiatr* (1993) 51: 159-164.

Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu SJ, Putvatana R, Murphy G, Tassaneetrithep B, Burgess T, Birx D, Hayes C, Schlesinger-Frankel S, Mascola J Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Invest Dermatol Symp Proc* (2001) 6: 219-224.

Martinez-Torres ME *Dengue hemorrágico em crianças: editorial*, Havana: (1990).

Martinez Torres E [Preventing deaths from dengue: a space and challenge for primary health care]. *Rev Panam Salud Publica* (2006) 20: 60-74.

Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P Use of four dengue virus antigens for determination of dengue immune status by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol* (2005) 43: 5784-5786.

Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* (1994) 68: 8056-8063.

Mehlhof E, Ansarah-Sobrinho C, Johnson S, Engle M, Fremont DH, Pierson TC, Diamond MS Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. *Cell Host Microbe* (2007) 2: 417-426.

Mellman I, Steinman RM Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* (2001) 106: 255-258.

Meurman O, Waris M, Hedman K Immunoglobulin G antibody avidity in patients with respiratory syncytial virus infection. *J Clin Microbiol* (1992) 30: 1479-1484.

- Miagostovich MP, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Lanciotti RS Molecular epidemiology of DEN-2 virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1998) 93: 625-626.
- Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* (1992) 360: 264-265.
- Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* (2008) 4: e17.
- Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem* (2007) 282: 8873-8882.
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenchitsomanus PT, McMichael A, Malasit P, Screaton G Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* (2003) 9: 921-927.
- Montenegro D, Lacerda HR, Lira TM, Oliveira DS, Lima AA, Guimaraes MJ, Vasconcelos PG [Clinical and epidemiological aspects of the dengue epidemic in Recife, PE, 2002]. *Rev Soc Bras Med Trop* (2006) 39: 9-13.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* (2003) 4: 723-728.
- Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res* (2005) 36: 425-435.
- Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, Vo DT, Ha MT, Vo VT, Cao TP, Tran VD, Oyama T, Morita K, Yasunami M, Hirayama K Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis* (2008) 2: e304.

- Nimmannitya S Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (1987) 18: 392-397.
- Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica* (2007) 22: 358-363.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect* (1993) 111: 163-170.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, de Souza LJ, Guimaraes FR, de Araujo ES, De Simone TS, Baran M, Teixeira G, Jr., Miagostovich MP Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* (2005) 11: 1376-1381.
- Nogueira SA [The challenge of diagnosing dengue in children]. *J Pediatr (Rio J)* (2005) 81: 191-192.
- Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC, Jr., Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, Schatzmayr HG, Tanuri A, Ribeiro Nogueira RM Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis* (2010) 16: 576-578.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. . *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*, Geneva, (2009) Vol.
- Osanai CH A Epidemia de Dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima 1981-1982. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública., (1984).
- Pandey BD, Morita K, Hasebe F, Parquet MC, Igarashi A Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (2000) 31: 266-272.
- Paul ME, Mao C, Charurat M, Serchuck L, Foca M, Hayani K, Handelsman EL, Diaz C, McIntosh K, Shearer WT Predictors of immunologic long-term nonprogression in HIV-infected children: implications for initiating therapy. *J Allergy Clin Immunol* (2005) 115: 848-855.
- Paunio M, Hedman K, Davidkin I, Peltola H IgG avidity to distinguish secondary from primary measles vaccination failures: prospects for a more effective

global measles elimination strategy. *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4: 1215-1225.

Paunio M, Hedman K, Davidkin I, Valle M, Heinonen OP, Leinikki P, Salmi A, Peltola H Secondary measles vaccine failures identified by measurement of IgG avidity: high occurrence among teenagers vaccinated at a young age. *Epidemiol Infect* (2000) 124: 263-271.

Pedro A O Dengue em Nictheroy. *Brazil-Médico* (1923) 1: 174-177.

Pelegriño JL, Arteaga E, Rodríguez AJ, González E, Frontela MD, Guzmán MG [Standardization of immunohistochemical techniques for detecting dengue virus antigens in paraffin-embedded tissues]. *Rev Cubana Med Trop* (1997) 49: 100-107.

