

HIGO FERNANDO SANTOS SOUZA

**Avaliação da resposta policlonal e produção de anticorpos
monoclonais a partir de linfócitos B isolados de pacientes
infectados pelo vírus da Dengue.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2019

HIGO FERNANDO SANTOS SOUZA

Avaliação da resposta policlonal e produção de anticorpos monoclonais a partir de linfócitos B isolados de pacientes infectados pelo vírus da Dengue.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

Versão original

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Higo Fernando Santos Souza.

Título da Tese: Avaliação da resposta policlonal e produção de anticorpos monoclonais a partir de linfócitos B isolados de pacientes infectados pelo vírus da Dengue.

Orientador (a) Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizado a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

O presente trabalho foi realizado com apoio
da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)
- Código de Financiamento 001

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Clonagem e expressão de anticorpos monoclonais a partir de linfócitos B de memória isolados de pacientes infectados pelo vírus da dengue.

Pesquisador: Sílvia Beatriz Boscardin

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 26301814.4.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 995.455

Data da Relatoria: 18/03/2015

Apresentação do Projeto:

Consultar parecer consubstanciado emitido por ocasião da aprovação do projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentar emenda

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alteração em razão dessa emenda

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda tem por finalidade solicitar a inclusão do aluno Higo Fernando Santos Souza (CPF: 341.159.498-56, RG: 40.578.332-2) como membro da equipe e principal responsável pelo desenvolvimento do projeto. O sr. Higo acabou de ser aprovado para cursar o doutorado em no programa de pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro e será o responsável pela execução dos experimentos descritos neste projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem alteração em razão dessa emenda

Recomendações:

Sem recomendações

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 995.455

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

Em não havendo um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante site do ICB.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

SAO PAULO, 23 de Março de 2015

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

Aos meus pais, **Fátima** e **Fernando**, pelo
apoio, amor e compreensão incondicionais
nesta etapa da minha vida

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro desse trabalho.

À minha família: aos meus queridos e amados pais, Maria de Fátima e Fernando Antônio; minhas irmãs: Charlina, Haoana, Andressa e ao meu irmão, Gabriel; meu sobrinho (a) Kemillyn, Luis Fernando e Maya, pelo total apoio nos meus anos dedicados a pós-graduação. Sem vocês nada seria possível. Essa conquista é nossa!

Ao meu grande amigo Ronaldo D'Elia pelo apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos. Agradeço todo seu auxílio para o desenvolvimento desse trabalho e fico enormemente feliz que nesse processo de pós-graduação eu tenha conquistado algo tão importante para mim, como sua amizade.

À Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin pela grande oportunidade que me concedeu, pela orientação, paciência, apoio e amizade. Muito obrigado por tudo!

Aos pacientes que aceitaram solicitamente o convite para doação das amostras utilizadas neste trabalho.

Aos amigos do laboratório: Marcio Massao Yamamoto pelo apoio, amizade, ajuda e todo o suporte técnico; Arthur Baruel Zaneti, Bianca da Silva Almeida, Fernando Bandeira Sulczewski, Jéssica Amaral Martinho, Larissa Alves Martino e Natália Soares Ferreira, muito obrigado pelos ótimos momentos vividos tanto no laboratório quanto fora dele. Agradeço à todos pela amizade, apoio, ajuda nos experimentos e nas discussões dos resultados e também por me fazer acreditar que era possível a realização desse sonho e pelo apoio e estímulo nessa caminhada.

Aos meus grande amigos: Shirley, Eraldo e Regiane por todo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira e aos integrantes do seu laboratório pela disponibilidade e ajuda em alguns experimentos, em especial à Denicar e ao Lennon

À Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa e aos integrantes do seu laboratório pela disponibilidade e ajuda em alguns experimentos nas reuniões em grupo. Obrigado pelas discussões, pelas ideias, pelos artigos trocados, assim como pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Marinho e aos integrantes do seu laboratório pela disponibilidade e ajuda e suporte em alguns experimentos.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia (ICB-USP) pelo apoio e convivência.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Souza HFS. Avaliação da resposta policlonal e produção de anticorpos monoclonais a partir de linfócitos B isolados de pacientes infectados pelo vírus da Dengue. [Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Acredita-se que a presença de anticorpos com reação cruzada em uma segunda infecção pelo vírus da dengue seja responsável pelo agravamento da doença. No entanto, ainda há várias controvérsias na literatura no que se refere ao papel dos anticorpos na neutralização da infecção viral e/ou no agravamento da doença. Para melhor estudar as propriedades neutralizantes e/ou patológicas dos anticorpos gerados naturalmente durante a infecção pelo vírus da dengue, o presente projeto tem por objetivo avaliar a resposta policlonal e produzir anticorpos monoclonais a partir de células B isolados de pacientes infectados pelo vírus da dengue. Para isso, os genes que codificam para as porções variáveis das cadeias leve e pesada de suas imunoglobulinas foram clonados em vetores de expressão em células eucarióticas. Desta forma, diversos anticorpos monoclonais específicos para a proteína de interesse foram gerados. Neste trabalho, fomos capazes de obter 154 amostras de soros de pacientes diagnosticados com dengue, dos quais 23 pacientes apresentaram altos títulos de anticorpos contra proteína do envelope, NS1 ou EDIII. Desses, oito pacientes apresentaram anticorpos de reatividade cruzada para os quatro sorotipos de dengue capazes de neutralizar mais que 90% da infecção, nove pacientes apresentaram capacidade acima de 80% de neutralizar um ou mais sorotipos e quatro pacientes apresentaram capacidade de neutralização abaixo de 30% para os quatro sorotipos de dengue. Além disso, constatamos que dentre os vírus testados, as amostras de soro dos pacientes apresentaram maior exacerbação da infecção para DENV1 (68%), DENV2 (75%) e DENV4 (75%). Em relação a resposta monoclonal, obtivemos os PBMCs de quatro pacientes e realizamos o “single cell sorting” a fim de isolar as células B de memória reativas contra proteína E recombinante. Dos 13 clones expressos, apenas quatro AcMos (anticorpo monoclonal) foram capazes de reconhecer a proteína E recombinante. Dentre os quatro AcMos, o clone MT479-F11 apresentou maior capacidade de neutralização para os quatro sorotipos de DENV (DENV1 ao DENV4), bem como para ZIKV, em comparação aos demais AcMos.

Palavras-chave: Dengue. células B. Resposta policlonal.

ABSTRACT

Souza HFS. Evaluation of polyclonal response and production of monoclonal antibodies from B lymphocytes isolated from patients infected with Dengue virus. [Thesis (Doctorate in Host-Pathogen Relationship Biology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2019.

It is believed that the presence of cross-reacting antibodies in a second dengue virus infection is responsible for the worsening of the disease. However, there are still several controversies in the literature regarding the role of antibodies in neutralizing viral infection and / or worsening of the disease. To better study the neutralizing and / or pathological properties of naturally generated antibodies during dengue virus infection, the present project aims to evaluate the polyclonal response and to produce monoclonal antibodies from B cells isolated from patients infected with the dengue virus. For this, the genes that code for variable portions of the light and heavy chains of their immunoglobulins were cloned into expression vectors in eukaryotic cells. In this way, several monoclones applicable to a protein of interest were generated. In this work, we were able to obtain 154 serum samples from patients diagnosed with dengue, of which 23 patients had high levels of antibodies against the envelope protein, NS1 or EDIII. Of these, eight patients presented cross-reactivity antibodies to the four dengue serotypes capable of neutralizing more than 90% of the infection, nine patients had a capacity above 80% to neutralize one or more serotypes and four patients had a neutralization capacity below 30% for the four dengue serotypes. In addition, we found that among the viruses tested, serum samples from the patients showed a greater exacerbation of the infection for DENV1 (68%), DENV2 (75%) and DENV4 (75%). Regarding the monoclonal response, we obtained the PBMCs from four patients and performed the single cell sorting in order to isolate the reactive memory B cells against recombinant E protein. Of the 13 clones expressed, only four mAbs (monoclonal antibody) were able to recognize recombinant E protein. Among the four MAb, the clone MT479-F11 showed a greater neutralization capacity for the four serotypes of DENV (DENV1 to DENV4), as well as for ZIKV, in comparison to the other MAb.

Keywords: Dengue. B cells. Polyclonal Response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Segmentação da poliproteína e estrutura genômica do DENV.....	20
Figura 2: Representação esquemática da proteína E.....	22
Figura 3: Representação esquemática de um anticorpo da classe IgG.....	27
Figura 4: Representação esquemática da evolução dos anticorpos monoclonais.....	35
Figura 5: Dupla Digestão enzimática em vetor de clonagem pJET.....	52
Figura 6: Dupla Digestão enzimática em vetor de expressão pET28b(+)......	53
Figura 7: Expressão da proteína E recombinante.....	53
Figura 8: Expressão da proteína E recombinante e solubilização dos corpúsculos de inclusão (CI) por alta pressão em diferentes condições.....	54
Figura 9: <i>Western Blot</i> da proteína E utilizando um anticorpo monoclonal anti-HisTag e soro de paciente.....	55
Figura 10: ELISA para detecção da concentração ideal da proteína E recombinante.....	56
Figura 11: ELISA utilizando anticorpos monoclonais.....	57
Figura 12: Seleção dos pacientes por ELISA.....	58
Figura 13: Titulação dos pacientes por ELISA.....	59
Figura 14: Estratégia de “gating” para identificação de células infectadas.....	60
Figura 15: Ensaio de neutralização por citometria de fluxo.....	61
Figura 16: Correlação linear de Pearson.....	62
Figura 17: Ensaio de ADE em células K562 com diferentes sorotipos de DENV e ZIKV por citometria de fluxo.....	64
Figura 18: Re-titulação dos soros dos pacientes selecionados por ELISA.....	66

Figura 19: Estratégia 1 - “gating” para identificação de linfócitos B de memória (CD19 ⁺ IgG ⁺).....	68
Figura 20: Amplificação das porções variáveis das cadeias pesada e leves (<i>Kappa</i> e <i>Lambda</i>) do paciente 422.....	69
Figura 21: Estratégia 2 - “gating” para identificação de linfócitos B de memória (Live/DEAD ⁻ CD19 ⁺ IgG ⁺ Eanti-his ⁺).....	70
Figura 22: Amplificação das porções variáveis das cadeias pesada e leves (<i>Kappa</i> e <i>Lambda</i>) do paciente 600.....	71
Figura 23: Estratégia 3 - “gating” para identificação de linfócitos B de memória (Live/DEAD ⁻ CD19 ⁺ IgG ⁺ DENV4 ⁺).....	72
Figura 24: Amplificação das porções variáveis das cadeias pesada e leves (<i>Kappa</i> e <i>Lambda</i>) do paciente 479.....	73
Figura 25: Estratégia 4 - “gating” para identificação de linfócitos B de memória (DAPI ⁻ CD3 ⁻ CD14 ⁻ CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgG ⁺ Eanti-his ⁺ DENV4 ⁺).....	74
Figura 26: Amplificação das porções variáveis das cadeias pesada e leves (<i>Kappa</i> e <i>Lambda</i>) do paciente 600.....	75
Figura 27: Estratégia 5 - “gating” para identificação de linfócitos B de memória (DAPI ⁻ CD3 ⁻ CD14 ⁻ CD19 ⁺ IgG ⁺ Eanti-his ⁺).....	76
Figura 28: Amplificação das porções variáveis das cadeias pesada e leves (<i>Kappa</i> e <i>Lambda</i>) do paciente 479.....	77
Figura 29: Eletroforese em gel de SDS-PAGE de anticorpos monoclonais purificados.....	79
Figura 30: ELISA de ligação dos anticorpos à proteína E recombinante.....	80
Figura 31: ELISA de ligação dos anticorpos aos domínios da proteína E recombinante.....	81
Figura 32: Capacidade de neutralizar a infecção pelo DENV e ZIKV em células VERO.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estratégia de marcação para obtenção dos linfócitos B de memória.....	44
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das regiões variáveis das cadeias de imunoglobulinas.....	46
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na PCR específica.....	48
Tabela 4: Classificação das cadeias variáveis dos anticorpos obtidos.....	78
Tabela 5: Concentração efetiva capaz de inibir 50% da infecção (IC₅₀).....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
ADE	Antibody-dependent enhancement
BCR	B-cell receptor (Receptor de célula B)
BSA	Albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
C	Capsídeo
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	DNA complementar
CDR	Complementarity-Determining Regions (Região determinante de complementariedade)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DENV	Vírus da Dengue
DH	Dengue hemorrágica
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade ótica
E	Envelope
EBV	<i>Epstein-Barr vírus</i>
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima)
HAMA	<i>Human Anti-mouse Antibody</i>
HAT	Hipoxantina, aminopteria e timidina
HPRT	Hipoxantina-fosforibosil transferase
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgH	Cadeia pesada de imunoglobulina
IgL	Cadeia leve de imunoglobulina
Igγ	Cadeia pesada gama de imunoglobulina
Igκ	Cadeia leve kappa de imunoglobulina
Igλ	Cadeia leve lambda de imunoglobulina
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IPTG	Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
M	Membrana
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein-5
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicity of infection

ng	Nanograma
NS	Não-estrutural
OPD	Orto-fenilenediamina dihidrochloride
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pb	Pares de bases
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (Célula mononuclear de sangue periférico)
PBS	Solução salina tamponada
pH	Potencial de hidrôgenio
prM	Pré-membrana
PRR	Pattern recognition receptors
RAG	Recombination activating genes
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene I
RPM	Rotação por minuto
SCD	Síndrome do choque da dengue
TdT	Desoxinucleotidiltransferase terminal
TLR	Toll-like receptors
U	Unidade
WHO	World Healthy Organization
°	Grau
° C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Dengue	19
<i>1.1.1 Manifestações clínicas e patogênese da doença</i>	<i>20</i>
<i>1.1.2 Proteína do envelope (E)</i>	<i>21</i>
<i>1.1.3 Resposta imune inata contra dengue</i>	<i>22</i>
<i>1.1.4 Resposta imune adaptativa contra dengue</i>	<i>24</i>
1.2 Linfócitos B	25
<i>1.2.1 Resposta imune mediada por anticorpos policlonais contra dengue</i>	<i>29</i>
<i>1.2.2 Resposta imune mediada por anticorpos monoclonais contra dengue</i>	<i>31</i>
1.2 Produção de anticorpos monoclonais	33
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Clonagem da proteína E do DENV2	39
3.2 Expressão da proteína E do DENV2	39
3.3 Western Blot	40
3.4 Amostras clínicas	40
3.5 ELISA	41
3.6 Ensaio de neutralização e ADE	42
3.7 Seleção de linfócitos B de memória	43
<i>3.7.1 Enriquecimento dos linfócitos B</i>	<i>43</i>
<i>3.7.2 Marcação dos linfócitos B</i>	<i>43</i>
<i>3.7.3 Síntese de cDNA por RT-PCR</i>	<i>45</i>
<i>3.7.4 Amplificação dos genes de imunoglobulinas de linfócitos B de memória</i>	<i>45</i>
<i>3.7.5 Sequenciamento e análise das sequências</i>	<i>47</i>
<i>3.7.6 Clonagem das regiões variáveis</i>	<i>48</i>
<i>3.7.6.1 Digestão, ligação e transformação em células competente</i>	<i>49</i>
<i>3.7.7 Expressão e purificação dos anticorpos monoclonais em pequena escala</i>	<i>50</i>
4 RESULTADOS	52
4.1 Clonagem e expressão da proteína E em sistema procarioto	52

<i>4.1.1 Caracterização da proteína E recombinante</i>	55
4.2 Seleção dos pacientes – ELISA de reatividade e titulação	57
<i>4.2.1 Ensaio de neutralização viral por citometria de fluxo</i>	59
<i>4.2.2 Ensaio de ADE por citometria de fluxo</i>	63
4.3 Produção de anticorpos monoclonais	66
<i>4.3.1 Obtenção dos PBMCs dos pacientes selecionados</i>	66
<i>4.3.2 Separação das células</i>	67
<i>4.3.3 Expressão dos AcMos humanos</i>	79
<i>4.3.4 Ensaio de ligação ao antígeno</i>	79
<i>4.3.5 Ensaio de neutralização viral</i>	82
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE-A	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