Perera R, Kuhn RJ Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* (2008) 11: 369-377.

Race MW, Williams MC, Agostini CF Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1979) 73: 18-22.

Raengsakulrach B, Nisalak A, Maneeakorn N, Yenchitsomanus PT, Limsomwong C, Jairungsri A, Thirawuth V, Green S, Kalayanaroj S, Suntayakorn S, Sittisombut N, Malasit P, Vaughn D Comparison of four reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. *J Virol Methods* (2002) 105: 219-232.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* (1985) 229: 726-733.

Rico-Hesse R Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* (1990) 174: 479-493.

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* (1997) 230: 244-251.

- Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* (2006) 7: 1258-1265.
- Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol* (2008) 21: 123-132.
- Romano CM, de Matos AM, Araujo ES, Villas-Boas LS, da Silva WC, Oliveira OM, Carvalho KI, de Souza AC, Rodrigues CL, Levi JE, Kallas EG, Pannuti CS Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One* (2010) 5: e11811.
- Rosen L Disease exacerbation caused by sequential dengue infections: myth or reality? *Rev Infect Dis* (1989) 11 Suppl 4: S840-842.
- Rosen L, Drouet MT, Deubel V Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg* (1999) 61: 720-724.
- Rothman AL, Ennis FA Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* (1999) 257: 1-6.
- Rush B *Medical Inquiries and Observations*, Vol. I, Philadelphia: (1805).
- Sabin AB Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* (1952) 1: 30-50.
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanaroj SM, Tangnaratchakit K, Tanghawornchaikul N, Vasanawathana S, Chaiyaratana W, Yenchitsomanus PT, Suriyaphol P, Avirutnan P, Chokephaibulkit K, Matsuda F, Yoksan S, Jacob Y, Lathrop GM, Malasit P, Despres P, Julier C A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* (2005) 37: 507-513.
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* (1999) 401: 708-712.

- Sarasombath S, Suvatte V, Homchampa P Kinetics of lymphocyte subpopulations in dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (1988) 19: 649-656.
- Siqueira JB, Jr., Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* (2005) 11: 48-53.
- Sirinavin S, Nuntnarumit P, Supapannachart S, Boonkasidecha S, Techasaensiri C, Yoksarn S Vertical dengue infection: case reports and review. *Pediatr Infect Dis J* (2004) 23: 1042-1047.
- Soderlund M, Brown CS, Cohen BJ, Hedman K Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity. *J Infect Dis* (1995) 171: 710-713.
- Steiner LA, Eisen HN Sequential changes in the relative affinity of antibodies synthesized during the immune response. *J Exp Med* (1967) 126: 1161-1183.
- Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj S, Endy TP, Libraty DH, Nisalak A, Innis BL, Rothman AL, Ennis FA, Chandanayingyong D HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* (2002) 60: 309-318.
- SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde: Informe Epidemiológico da Dengue. (2008) Vol.
- SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde: Informe Epidemiológico da Dengue - Análises de Situações e Tendências de 2010. (2010) Vol.
- Swynghedauw B [Medical consequences of global warming]. *Presse Med* (2009) 38: 551-561.
- Tauil PL Critical aspects of yellow fever control in Brazil. *Rev Saude Publica* (2010) 44: 555-558.
- TDR/WHO *In Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, Geneva, Switzerland: (2009).

Teixeira MB, ML Guerra, Z Epidemiology and Preventive Measures of Dengue. *IESUS* (1999) 8

Teixeira Mda G, Costa Mda C, Barreto ML, Mota E Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica* (2005) 21: 1307-1315.

Teixeira MG, Costa MC, Coelho G, Barreto ML Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis* (2008) 14: 1663.

Thepparit C, Smith DR Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol* (2004) 78: 12647-12656.

Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* (2001) 194: 1395-1406.

Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Putnak R, Gibbons RV, Jarman R, Endy TP Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *Am J Trop Med Hyg* (2009) 81: 825-833.

Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol* (2002) 168: 5538-5550.

Tomkinson BE, Maziarz R, Sullivan JL Characterization of the T cell-mediated cellular cytotoxicity during acute infectious mononucleosis. *J Immunol* (1989) 143: 660-670.