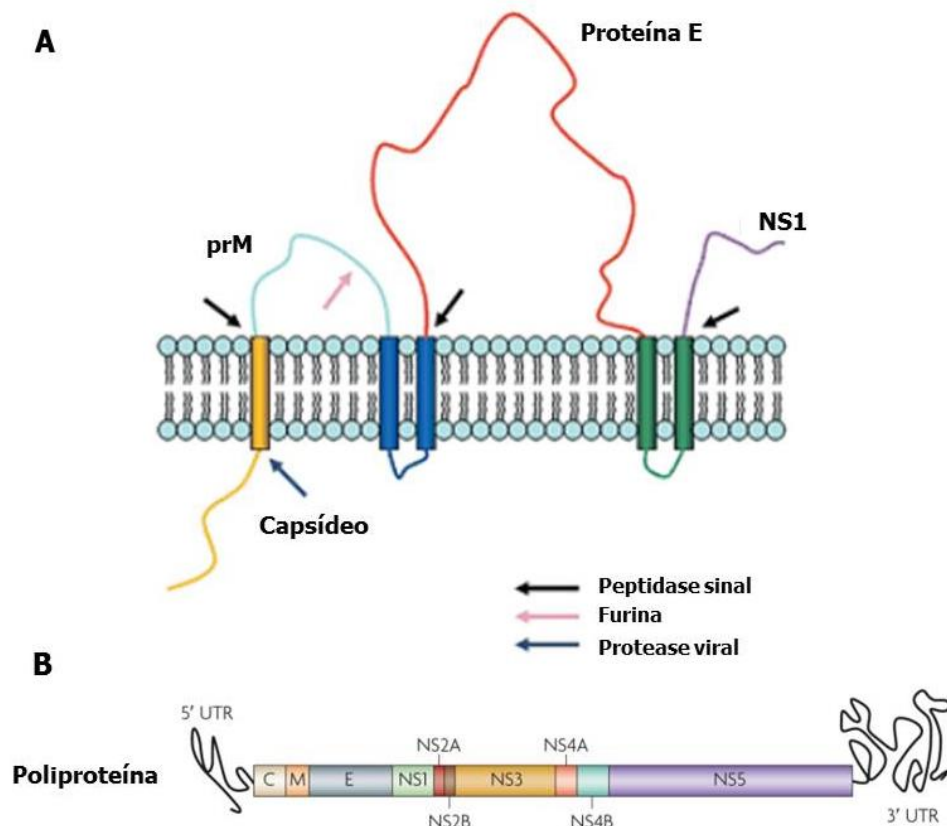
A dengue é uma enfermidade infecciosa aguda causada por um arbovírus da família Flaviviridae (gênero *Flavivirus*) e transmitida ao homem por meio da picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* infectado, que se espalhou pelo mundo atingindo mais de 100 países, sendo endêmica e de grande importância em regiões tropicais e subtropicais (Whitehead *et al.*, 2007). A infecção pelo vírus da dengue (DENV) ressurgiu como um problema de saúde pública em expansão, com estimativa de aproximadamente 400 milhões de pessoas infectadas por ano, levando a cerca de 100 milhões de casos no mundo e 21 mil mortes (Thomas e Endy, 2011; Bhatt *et al.*, 2013).

O vírus da dengue possui quatro sorotipos que são identificados pelas siglas DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Estes sorotipos exibem um alto nível de homologia na sequência dos genomas, além de alta similaridade nas propriedades antigênicas das proteínas do envelope (Chambers *et al.*, 1997). Eles compartilham em torno de 60-75% de identidade de aminoácidos (Lambrechts e Failloux, 2012).

O DENV apresenta genoma composto de RNA fita simples com orientação positiva de aproximadamente 11 kb. É transcrito em uma única fase de leitura e traduzido como uma única poliproteína, posteriormente processada em três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana/membrana (prM/M) e envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Guzman *et al.*, 2010). As proteínas M e E estão embutidas na membrana lipídica formando o envelope viral, enquanto a proteína C, protegida por este envelope, engloba o RNA viral (Whitehead *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Van Der Schaar *et al.*, 2009) (Figura1).

O componente mais abundante da superfície viral é a proteína E, responsável pela interação do vírus com a célula hospedeira, que contém três domínios estruturalmente e funcionalmente distintos. Além disso, esta proteína é suscetível a ação de anticorpos neutralizantes e, por este motivo, é o principal alvo de estratégias vacinais.

Figura 1: Segmentação da poliproteína e estrutura genômica do DENV.



(A) Poliproteína do DENV na região N-terminal através da membrana do retículo endoplasmático. As setas indicam sítios de clivagem das proteases. (B) O genoma é constituído de RNA de polaridade positiva e possui uma única fase de leitura aberta, flanqueada por regiões 5' e 3' não traduzidas, que codifica uma poliproteína que gera 3 proteínas estruturais (C, prM/M e E) e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) após o seu processamento por proteases celulares e virais. Adaptado: (Li *et al.*, 2008; Guzman *et al.*, 2010).

1.1.1 Manifestações clínicas e patogênese da doença

A infecção pelo vírus da dengue apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, variando de quadros assintomáticos a quadros mais severos, com duas síndromes bem definidas: dengue hemorrágica (DH) e/ou síndrome do choque da dengue (SCD). A dengue clássica (DC) é uma infecção auto-limitada com período de incubação de 3 a 14 dias (média de 3-8 dias) coincidindo com a viremia, caracterizada por febre, dor de cabeça, dor atrás dos olhos, mialgia, artralgia, dor abdominal e náuseas, dentre outras manifestações. Por outro lado, a DH é caracterizada por febre, acompanhada de sinais hemorrágicos leves a graves como petéquias, lesões púrpuras e equimoses, trombocitopenia e de sinais de extravasamento plasmático (como aumento do hematócrito e efusão pleural), além dos sinais e sintomas clínicos apresentados nos casos de dengue clássica. Conforme a DH vai se desenvolvendo,

ocorre o aumento da probabilidade de que o paciente desenvolva a SCD. A SCD compreende a DH com sinais de comprometimento circulatório e hipotensão (Rigau-Perez *et al.*, 1998; Gubler, 2006). A doença progride para hipovolemia devido à perda de plasma, que pode resultar ainda em choque hipovolêmico e falência de múltiplos órgãos, que levará o paciente a óbito caso o quadro não regrida em 24 horas (Whitehead *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2009). Trabalhos recentes, nos quais se aplicam técnicas de biologia molecular, evidenciaram viremias mais prolongadas, mesmo nos períodos de defervescência, geralmente 10-100 vezes maiores na DH/SCD do que na DC (Wang *et al.*, 2003; Guilarde *et al.*, 2008).

A infecção por um determinado sorotipo do vírus leva a produção de anticorpos contra os demais sorotipos, porém a imunidade protetora de longa duração parece ser restrita apenas ao sorotipo responsável pela infecção primária (sorotipo homólogo) (Halstead, 2002). Acredita-se que a presença de anticorpos vírus-específicos com reatividade cruzada pode contribuir para o agravamento da doença durante a infecção secundária por um sorotipo heterólogo. Além disso, a alta frequência de dengue severa em indivíduos residentes em áreas endêmicas fortalece a hipótese denominada ADE (do inglês “*antibody-dependent enhancement*”), que atualmente é a teoria mais aceita e sugere que a ligação do complexo vírus-anticorpo ao receptor Fc na superfície de células fagocíticas facilita a entrada e replicação viral (Mathew e Rothman, 2008; Halstead *et al.*, 2010).

1.1.2 Proteína de envelope (E)

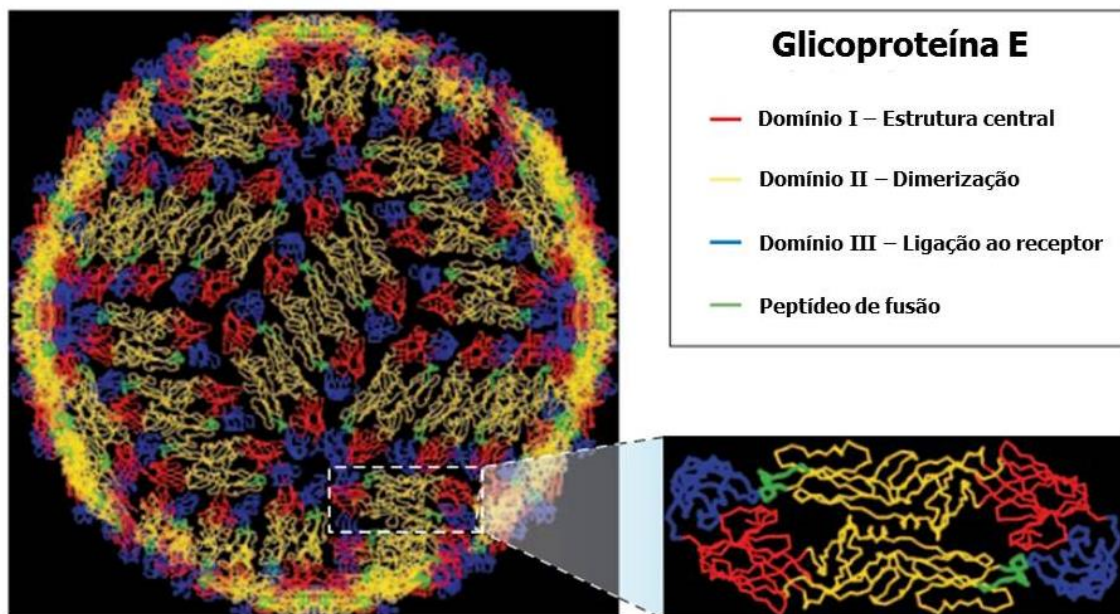
A proteína E é a principal proteína do envelope viral com aproximadamente 53 kDa. É responsável por importantes processos como ligação ao receptor celular e fusão da membrana viral com a endossomal, além de ser o principal alvo da resposta imune protetora no hospedeiro vertebrado (Nowak e Wengler, 1987).