Trivedi SG, Lloyd CM Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci* (2007) 64: 1269-1289.

Trowbridge IS, Thomas ML CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* (1994) 12: 85-116.

Trust W. Dengue Virus Replication Cycle. (2011) Vol.

- Tuokko H Detection of acute measles infections by indirect and mu-capture enzyme immunoassays for immunoglobulin M antibodies and measles immunoglobulin G antibody avidity enzyme immunoassay. *J Med Virol* (1995) 45: 306-311.
- Vals R. Tratamento da Dengue - Instituto Virtual da Dengue do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, (2011) Vol.
- Varella D. Dengue. <http://www.drauziovarella.com.br/Sintomas/6205/dengue>. (2010) Vol. 2011.
- Vasconcelos PF, de Menezes DB, Melo LP, Pessoa ET, Rodrigues SG, da Rosa ES, Timbo MJ, Coelho IC, Montenegro F, da Rosa JF, et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceara State, Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* (1995) 37: 253-255.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* (2000) 181: 2-9.
- Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Nguyen MD, Kneen R, Cuzzubbo A, Devine PL Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg* (1999) 60: 693-698.
- Vazeille-Falcoz M, Rosen L, Mousson L, Rodhain F Replication of dengue type 2 virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* (1999) 60: 319-321.
- Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R Redefining chronic viral infection. *Cell* (2009) 138: 30-50.
- Vita WPN, Cecília Carmen de Araujo; Azevedo, Marina Baptista de; Souza, Marcelle Fernandes de; Baran, Meri Dengue: alertas clínicos e laboratoriais da evolução grave da doença. *Rev Bras Clin Med* (2009) 7: 11-14.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* (2000) 74: 3227-3234.

- Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology* (1995) 213: 254-257.
- Wang Z, Shi Q, Li S, Du J, Liu J, Dai K Hyperthermia induces platelet apoptosis and glycoprotein I α ectodomain shedding. *Platelets* (2010) 21: 229-237.
- Warke RV, Becerra A, Zawadzka A, Schmidt DJ, Martin KJ, Giaya K, Dinsmore JH, Woda M, Hendricks G, Levine T, Rothman AL, Bosch I Efficient dengue virus (DENV) infection of human muscle satellite cells upregulates type I interferon response genes and differentially modulates MHC I expression on bystander and DENV-infected cells. *J Gen Virol* (2008) 89: 1605-1615.
- Warke RV, K. Khaja, K. J. Martin, N. de Bosch, A. L. Rothman, and I. Bosch. Presented at the American Society of Tropical Medicine Meeting. Philadelphia, PA., (2003) Vol.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* (2000) 6: 816-820.
- Yauch LE, Prestwood TR, May MM, Morar MM, Zellweger RM, Peters B, Sette A, Shresta S CD4⁺ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8⁺ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol* (2010) 185: 5405-5416.
- Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S A protective role for dengue virus-specific CD8⁺ T cells. *J Immunol* (2009) 182: 4865-4873.
- Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93: 548-553.
- Zhang C, Mammen MP, Jr., Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Holmes EC Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol* (2005) 79: 15123-15130.

9. PUBLICAÇÃO

Characterization of Dengue Virus Type 2: New Insights on the 2010 Brazilian Epidemic

Camila Malta Romano^{1*}, Andréia Manso de Matos², Evaldo Stanislaú A. Araújo³, Lucy Santos Villas-Boas¹, Wanessa Cardoso da Silva¹, Olímpia M. N. P. F. Oliveira³, Karina I. Carvalho², Ana Carolina Mamana de Souza¹, Celia L. Rodrigues¹, José Eduardo Levi¹, Esper G. Kallas², Claudio Sergio Pannuti¹

1 Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias – (LIMHC), Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia (LIM-60), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Hospital Ana Costa, Santos, Brazil

Abstract

Dengue viruses (DENV) serotypes 1, 2, and 3 have been causing yearly outbreaks in Brazil. In this study, we report the re-introduction of DENV2 in the coast of São Paulo State. Partial envelope viral genes were sequenced from eighteen patients with dengue fever during the 2010 epidemic. Phylogenetic analysis showed this strain belongs to the American/Asian genotype and was closely related to the virus that circulated in Rio de Janeiro in 2007 and 2008. The phylogeny also showed no clustering by clinical presentation, suggesting that the disease severity could not be explained by distinct variants or genotypes. The time of the most recent common ancestor of American/Asian genotype and the São Paulo and Rio de Janeiro (SP/RJ) monophyletic cluster was estimated to be around 40 and 10 years, respectively. Since this virus was first identified in Brazil in 2007, we suggest that it was already circulating in the country before causing the first documented outbreak. This is the first description of the 2010 outbreak in the State of São Paulo, Brazil, and should contribute to efforts to control and monitor the spread of DENVs in endemic areas.

Citation: Romano CM, de Matos AM, Araújo ESA, Villas-Boas LS, da Silva WC, et al. (2010) Characterization of Dengue Virus Type 2: New Insights on the 2010 Brazilian Epidemic. PLoS ONE 5(7): e11811. doi:10.1371/journal.pone.0011811

Editor: Laurent Réna, BMSI-A*STAR, Singapore

Received: May 21, 2010; **Accepted:** July 2, 2010; **Published:** July 28, 2010

Copyright: © 2010 Romano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The present work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazilian Ministry of Science and Technology (CNPq, grant #476088/2009-7 to EGK). AMM and EGK's scholarships were supported by CNPq. KIC's scholarship was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazilian Ministry of Education. URL of CNPq: URL www.cnpq.br; URL of CAPES: www.capes.gov.br. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cmromano@usp.br

Introduction

Dengue is the most prevalent arthropod-borne viral disease in tropical and subtropical regions, infecting 50 to 100 million people annually [1]. Cases in Central and Latin America have increased almost five-fold in the last 30 years. In 2008, up to one million cases were reported in the Americas, with higher number of deaths occurred in the Southern Cone [2]. In the last two decades, Brazil has been responsible for more than 60% of the total reported dengue fever cases in the Americas [2]. The continuing occurrence in resource limited countries and the lack of novel therapeutic approaches or an effective vaccine have made dengue fever to be considered a neglected disease. Dengue surveillance is deprived in most countries and no existing model for predicting an outbreak in endemic regions is available.

The mechanisms by which dengue virus (DENV) causes severe illness remain to be elucidated. Both viral and immune host factors seem to contribute to the level of the pathogenicity [3,4,5,6]. Immunity induced by natural infection is believed to provide serotype-specific lifelong protection. On the other hand, previous infection by a distinct serotype increases the risk for dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (DHF/DSS) [5,7].

In the Americas, DHF was first reported in Cuba in 1981 after the introduction of the DENV2 genotype from Southeast Asian (SEA)

[8,9]. Since then, other countries in the Americas have reported DHF associated with such DENV2 genotype, but not with the American genotype [9]. In Brazil, DENV2 was first identified in the State of Rio de Janeiro in 1990, where the first cases of DHF and DSS were documented [10]. It was followed by a fast spread of DENV2 across the country [11,12], becoming endemic in some areas [13] and causing severe clinical forms [14]. Genomic analysis performed on DENV2 Brazilian isolates identified the co-circulation of two distinct lineages of the American and Asian genotypes [15,16]. In a recent study, Oliveira *et al.* reported that the virus circulating in the State of Rio de Janeiro in 2007 and 2008 was genetically distinct from 1990 and 1998 isolates from respective epidemics, suggesting a local evolution of the DENV2 strain or, alternatively, a co-circulation of distinct lineages in the country [15]. In the beginning of 2010, several dengue outbreaks have been documented in many regions of Brazil, with the co-circulation of three serotypes (DENV1, 2, and 3). By the end of March 2010, the São Paulo State Healthy Department reported more than 34,000 cases of dengue, more than 800 only in the coast cities of Guarujá and Santos, where severe clinical presentations have been observed (64 deaths related to dengue occurred in the same time frame in the São Paulo State) [17].

In this study we characterized at molecular and phylogenetic levels the DENV2 strain causing the current epidemic in the coastal cities of Guarujá and Santos and surrounding areas. Using

coalescence approaches, we also estimated the time (in years) that this specific lineage entered in Brazil.