Sua estrutura consiste de um ectodomínio N-terminal (porção solúvel) com aproximadamente 395 aminoácidos; uma região em forma de haste, formada por duas α -hélices conservadas; e um domínio transmembrana hidrofóbico C-terminal. A proteína E liga-se a receptores celulares e medeia a fusão de membranas virais e celulares durante a entrada viral nas células (Zhang *et al.*, 2003; Wahala e Silva, 2011). É uma proteína de classe II, classificação baseada a partir da predominância do tipo de estrutura secundária majoritária. Sendo assim, sabe-se que as proteínas virais de fusão podem ser classificadas em três classes: as proteínas de classe I que possuem predominantemente estruturas hélice- α ; as proteínas de classe II que possuem predominantemente estruturas secundárias formadas por folhas- β e, por

fim, as proteínas de classe III, que são uma junção das classes I e II (Kielian, 2006; Kielian e Rey, 2006).

A estrutura cristalizada do ectodomínio da proteína E de DENV-2 determinada em alta resolução demonstrou que, em partículas do vírus maduro, a proteína forma um homodímero cabeça-cauda formando uma rede densa, se estendendo por toda a superfície viral. Além disso, foi demonstrado que a proteína apresenta três domínios estruturais e funcionais, sendo eles: o domínio I (EDI), domínio II (EDII) e o domínio III (EDIII) (Crill e Chang, 2004). O domínio I se localiza na região central da proteína, além de conter a região amino-terminal, o domínio II possui um formato alongado (*finger-like*) e participa da dimerização da proteína e, por fim, o domínio III que é um domínio tipo imunoglobulina, responsável pela ligação às células do hospedeiro, além de conter o grupo carboxi-terminal. Por outro lado, na extremidade do domínio II está localizado o *loop* de fusão ou peptídeo de fusão, que no vírus maduro está protegido por um pacote formado pelos domínios I e III na subunidade complementar (Modis *et al.*, 2004; Kielian, 2006; Kielian e Rey, 2006; Nayak *et al.*, 2009) (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática da proteína E.



DENV é um vírus envelopado esférico com um diâmetro de aproximadamente 50 nm. O diagrama de cores representa os domínios da proteína E: vermelho - EDI (β -barril presente na região central da proteína); amarelo – EDII (dimerização e que contém o peptídeo de fusão mostrado em verde); azul – EDIII (ligação ao receptor – porção C-terminal) Adaptado: (Whitehead *et al.*, 2007).

1.1.3 Resposta imune inata contra DENV

A resposta imune inata é uma das primeiras linhas de defesa a ser ativada contra a infecção pelo DENV. Isso se dá principalmente através da detecção do aumento de partículas virais através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*). No caso do DENV, duas famílias de receptores parecem estar envolvidas: os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) e alguns sensores intracelulares da família de helicases como MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein-5*) e RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*). A ativação desses receptores pelo reconhecimento do DENV induz respostas de interferon tipo 1 (IFN) (Garcia *et al.*, 2017; Uno e Ross, 2018).

A ativação dos PRRs têm início logo após a inoculação do vírus pelo vetor na pele do hospedeiro. DENV entra no corpo e se replica no interior de diferentes tipos celulares, infectando inicialmente células fagocíticas mononucleares, como macrófagos, monócitos e células dendríticas, mas também pode infectar células endoteliais e leucócitos no sangue periférico, baço, nódulos linfáticos, medula óssea, timo, coração, rins, estômago, pulmões e possivelmente no cérebro, sugerindo que pode atravessar a barreira hematoencefálica (Santos Souza *et al.*, 2016).

Os TLRs são uma importante família de PRRs que são expressos na superfície celular ou nos endossomos. Os TLRs de superfície que estão envolvidos na detecção viral reconhecem as proteínas do envelope viral, enquanto os TLRs intracelulares reconhecem os ácidos nucleares que estão presentes nas partículas virais ou são produzidos durante a replicação viral. Diante disso, estudos recentes mostraram evidências de que tanto o TLR3 quanto o TLR7 estão envolvidos no reconhecimento imunológico inato do DENV. O TLR3, que é o principal TLR para DENV, é expresso em compartimentos endossomais de leucócitos, de diferentes populações de células dendríticas, e de uma variedade de células epiteliais, atuando sinergicamente com o RIG-I e o MDA5 na produção de um estado antiviral contra a infecção pelo DENV. Por outro lado, o TLR7 reconhece RNA simples fita (ssRNA) em compartimentos endossomais, incluindo fragmentos genômicos de DENV. Neste caso, o processo de sinalização é mediado pela molécula adaptadora de diferenciação mieloide (MyD88 – *myeloid differentiation primary response 88*) induzindo assim citocinas pró-inflamatórias (Akira e Takeda, 2004; Wang *et al.*, 2006; Baum e Garcia-Sastre, 2010; Nasirudeen *et al.*, 2011; Sprokholt, J. *et al.*, 2017).

RIG-I e MDA5 estão localizados no citoplasma de uma variedade de células, incluindo células mieloides, epiteliais e do sistema nervoso central. Ambos sensores

citoplasmáticos têm papel importante na resposta anti-DENV, principalmente em células dendríticas e macrófagos infectados. Assim, eles são uma parte essencial da resposta imune inata contra o vírus, detectando a replicação viral no citoplasma.

Após o reconhecimento do vírus, os sensores citoplasmáticos translocam-se para a membrana mitocondrial e ativam a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS – *Mitochondrial antiviral-signaling protein*), induzindo assim a produção de IL-1 β , IL-6, TNF α e IFNs do tipo 1 (IFNs α e β) e do tipo 2 (IFN- γ) (Seth *et al.*, 2005; Nasirudeen *et al.*, 2011). Por outro lado, em células dendríticas maduras, os sensores citoplasmáticos promovem a expressão de moléculas coestimulatórias, como CD80, CD83, CD86 e CD40, assim como de moléculas dos complexos principais de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) I e II. Deste modo, o RIG-I e o MDA5 não estão, portanto, envolvidos apenas na ativação imune inata, mas também podem influenciar as respostas imunes adaptativas (Sprokholt, J. *et al.*, 2017; Sprokholt, J. K. *et al.*, 2017b; a).

1.1.4 Resposta imune adaptativa contra DENV

Tanto a imunidade adaptativa humoral como celular são ativadas durante as infecções por DENV e desempenham papéis críticos no controle da infecção viral, bem como na patogênese da doença. Devido à existência de múltiplos sorotipos de DENV e à falta de imunidade protetora cruzada de longo prazo, indivíduos em áreas endêmicas são frequentemente infectados. Diante disso, células T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ podem contribuir para a proteção contra re-infecção homóloga ou infecção por dengue heteróloga. Deste modo, as células T CD8 $^{+}$ podem controlar a infecção viral através de vários mecanismos, incluindo citotoxicidade direta e produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF α . Por outro lado, as células T CD4 $^{+}$ parecem controlar a infecção viral através de múltiplos mecanismos, incluindo o aumento das respostas das linfócitos B e T CD8 $^{+}$, produção de citocinas inflamatórias e anti-virais, citotoxicidade de células infectadas por vírus e promoção de respostas de memória (Sant e Mcmichael, 2012; Remakus e Sigal, 2013; Rivino, 2016; Rivino e Lim, 2017; Sprokholt, J. *et al.*, 2017). Dessas citocinas, o TNF α e o IFN- γ são detectados no soro dos pacientes e estão associados à gravidade da doença pelo DENV. Além disso, tem-se descrito epítomos imunodominantes presentes nas proteínas de DENV com papel importante para a ativação de linfócitos T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$. Alguns estudos tem demonstrando que as proteínas NS3, NS4b e NS5 são mais frequentemente reconhecidas

pelas células T CD8+, enquanto as proteínas do capsídeo, envelope e NS1 são melhor reconhecidas pelas células T CD4+ (Rivino e Lim, 2017).

Os linfócitos B desempenham um papel único na resposta imune anti-DENV, secretando anticorpos após a ativação através do receptor da célula B, que pode ocorrer de forma T independente ou dependente. Além disso, sabe-se que as proteínas E, prM e NS1 são alvos principais de anticorpos gerados durante infecções primárias e secundárias por DENV (Srikiatkachorn *et al.*, 2017). A ativação dos linfócitos B durante a infecção por DENV pode contribuir para a patogênese da doença através de mecanismos além da produção de anticorpos, como a produção de citocinas, incluindo IL-6, IL-10, IL-35, CCL3, GM-CSF e TNF- α . Dentre essas citocinas, IL-6, IFN- γ e TNF- α regulam a diferenciação de células T CD4+ efectoras e de memória, enquanto IL-10 e IL-35 podem regular negativamente as respostas imunológicas (Shen e Fillatreau, 2015).