Methods

Ethics Statement

The current project was conducted after *Hospital das Clínicas* - University of São Paulo's Institutional Review Board (CAPPesq) approval, under protocol #0652/09. Written informed consent was obtained from all participants.

Clinical samples and virus isolation

Serum samples were obtained from patients with clinical suspected dengue fever at the *Ana Costa* Hospital located in the city of Santos, State of São Paulo. DENV2 was successfully isolated from 18 serum samples by inoculation into monolayers of C6/36 *Aedes albopictus* cell line (ATCC number CRL-1660). Supernatants from cell cultures presenting cytopathic effect compatible with DENV infection were assayed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to amplify serotype-specific viral genome.

RNA extraction and RT-PCR

Viral RNA was isolated directly from 140 µl of cell culture supernatants using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA) following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). A total reaction volume of 20 µl was made with 10 µl of RNA and 10 µl of mix, containing 2.0 µl 10× buffer, 0.8 µl dNTP Mix (100 mM), 2.0 µl 10× random hexamer primers, 1.0 µl reverse transcriptase and 4.2 µl nuclease-free water.

PCR amplification and sequencing

A 665 bp of envelope region corresponding to nucleotides 1857 to 2522 of DENV2 complete genome (GenBank reference sequence DQ181801) was amplified by PCR using following primers specific for DENV2: D2_EnvF -5'-AARRTYGTRAAR-GAAATAGCAGAA-3' and D2_EnvOutR- 5'-CTGTCCAYG-TRTGYACGTTTCT-3'. The thermal profile for amplification was 38 cycles of 45 seconds of denaturation at 94°C, 1 minute of annealing at 56°C, and 1 minute of extension at 72°C. The PCR products were purified for elimination of primer dimmer and excess oligonucleotides with the PureLink Quick Gel extraction Kit (Invitrogen), with few adaptations for direct purification of PCR products in solution. Sequencing reactions were performed with BigDye Terminator kit v.3.0 (Applied Biosystems, Bedford, MA) and one of each primer used in sequencing reaction. The electropherograms were analyzed and consensus sequences were achieved with CodonCode Aligner v.3.0 (available at <http://www.codoncode.com/>).

Phylogenetic and coalescent analysis

The 18 sequences generated were aligned together with reference sequences downloaded from GenBank using the ClustalX program [18]. An initial dataset including our sequences and reference sequences from all four serotypes ($n=93$) was used to confirm that our samples were truly DENV2. A second dataset included our samples and reference sequences of all DENV2 genotypes known to cause outbreaks around the world ($n=91$). The phylogenetic trees were reconstructed using a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) framework implemented in BEAST v1.5.3 [19]. The GTR+G substitution model was used as the best model obtained in MODELTEST [20]. Also, the

previously estimated substitution rate for DENV2 of 6.5×10^{-4} s/s/y [21] was used to obtain the time of the most recent common ancestor (TMRCA) for the American/Asian genotype and also for the Brazilian DENV2. The Bayesian Skyline plot (BSL) was performed under strict and relaxed uncorrelated lognormal molecular clock. The molecular clock that best fitted the data was chosen by Bayes factor (BF) comparison. Convergence of parameters during the MCMC was inspected with Tracer v.1.4 [19], with uncertainties addressed as 95% highest probability density (HPD) intervals. In all cases, ten million chains were sufficient to achieve the convergence of all parameters (ESS>200). The trees were sampled at each 1000 steps, resulting in a final file of 10,000 trees. These trees were summarized in a maximum clade credibility (MCC) tree using TreeAnnotator (part of the BEAST package), and visualized in FigTree v.1.2.2 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree>).

Results

An initial phylogenetic tree including all DENV serotypes confirmed, with high posterior probability, that our samples belong to serotype 2 (supplementary Figure S1). The maximum clade credibility (MCC) tree (Figure 1) showed that the DENV2 isolates circulating in 2010 in Guarujá and Santos clustered within the American/Asian genotype and were closely related to viruses that caused the epidemics in Rio de Janeiro during 2007 and 2008 [15]. Although this study included only two patients with severe dengue (patients 28 and 42, Table 1), the phylogenetic tree showed no segregation by clinical manifestations, since mild and severe dengue fever cases samples clustered together. Moreover, we found no differences at amino acid level in the envelope region among patients with distinct clinical presentations. However, it must be taken into account that differences in clinical manifestation may not be evident by our analysis, since they included a limited number of patients and encompassed only partial envelope gene. Age, gender and further clinical data are described in Table 1.

Importantly, the monophyletic cluster of the recent Brazilian DENV2 was closely related to viral strains from Cuba and the Dominican Republic, with small genetic distance and high posterior probability, suggesting that this lineage was imported from the Caribbean.

The coalescent analysis based on the dataset containing the five DENV2 genotypes revealed that the lineage causing the epidemics in the last four years in Brazil was introduced in the country at least at 5.5 years ago (median value of 9.8 years ago, and upper value of 16 years ago). Importantly, Figure 1 also showed that our estimates for the time of the most recent common ancestor (TMRCA) of the key nodes covered essentially the same range as those estimated by previous reports [21,22], further supporting our results. The TMRCA data described here were obtained under relaxed uncorrelated molecular clock. Although the relaxed clock was the best model by Bayes Factor comparison, the coalescent dates obtained under the strict clock were similar (Supplementary Files S1 A and B).

The sequences generated in this work were submitted to GenBank database under accession numbers HM185186 to HM185202.

Discussion

Our phylogenetic analysis based on the partial DENV2 envelope gene sequencing showed that viruses causing the current epidemic in the cities of Guarujá and Santos, as well as surrounding areas, were sister taxa of those sampled two years

Figure 1. Phylogenetic tree of DENV2 Brazilian samples. The maximum clade credibility (MCC) tree was inferred for 18 partial envelope sequences from the city of Santos, State of São Paulo and DENV2 reference sequences. The posterior probabilities of the key nodes are depicted above the respective node. The time of the most recent common ancestor (TMRCA) of the more recent lineage, American/Asian genotype and serotype 2, with upper and lower intervals in parenthesis, are depicted in bold in the respective nodes. Black full circles identify the sequences generated in this study. Brazilian sequences are identified according to the region of origin: "North" (from Northeast region) and "SP" or "RJ" (from Southeast region). When available, the sampling year was described in the end of the sequences.
doi:10.1371/journal.pone.0011811.g001

ago in the cities of Rio de Janeiro and Ribeirão Preto. The presence of *Aedes aegypti* and the frequent traveling amongst such regions are the necessary ingredients for viral spread through viremic patients moving between these cities.

It was interesting to find that the lineage causing outbreaks in Brazil in the end of 90's, the isolates from Northeast Brazil between 2001 and 2006, and the viruses representing more recent epidemics (2007 to 2010) in São Paulo and Rio de Janeiro States segregated into temporal sub-clades (Figure 1). Several longitudinal studies have also observed temporal clustering of dengue, as well as marked patterns of geographical structure [23,24,25]. The circulation of distinct lineages of DENV2 in Brazil had already been observed before [15] and was ascribed either to independent introductions in different time points or as a result of local evolution.

The sequences distribution in the phylogenetic tree indicated that the oldest Brazilian DENV2 are more related to viruses from South American countries (Paraguay and Venezuela), and the more recent isolate appears to be a result of a re-introduction from the Caribbean (Martinique, Cuba, and the Dominican Republic). In fact, migration of DENV2 from the Caribbean islands into America's mainland was reported to be relatively frequent [26]. However, due to the low availability of sequences from other South American countries, we could not precisely determine the location of such introduction.

It is well known that DENV is characterized by frequent clade replacements (*i.e.*, the replacement of the successful lineage present in one sampling period to the next) [25]. Also, this "lineage turnover" phenomenon appears to be a consequence of the stochastic forces and host immunity pressures, which ultimately determines the prevalence of a specific clade or serotype in a particular season [25,27]. This model agrees to both conditions observed during the recent epidemics in Brazil: (i) the shift from DENV3 to DENV2 prevalence in the Southern region and, (ii) the emergence of a genetically distinct lineage of DENV2 in 2007, possibly caused by the re-introduction of viruses imported from the Caribbean. Although phylogenetic data show that some strains can persist and locally evolve, our data on DENV2 in Brazil suggest that the re-introduction may be important for the dynamics of the epidemics.