1.2 Linfócitos B

Os linfócitos B são originados das células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea. Sabe-se que tanto os linfócitos T quanto os linfócitos B são mediadores da resposta imune adaptativa. Ambos linfócitos expressam receptores específicos em sua superfície que medeiam o reconhecimento de antígenos e a ativação celular (Wardemann e Busse, 2017).

Os linfócitos B expressam cerca de 10^5 complexos de receptor de células B (BCRs) em sua superfície. Apesar disso, uma característica fundamental dos linfócitos é que todas as células expressam um único receptor de antígeno com especificidade definida, onde cada célula individual pode reconhecer apenas um antígeno, enquanto a população pode reconhecer qualquer estrutura antigênica. Neste quesito, cada BCR é composto por uma imunoglobulina (Ig) ligada à membrana que medeia a ligação ao antígeno e duas moléculas sinalizadoras associadas, Ig α (CD79a) e Ig β (CD79b), que conectam o BCR às vias de sinalização intracelulares e, desse modo, mediam as respostas celulares (Hombach *et al.*, 1990; Justement *et al.*, 1990).

Cada imunoglobulina é constituída por duas cadeias pesadas (γ) e duas cadeias leves (κ ou λ), codificadas por diferentes genes, e ligadas por pontes dissulfeto. Cada cadeia pesada ou leve é dividida em duas regiões: região variável (V) situada na porção N-terminal e que apresenta alta diversidade na sequência entre as células B, e região constante (C), localizada na porção C-terminal. A região V é a parte do Ig que se liga ao antígeno, enquanto a região C determina o isotipo e tem a função efetora. Além disso, entre os genes que codificam as

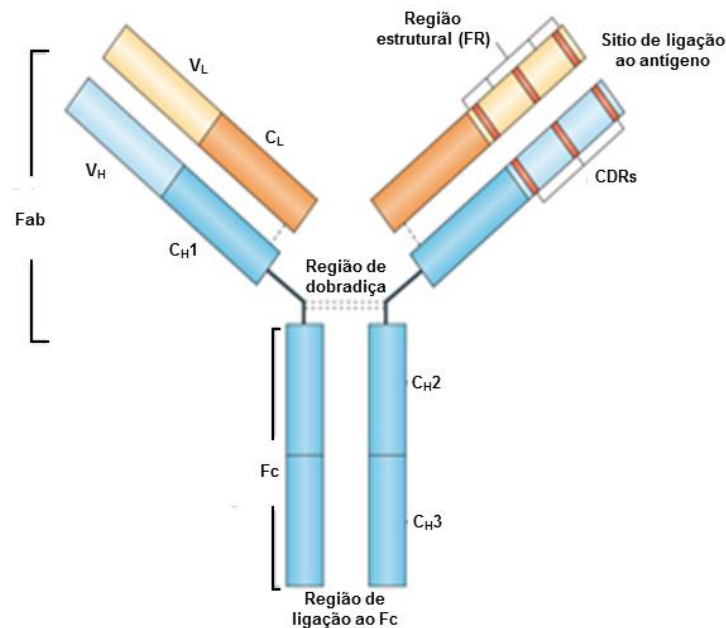
regiões V e C, existem ainda dois segmentos gênicos denominados: de diversidade (D) e de junção (J). Cada região V é constituída por quatro áreas de diversidade relativamente limitada, conhecidas como regiões de estrutura (FRs), intercaladas com três áreas altamente variáveis, conhecidas como regiões determinantes de complementaridade (CDRs), que conferem à molécula Ig sua especificidade única (Schroeder e Cavacini, 2010; Sutton *et al.*, 2013). Já a região C da cadeia leve apresenta pouca relevância funcional, enquanto a da cadeia pesada influencia a capacidade de sinalização do BCR. Além disso, as regiões V, tanto da cadeia pesada quanto da cadeia leve, formam o sítio de ligação ao antígeno determinando, portanto, a especificidade do receptor ao antígeno. A região C da cadeia pesada é formada por três domínios, CH1, CH2 e CH3, enquanto a região variável, por apenas um, VH. Já a cadeia leve (L) é composta por apenas uma região C, CL, e uma região V, VL. Uma cadeia leve típica possui aproximadamente 25 kDa, enquanto uma cadeia pesada possui aproximadamente 50 kDa (Schroeder e Cavacini, 2010). Na Figura 3 é possível observar a estrutura esquematizada de um anticorpo da classe IgG.

Os genes que codificam as cadeias pesada e leve kappa (κ) em humanos se situam no cromossomo 14, enquanto os genes que codificam a cadeia leve lambda (λ) estão situados no cromossomo 22 (Hobart *et al.*, 1981; McBride, O. W., Battey, J., *et al.*, 1982; McBride, O. W., Hieter, P. A., *et al.*, 1982). Em relação ao repertório geral de anticorpos entre cadeias kappa e lambda, é possível encontrar em seres humanos cerca de 60% de anticorpos contendo cadeias kappa e 40% contendo cadeias lambda (McBride, O. Wesley *et al.*, 1982; Abbas *et al.*, 2012).

Para que ocorra a produção de Ig é preciso que ocorra a maturação dos linfócitos B, sendo este processo iniciado a partir de células pró-B que ainda não expressam Ig na membrana. As células pró-B expressam três genes, desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT), RAG-1 e RAG-2 (*Recombination activating genes*), que irão comandar a recombinação gênica. A recombinação gênica é o processo pelo qual os loci das cadeias pesada (IgH) e leve (IgL) sofrem rearranjos do segmento gênico (VDJ) resultando em um domínio V específico individual dentro de cada cadeia, de tal forma que cada BCR é específico para um único antígeno (Dudley *et al.*, 2005). Para que ocorra a recombinação gênica, a célula pró-B inicia a expressão gênica da enzima TdT, que adiciona nucleotídeos nas regiões 3' do segmento J de forma aleatória (Alt e Baltimore, 1982), assim como dos genes ativadores de recombinação somática, RAG-1 e RAG-2, que geram quebras no DNA em regiões específicas (Schatz *et al.*, 1989; Oettinger *et al.*, 1990). Deste modo, esse processo leva a um alto grau de diversidade somática, que é produzida pela associação combinatória dos múltiplos genes citados, ou por inserções ou deleções de nucleotídeos durante os

processos de recombinação, contribuindo assim para uma maior especificidade da ligação ao antígeno. Esta especificidade está localizada no segmento J, onde se encontra o segmento CDR3, considerado a porção mais importante do anticorpo (Abbas *et al.*, 2012). Este estágio de desenvolvimento culmina na expressão de uma cadeia pesada μ , que passa a caracterizar a próxima fase de desenvolvimento, as células pré-B.

Figura 3: Representação esquemática de um anticorpo da classe IgG



A imagem representa a estrutura de um anticorpo, sendo esta composta de dois dímeros, cada um composto de uma cadeia pesada (em azul) e uma leve (em laranja). As linhas pontilhadas representam as pontes dissulfeto que mantêm a estrutura do anticorpo. O domínio variável da cadeia pesada (V_H) e da leve (V_L) é a região onde estão presentes as CDRs (*Complementarity Determining Regions* – Regiões Determinantes de Complementaridade), assim como a região estrutural (FR – *framework*) compreendendo assim a região de interação direta com o antígeno. A região Fab (*Fragment antigen-binding*) compreende as regiões variáveis e C_{H1} da cadeia pesada e C_L da leve. As regiões constantes formam a região Fc (fragmento cristalizável) que apresenta como função a fixação de complemento ou ligação em receptores de Fc presentes em diferentes linhagens celulares.

Neste estágio de desenvolvimento, as células pré-B passam a expressar o pré-BCR em sua superfície, o qual não está totalmente formado, pois este receptor nessa fase é composto pela cadeia pesada μ associada com uma cadeia leve substituta, que são estruturalmente homólogas entre si, porém não possuem domínio V e são idênticas em todas as células. Logo após o pré-BCR ter sido depositado na superfície da célula, ocorre a parada dos processos de recombinação gênica, assim como a síntese da cadeia leve substituta (Zhang *et al.*, 2004; Abbas *et al.*, 2012). Além disso, o complexo formado desempenha um papel importante no desenvolvimento dos linfócitos B, estimulando assim a proliferação de células B imaturas

(diferenciação de linfócitos pré-B para linfócitos B imaturos), subsequente produção das cadeias leves κ ou λ , assim como a continuação da maturação dos linfócitos B (diferenciação de linfócitos B imaturos para linfócitos B maduros) (Herzog *et al.*, 2009). Combinada com a cadeia μ , uma molécula de IgM é formada e expressa na superfície celular. Linfócitos B com moléculas de IgM na superfície são denominados linfócitos B imaturos. Esses linfócitos passam por um processo de seleção negativa na medula óssea antes de completarem sua maturação, para excluir aqueles linfócitos com um BCR autorreativo (afinidade contra antígenos próprios). Deste modo, para que o sistema imunológico funcione apropriadamente, é preciso que ele seja capaz de distinguir as células e moléculas do próprio organismo. Aqueles linfócitos B imaturos que apresentam baixa afinidade de interação continuam seu processo de desenvolvimento. Por outro lado, se houver alta afinidade de interação com qualquer antígeno próprio, o clone de linfócito B pode se tornar não funcional ou sofrer morte celular por apoptose, ou ainda, passar por um novo processo de recombinação dos segmentos gênicos V-J da cadeia leve (Perelson e Weisbuch, 1997; Perez-Andres *et al.*, 2010). Por fim, os linfócitos B imaturos transformam-se em linfócitos B maduros que apresentam em sua superfície IgM e IgD, podendo interagir com antígenos e, deste modo, sofrer expansão clonal (Hamel *et al.*, 2012).