The evolutionary history of dengue virus is recent and DENV2 is estimated to have emerged between 120 and 215 years ago [21,22,28], which is in line with our prediction of 123 years for this serotype. Additionally, we estimated that the American/Asian genotype emerged about 40 years ago, which is also in accordance to previous data of 39 years for the origin of this genotype [21]. However, it was intriguing that the viruses causing the outbreaks in São Paulo and Rio de Janeiro States during the last three years share a common ancestor few years before the first reported

Table 1. Characteristics of the 18 patients sampled in Santos (2010) with DENV2 disease.

Patient ID	City	Gender	Age (years)	Platelets (×1000/μl)	Clinical presentation*	Death
05	São Vicente	Female	25	174	Dengue fever	No
07	Santos	Female	34	253	Dengue fever	No
10	Guarujá	Female	37	152	Dengue fever	No
11	Santos	Male	53	179	Dengue fever	No
13	São Vicente	Female	74	120	Dengue fever	No
16	Santos	Female	22	200	Dengue fever	No
17	Santos	Male	47	237	Dengue fever	No
18	ND**	Female	16	39	ND**	Yes
25	ND**	Male	50	48	Dengue fever	No
28	Santos	Male	79	17	Severe (DSS)	Yes
42	Santos	Female	86	20	Severe (DHF)	No
44	São Vicente	Female	29	216	Dengue fever	No
45	Santos	Male	31	230	Dengue fever	No
47	Santos	Female	31	147	Dengue fever	No
49	Santos	Male	51	158	Dengue fever	No
51	Santos	Female	53	135	Dengue fever	No
52	Santos	Female	46	132	Dengue fever	No
327	Santos	Female	0***	ND**	Dengue fever	No

*The patients presenting severe dengue must present at least one of the follow clinical findings: plasma leakage (leading to DSS and/or respiratory distress); severe bleeding and severe organ involvement. This has been defined by the World Health Organization Guideline, 2009.

**ND not determined.

***one week.

doi:10.1371/journal.pone.0011811.t001

outbreak (median of 9.8 years ago, and lower value of 5.5 years ago), suggesting that this lineage was already circulating in Brazil before its detection in 2007.

In fact, a “silent” introduction of a new DENV into a naïve population has already been documented for DENV4 in Brazil [29,30]. In 2008, DENV4 was identified in three patients in Manaus, without international travelling history. Based on these data, we can envisage the possibility that the DENV2 found São Paulo and Rio de Janeiro States has maintained a cryptic circulation in such regions or elsewhere (as well as DENV4 in Manaus), until meets favourable conditions to trigger an outbreak. Because the introduction of a new serotype in an endemic area may imply in more severe clinical presentations of dengue disease, our findings shed lights on the importance of a more systematic surveillance of the dengue viruses in endemic regions.

In summary, this work described the molecular and phylogenetic characteristics of DENV2 during the current outbreak in the coastal region of Sao Paulo State, Brazil. The present epidemic in the cities of Guarujá, Santos and surrounding areas, was caused by the same DENV2 lineage that circulated in Rio de Janeiro in 2007 and 2008, but distinct from viruses that circulated during more ancient DENV2 epidemics in Brazil. Also, since the introduction of a new serotype is considered to increase the risk for severe dengue, our data on the silent introduction of DENV2 claims for the risks of cryptic introduction and circulation of new viruses into endemic areas.

This work supports the importance of dengue surveillance improvement and may help developing dengue-control programs. Finally, it is important to remember that the infectious disease dynamic is more than a local problem, involving neighboring regions and the population migration rate. Surveillance programs

during non-epidemic seasons and in non-endemic regions may be crucial for early identification of new dengue virus introduction.

Supporting Information

File S1 A. TMRCA of the DENV2 obtained by Strict and Relaxed Uncorrelated Lognormal Molecular Clock. B. Bayes factor values obtained for molecular clock comparison of DENV2. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011811.s001 (0.03 MB DOC)

Figure S1 Phylogenetic tree of the four DENV serotypes. The maximum clade credibility (MCC) tree was inferred from 93 partial envelope dengue viruses sequences obtained from patients from the cities of Guarujá and Santos (collapsed blue clade) and representative sequences of all DENV serotypes. The posterior probabilities of the key nodes are depicted above the respective node.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011811.s002 (2.95 MB TIF)

Acknowledgments

We are in debt with Maria Candida Souza Dantas and Issler Moraes Silva for the grant's administrative support, and Bianca Natali Santos and Fernanda Romano Bruno for the laboratory support at the LIM-60.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CMR CSP. Performed the experiments: AMdM LSVB KIC ACMdS CLR. Analyzed the data: CMR EGK. Contributed reagents/materials/analysis tools: ESA WCdS OMO JEL. Wrote the paper: CMR ESA EGK CSP.

References

- Halstead S (1980) Dengue haemorrhagic fever—a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 58: 1–21.
- PAHO (2008) Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Pan American Health Society.
- Messer W, Vitarana U, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala L, et al. (2002) Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 66: 765–773.
- Malavive G, Fernando S, Fernando D, Seneviratne S (2004) Dengue viral infections. *Postgrad Med J* 80: 588–601.
- Halstead S (1988) Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476–481.
- Halstead S (2007) Dengue. *Lancet* 370: 1644–1652.
- Endy T, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn D, Green S, et al. (2004) Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 189: 990–1000.
- Rico-Hesse R, Harrison L, Salas R, Tovar D, Nisalak A, et al. (1997) Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244–251.
- Rico-Hesse R (1990) Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174: 479–493.
- Nogueira R, Miagostovich M, Lampe E, Souza R, Zagne S, et al. (1993) Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect* 111: 163–170.
- de Souza R, da Cunha R, Miagostovich M, Timbó M, Montenegro F, et al. (1995) An outbreak of dengue in the State of Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 345–346.
- Vasconcelos P, de Menezes D, Melo L, Pessoa E, Rodrigues S, et al. (1995) A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 253–255.
- Siqueira JJ, Martelli C, Coelho G, Simplicio A, Hatch D (2005) Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. *Emerg Infect Dis* 11: 48–53.
- Nogueira R, de Araújo J, Schatzmayr H (2007) Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. *Rev Panam Salud Publica* 22: 358–363.
- Oliveira M, Galvão Araújo J, Ferreira OJ, Ferreira D, Lima D, et al. (2010) Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis* 16: 576–578.
- Miagostovich M, Nogueira R, Schatzmayr H, Lanciotti R (1998) Molecular epidemiology of DEN-2 virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 625–626.
- CVE DdZ (2010) São Paulo. pp. Dados Provisórios do CVE- dengue.
- Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
- Drummond A, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
- Posada D, Crandall K (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Kumar S, Patil J, Cecilia D, Cherian S, Barde P, et al. (2010) Evolution, dispersal and replacement of American genotype dengue type 2 viruses in India (1956-2005): selection pressure and molecular clock analyses. *J Gen Virol* 91: 707–720.
- Zanotto P, Gould E, Gao G, Harvey P, Holmes E (1996) Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 548–553.
- Mondini A, de Moraes Bronzoni R, Nunes S, Chiaravalloti Neto F, Massad E, et al. (2009) Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban dengue 3 outbreak in São Paulo, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e448.
- Araújo J, Nogueira R, Schatzmayr H, Zanotto P, Bello G (2009) Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol* 9: 716–725.
- Zhang C, Mammen MJ, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, et al. (2005) Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol* 79: 15123–15130.
- Carrington C, Foster J, Pybus O, Bennett S, Holmes E (2005) Invasion and maintenance of dengue virus type 2 and type 4 in the Americas. *J Virol* 79: 14680–14687.
- Adams B, Holmes E, Zhang C, Mammen MJ, Nimmannitya S, et al. (2006) Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14234–14239.
- Holmes E, Twiddy S (2003) The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 3: 19–28.
- de Melo F, Romano C, de Andrade Zanotto P (2009) Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis* 3: e390.
- Figueiredo R, Naveca F, Bastos M, Melo M, Viana S, et al. (2008) Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14: 667–669.