Na periferia, os linfócitos B maduros podem ser sondadas quanto à sua capacidade de reconhecer antígenos estranhos, ou seja, antígenos que sejam reconhecidos pela imunoglobulina ancorada em sua membrana. A ligação do antígeno específico ao BCR inicia a sinalização intracelular e resulta na ativação do linfócito B. Os linfócitos B são ativados nos órgãos linfóides secundários por antígenos ou complexos imunes apresentados por células dendríticas. Deste modo, os linfócitos B podem proliferar e diferenciar-se em células plasmáticas (PCs) sem a necessidade do suporte de linfócitos T. No entanto, essas respostas imunes independentes de células T geram PCs produtoras de anticorpos de baixa afinidade e tipicamente não dão origem a células B de memória. Por outro lado, quando os linfócitos B ativados encontram linfócitos T *helper* (Th) específicos ao antígeno na borda da zona de linfócitos T e folículo de linfócitos B, uma resposta imune humoral dependente de linfócitos T é iniciada (Good-Jacobson e Tarlinton, 2012; Seifert e Küppers, 2016).

Os linfócitos B que entram no folículo poucos dias depois de sua formação diferenciam-se e formam uma estrutura conhecida como centro germinativo (GC). No GC ocorre a proliferação dos linfócitos B, conhecida como expansão clonal. Após essa expansão clonal inicial, o GC se divide em duas zonas distintas: a zona escura e a zona clara. Na zona escura, clones de linfócitos B sofrem hipermutação somática, que introduz mutações pontuais

aleatórias nas regiões V de seus genes de imunoglobulina. Este processo é seguido por uma seleção baseada na afinidade na zona clara que contém complexos imunes contendo células dendríticas foliculares (FDC) e linfócitos T *helper* foliculares (Tfh). Os linfócitos B com BCRs com mutações somáticas coletam o antígeno da superfície da FDC, internalizam e apresentam aos linfócitos Tfh via MHCII. Os linfócitos B com BCRs de alta afinidade passam por processo expansão clonal adicional e formação de células plasmáticas de alta afinidade, assim como formação dos linfócitos B de memória. Este processo de mutação e seleção que gera linfócitos B efetores com BCRs com maior afinidade por antígeno é referido como maturação de afinidade, e a competição pela ajuda de células Tfh é um mediador essencial deste processo (Küppers, 2005; Abbas *et al.*, 2012; Vanderleyden *et al.*, 2014).

1.2.1 Resposta imune mediada por anticorpos policlonais contra DENV

Sabe-se que após a infecção primária pelo DENV, os indivíduos desenvolvem anticorpos neutralizantes contra o sorotipo infeccioso cuja presença correlaciona com a proteção duradoura contra o sorotipo viral homólogo. Após a infecção secundária por um sorotipo heterólogo, os indivíduos desenvolvem anticorpos neutralizantes não apenas contra os sorotipos expostos anteriormente, mas também contra os sorotipos aos quais eles ainda não foram expostos (sorotipos heterólogos) (Halstead, 2003). Deste modo, acredita-se que esses anticorpos heterotípicos neutralizantes contribuam para a proteção contra os sorotipos heterólogos durante a terceira ou quarta infecção por DENV, devido à menor taxa de internação hospitalar (Gibbons *et al.*, 2007) e redução do risco de infecção por DENV sintomático em humanos (Olkowski *et al.*, 2013), bem como menor viremia em macacos (Tsai *et al.*, 2013).

O fato de infecções secundárias levarem a uma viremia sérica mais alta e um maior risco de doença grave em comparação com infecções primárias sugere fortemente que a imunidade preexistente ao DENV é um fator de risco para dengue grave. Neste quesito, a principal teoria proposta para explicar o risco aumentado de doença grave em infecções secundárias é a potencialização da infecção mediada por anticorpos (ADE) (Wahala e Silva, 2011; Morrone e Lok, 2019). Esta teoria foi primeiramente descrita por Halstead e colaboradores (Halstead *et al.*, 1970; Halstead e O'rourke, 1977) e propõe que anticorpos de reatividade cruzada ou em concentrações sub-neutralizantes ligam-se a um sorotipo heterólogo facilitando assim a entrada do vírus via receptores Fc expressos nas células alvo, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas (Santos Souza *et al.*, 2016). Mecanicamente, o

ADE é uma via mais eficiente para a entrada viral do que a endocitose mediada por receptores cognatos. Além disso, a interação vírus-hospedeiro durante a ADE também permite que o vírus evite respostas antivirais e imunológicas do hospedeiro que, de outro modo, limitariam a infecção. Resumidamente, o ADE resulta assim em uma carga maior de infecção que induz respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias desequilibradas, que supostamente induzem a patologia endotelial capilar e o vazamento vascular, levando potencialmente ao choque hipovolêmico - isto é, síndrome do choque da dengue (Wilder-Smith *et al.*, 2019).

Por outro lado, a proteína E é a maior determinante antigênica das partículas virais e o principal alvo de anticorpos neutralizantes. É possível encontrar epítomos distribuídos entre os três domínios. Sabe-se que anticorpos direcionados para os domínios I e II são, em sua maioria, anticorpos de reatividade cruzada e não são neutralizantes (Crill e Chang, 2004). Por outro lado, estudos que tem como foco avaliar a proteção terapêutica contra desafio intracraniano com vírus da dengue em camundongos, demonstraram que os anticorpos direcionados contra o domínio EDIII apresentaram um perfil protetor quando administrados duas vezes ao dia após infecção (Brien *et al.*, 2010). No entanto, nem todos os anticorpos gerados são protetores e alguns destes anticorpos apresentam reatividade cruzada (Wahala *et al.*, 2009). Além disso, alguns anticorpos contra o domínio I da proteína E também são considerados protetores (Lai *et al.*, 2007).

Também foi descrito que humanos infectados por DENV também produzem anticorpos anti-EDIII (Beltramello *et al.*, 2010; De Alwis *et al.*, 2011). No entanto, anticorpos contra este domínio parecem exercer pequena contribuição para a proteção em humanos, uma vez que tem sido demonstrando que os anticorpos que reagem contra o EDIII constituem somente uma pequena fração dos anticorpos totais anti-DENV presentes em soros de pacientes com infecção primária e secundária (Wahala *et al.*, 2009). Neste trabalho foi observado que os anticorpos ligavam-se a um epítomo específico do EDIII após a infecção primária. Por outro lado, após a infecção secundária, observou-se a ligação a um epítomo de reatividade cruzada. Ainda assim, os soros dos pacientes mantiveram uma potente atividade neutralizante, mesmo após a depleção dos anticorpos de ligação ao EDIII. Outro trabalho utilizando um DENV2 recombinante com mutações em epítomos presentes no EDIII demonstrou que os epítomos presente no EDIII não são o alvo principal de anticorpos neutralizantes humanos (Wahala *et al.*, 2012).

1.2.2 Resposta imune mediada por anticorpos monoclonais contra DENV

Diversas tecnologias tem sido empregadas para gerar anticorpos monoclonais humanos contra DENV após infecção natural ou vacinação. Tais tecnologias incluem: imortalização por EBV de células B, hibridomas de citofusão e clonagem e expressão de anticorpos expressos por linfócitos B únicos (Beltramello *et al.*, 2010; De Alwis *et al.*, 2011; De Alwis *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012; Teoh *et al.*, 2012; Wilson e Andrews, 2012; Xu *et al.*, 2012; Costin *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014; Dejnirattisai, Wongwiwat, Supasa, Zhang, Dai, Rouvinsky, *et al.*, 2015; Priyamvada *et al.*, 2016). No entanto, apesar de diferentes metodologias e/ou antígenos terem sido utilizados, os anticorpos monoclonais produzidos em indivíduos com infecção primária e secundária por DENV eram predominantemente de reatividade cruzada, enquanto que os anticorpos monoclonais sorotipo-específicos foram identificados principalmente em indivíduos após infecção primária.

Sendo assim, anticorpos monoclonais humanos produzidos contra as proteínas NS1, E e prM a partir de células B de indivíduos infectados pelo vírus da dengue apresentam divergências em sua capacidade de reagir cruzadamente. Metade dos anticorpos anti-NS1 apresentam reatividade cruzada limitada entre os sorotipos, enquanto a maioria dos anticorpos dirigidos contra as proteínas estruturais (anti-E e anti-prM) apresentam reatividade cruzada completa contra todos os sorotipos do vírus. No entanto, observa-se que, em geral, os anticorpos contra a proteína prM são incapazes de neutralizar completamente a infecção enquanto que os anticorpos anti-E tem essa capacidade (Dejnirattisai *et al.*, 2010). Anticorpos monoclonais direcionados contra um epítipo presente somente na proteína E dimérica formam uma única classe de anticorpos capazes de neutralizar o DENV produzido em células humanas primárias. Por sua vez, um grande grupo de anticorpos que reagem com epítopos conformacionais complexos são produzidos como parte da resposta contra a infecção natural (Dejnirattisai, Wongwiwat, Supasa, Zhang, Dai, Rouvinsky, *et al.*, 2015).

Por outro lado, a resposta das células B específicas ao DENV em um grupo de crianças com infecção primária ou secundária demonstrou que as células B eram altamente sorotipo específicas à proteína E após a infecção primária, enquanto que a maioria das células B específicas contra a proteína E detectadas em pacientes com infecção secundária produziam anticorpos com reatividade cruzada, e eram secretados com maior avidéz contra sorotipos heterólogos do DENV. Esses dados sugerem que as pequenas populações de células B de

reatividade cruzada induzidas pela infecção primária pelo DENV são preferencialmente expandidas durante a infecção secundária (Mathew *et al.*, 2011).

Costin e colaboradores isolaram três anticorpos monoclonais de pacientes infectados pelo DENV. Esses anticorpos reconhecem com alta afinidade a proteína E, neutralizam os quatro sorotipos e, em concentrações sub-neutralizantes, estimulam ADE. Ao mapear os epítomos, verificou-se que esses anticorpos ligam-se em uma região conservada do “loop” de fusão do EDII (Costin *et al.*, 2013). Outro estudo, utilizando um painel de anticorpos monoclonais humanos obtidos de indivíduos com infecção primária ou secundária, avaliou a resposta de anticorpos neutralizantes com reatividade cruzada. A maioria desses anticorpos ligou-se ao “loop” de fusão no EDII, sendo fracamente neutralizantes e com forte atividade de ADE. Neste estudo, somente um anticorpo monoclonal (1C19) apresentou potente neutralização contra os quatro sorotipos de DENV. Ao mapear o sítio de ligação do anticorpo monoclonal 1C19, os autores observaram que ele se ligava a uma região conservada do EDII (aminoácidos 73-79) adjacente ao “loop” de fusão (Smith *et al.*, 2013).

Em camundongos, alguns estudos têm demonstrado que os anticorpos monoclonais mais potentes se ligam ao EDIII. Gromowski e Barrett demonstraram que sete anticorpos monoclonais produzidos em camundongos reconhecem epítomos sobrepostos que formam um sítio antigênico conservado no DENV-2 e localizado no EDIII (Gromowski e Barrett, 2007). Outro trabalho demonstrou que anticorpos monoclonais produzidos por camundongos imunizados com a proteína E recombinante são normalmente sorotipo específicos e não neutralizam todos os genótipos de um determinado sorotipo (Shrestha *et al.*, 2010).

Por outro lado, diferentemente do que acontece em camundongos, em humanos poucos anticorpos são dirigidos para a região do EDIII. Alguns grupos têm demonstrando que anticorpos monoclonais humanos ligam-se a epítomos quaternários presentes no EDI/II (De Alwis *et al.*, 2012; Teoh *et al.*, 2012; Fibriansah *et al.*, 2014; Fibriansah *et al.*, 2015) e EDIII (Dejnirattisai, Wongwiwat, Supasa, Zhang, Dai, Rouvinski, *et al.*, 2015; Fibriansah *et al.*, 2015; Gallichotte *et al.*, 2015; Rouvinski *et al.*, 2015). Quando se avalia a resposta de anticorpos anti-EDIII em humanos em uma infecção primária, percebe-se que esses anticorpos ligam-se a um epítomo específico neste domínio, enquanto que na infecção secundária, a maioria dos anticorpos parece estar direcionada contra outro epítomo de reatividade cruzada, sugerindo assim que, em humanos, anticorpos contra este domínio parecem exercer pequena contribuição para a proteção (Shrestha *et al.*, 2010). Beltramello e colaboradores demonstraram em amostras de sangue de pacientes com infecção primária e secundária uma frequência alta de células B reativas contra proteínas do DENV, até mesmo

anos após a infecção. Esses autores também foram capazes de isolar anticorpos monoclonais humanos anti-EDIII que potencialmente neutralizam a infecção de dois ou mais sorotipos do DENV (Beltramello *et al.*, 2010).

Deste modo, a geração de anticorpos neutralizantes em pacientes previamente infectados sugere que é possível desenvolver uma resposta imunológica protetora contra a dengue. Porém, o aparecimento de anticorpos com capacidade de aumentar a infecção cria um empecilho adicional ao desenvolvimento de uma vacina efetiva contra esta doença. De qualquer forma, o estudo das propriedades dos anticorpos neutralizantes e/ou indutores de ADE é extremamente relevante para que possamos desenhar vacinas mais racionais e que possam, de fato, proteger os indivíduos. Sendo assim, o estudo dos anticorpos gerados durante a infecção com o vírus da dengue poderá fornecer informações valiosas que permitirão compreender alguns dos mecanismos envolvidos na patogenicidade da doença e proteção imunológica do hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias racionais para o controle da dengue. Se formos capazes de identificar anticorpos monoclonais amplamente neutralizantes, estes poderiam ser utilizados para o tratamento da dengue severa, como medida de intervenção rápida para aqueles indivíduos com risco de morte.

1.3 Produção de anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais (AcMo) são ferramentas essenciais para muitas investigações de imunologia molecular. No geral, servem como ferramentas poderosas para a investigação de macromoléculas e células, e têm se mostrado reagentes eficazes em termos de especificidade para testes de diagnóstico clínico (Nelson *et al.*, 2000). Sendo assim, os anticorpos monoclonais têm se tornado cada vez mais importantes na pesquisa biomédica, no diagnóstico e na bioterapia nas últimas décadas.

O progresso tecnológico na geração de AcMo iniciou-se quando Georges J. F. Köhler e César Milstein desenvolveram um método, em 1975, para produzir AcMo com uma única especificidade de ligação ao antígeno. A técnica para geração de AcMo descrita pelos ganhadores do prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina (1984) é conhecida como hibridização celular somática, hibridoma ou fusão celular. Estes cientistas geraram uma linhagem de células estáveis (hibridomas), resultante da fusão de células mielômicas e linfócitos B de camundongos imunizados com hemácias de carneiro. Estes hibridomas passaram a secretar um isotipo de uma imunoglobulina específica para um determinado antígeno (Kohler e Milstein, 1975; 2005).

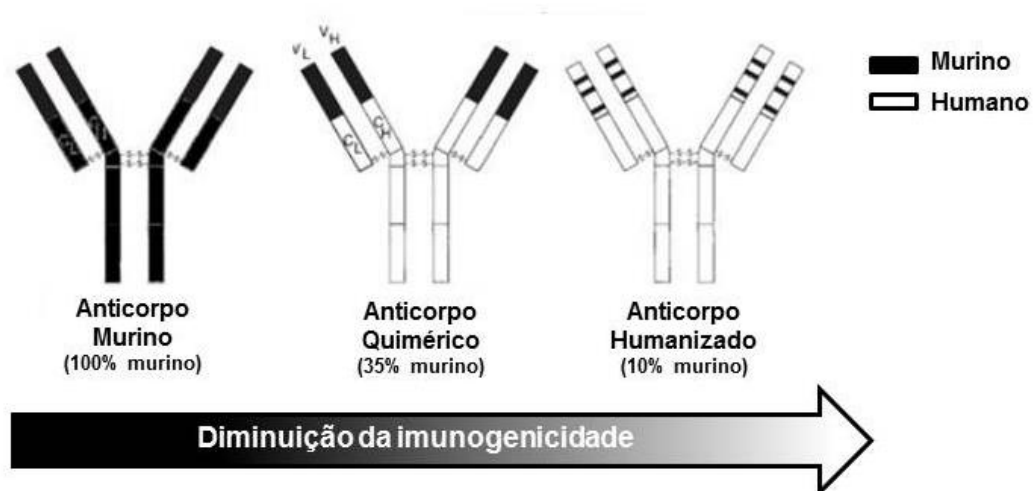
A técnica para obtenção de hibridomas consiste basicamente na fusão de um linfócito B de camundongo previamente imunizado com antígeno de interesse, com uma célula de mieloma, que são células imortalizadas que apresentam alta atividade mitótica. Durante a fusão celular, três populações de células permanecem em cultivo: linfócitos B, células de mieloma e células híbridas. O isolamento das células híbridas das células de mieloma ocorre no meio de cultivo HAT (hipoxantina, aminopteria e timidina) em que somente crescem células que possuam a enzima hipoxantina-fosforibosil transferase (HPRT). Quando não fundidas com os linfócitos B, as células de mieloma morrem pois não possuem a enzima HPRT, ou seja, são incapazes de utilizar a hipoxantina exógena para biossíntese de nucleotídeos, ficando dependentes da enzima HPRT para sobreviver. Já os linfócitos B acabam por morrer naturalmente devido ao seu limitado tempo de vida médio. Desta forma, as células híbridas são as únicas capazes de crescer de forma indefinida e produzir os AcMos (Colcher *et al.*, 1999).

Por outro lado, AcMos murinos são reconhecidos como antígenos pelo sistema imunológico humano, limitando assim o seu uso terapêutico, uma vez que podem induzir uma reação imunogênica. Este reconhecimento desencadeia uma resposta imune conhecida como HAMA (*Human Anti-mouse Antibody*). Esta resposta imune consiste na produção de AcMos humanos anti-anticorpo murino que promovem a sua neutralização ou exacerbação da resposta imunológica.

No início da década de 80, foram adotadas técnicas de engenharia genética para manipulação dos anticorpos monoclonais que possibilitaram a obtenção de anticorpos quiméricos e humanizados (Reichert *et al.*, 2005; Reichert, 2011; Funayama *et al.*, 2012). Deste modo, juntamente com a técnica dos hibridomas, foi possível conduzir as primeiras tentativas de reduzir o potencial imunogênico de tais anticorpos, denominados assim de anticorpos quiméricos ou quimerizados. Os anticorpos quiméricos são anticorpos que são formados pela junção da região constante humana com a região variável murina, tanto para cadeia leve como para cadeia pesada. Logo, transfere-se os genes recombinantes responsáveis pela expressão da região variável oriundos de um hibridoma murino para um vetor que codifica a região constante de uma imunoglobulina humana. Posteriormente, estes são inseridos em mielomas que produzem AcMos, com um componente humano e outro componente murino. Essa técnica é bastante satisfatória, porém a molécula ainda pode ser imunogênica devido a presença da região variável murina. Quando comparada com os AcMos murinos, apresentam menor imunogenicidade (Morrison *et al.*, 1984; Casanova Estruch, 2013).

Uma outra alternativa que visa a redução da imunogenicidade é a produção de AcMos humanizados. Para isso, a região constante do anticorpo é fusionada a uma região variável desenhada de forma que sua sequência seja a mais próxima possível da região variável de um anticorpo humano. Nesse caso, as regiões variáveis das cadeias leve e pesada são redesenhadas baseando-se em regiões variáveis das cadeias leve e pesada de imunoglobulinas humanas homólogas à imunoglobulina murina. Deste modo, os CDRs da imunoglobulina murina são transferidos para a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina humana, obtendo assim uma molécula humanizada que preserva a capacidade de interação com o antígeno (Co *et al.*, 1991; Co e Queen, 1991; Newsome e Ernstoff, 2008; Casanova Estruch, 2013). Portanto, quando comparado com os anticorpos quiméricos, os humanizados têm uma maior proporção de sequências humanas, reduzindo a probabilidade de desenvolvimento de anticorpos anti-anticorpos murinos (Reff *et al.*, 2002). A imagem abaixo (Figura 4) representa a evolução dos AcMos.

Figura 4: Representação esquemática da evolução dos anticorpos monoclonais.



A imagem representa um anticorpo monoclonal murino (em preto) demonstrando as limitações quanto ao seu uso repetitivo como fármaco, devido à resposta HAMA (*human anti-mouse antibody*). As primeiras tentativas de minimizar este potencial imunogênico foram feitas por meio da fusão das cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo murino (em preto), com as cadeias constantes humanas (em branco), formando um anticorpo quimérico. Pos ainda serem imunogênicas, os protocolos mais modernos de humanização preconizam a transferência das CDR murinas (linhas pretas) para cadeias variáveis humanas (em branco). Adaptado: (Co e Queen, 1991)

A produção de AcMos pode ser realizada também através do uso de *phage display*. Com esta técnica é possível criar uma biblioteca com uma grande quantidade de partículas de fagos com diferentes fragmentos de anticorpos contra o antígeno de interesse. A técnica consiste basicamente na inserção de genes que codificam as proteínas de interesse no genoma

de bacteriófagos, entre o peptídeo sinal e o gene de uma proteína de capsídeo do bacteriófago, para então gerar uma biblioteca que irá conter bilhões de anticorpos ou peptídeos diferentes. A seleção de anticorpos de interesse é realizada por um método denominado *biopanning*, que se baseia em ciclos repetidos de incubação, lavagem, amplificação e seleção de fagos ligados. No entanto, AcMos produzidos por *phage display* são difíceis de produzir em cultura celular, uma vez que se tem a necessidade do conhecimento prévio do antígeno de interesse (McCafferty *et al.*, 1990; Schirrmann *et al.*, 2011; Bazan *et al.*, 2012a; b).

Uma opção também para a obtenção de AcMos é através da imortalização de células B obtidas de camundongos transgênicos. Esses camundongos não possuem genes das imunoglobulinas endógenas que foram substituídos pelos loci das imunoglobulinas humanas. Deste modo, os camundongos transgênicos que carregam o gene de imunoglobulina humana produzem anticorpos humanos com alta afinidade para diferentes epítopos em resposta a uma imunização. Desta forma pode-se isolar destes animais linfócitos B de interesse e gerar um híbrido murino produtor de anticorpos humanos (Green, 1999; Krauss, 2003; Lanzavecchia *et al.*, 2007; Corti e Lanzavecchia, 2014).

Além da obtenção de AcMos humanos por imortalização de células B obtidas de camundongos transgênicos, é possível também obter essas células diretamente de doadores humanos. Para isso, linfócitos B de memória de doadores humanos podem ser imortalizados pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV). O EBV é um vírus que apresenta em sua superfície uma glicoproteína de envelope denominada gp350. Essa glicoproteína se liga ao receptor viral CD21, que está presente na superfície do linfócito B (Takacs *et al.*, 2010). O CD21 é expresso abundantemente em linfócitos B de memória e favorece a infecção viral (Abbas *et al.*, 2012). Deste modo, a imortalização dessas células é realizada pela transformação de linfócitos B com vírus Epstein-Barr, que induz ativação metabólica, transformações morfológicas, proliferação e imortalização (Yenamandra *et al.*, 2009). Os linfócitos B imortalizados por EBV secretam anticorpos em grande quantidade e isso permite a detecção de anticorpos específicos presentes no meio de cultivo dessas células (Lanzavecchia *et al.*, 2007).

Mais recentemente, uma estratégia inovadora foi desenvolvida pelo grupo do Dr. Michel Nussenzweig (Rockefeller University, EUA) que baseia-se na clonagem e expressão de AcMos a partir de linfócitos B específicos para o antígeno de interesse (Wardemann, Hedda *et al.*, 2003; Tiller, Thomas *et al.*, 2008; Scheid, Johannes F., Mouquet, Hugo, Feldhahn, Niklas, Seaman, Michael S., *et al.*, 2009; Scheid, Johannes F., Mouquet, Hugo, Feldhahn, Niklas, Walker, Bruce D., *et al.*, 2009; Mouquet *et al.*, 2010; Mouquet *et al.*, 2011; Wardemann e Kofer, 2013). Para tanto, os linfócitos B de doadores humanos específicos para

um antígeno de interesse são isolados individualmente por um citômetro com capacidade de separação em placas de 96 poços. Com base no mRNA de um único linfócito B humano produtor de um anticorpo específico amplificam-se os genes que codificam as porções variáveis das imunoglobulinas que são clonados em vetores de expressão codificando a respectiva região constante (pesada ou leve). Após transfecção, as células eucariotas produzirão uma molécula de imunoglobulina inteira, com estrutura idêntica à humana (Tiller, Thomas *et al.*, 2008). Esta metodologia permite a análise de centenas de células B antígeno-específicas por indivíduo, além de permitir a seleção exclusiva de células B em diferentes estágios de desenvolvimento (de células pré-B a células B de memória IgG+). Esta metodologia foi utilizada para clonar anticorpos diretamente de uma única célula B isolada do sangue de indivíduos saudáveis (Wardemann, H. *et al.*, 2003; Tiller, T. *et al.*, 2008) ou infectados pelo vírus HIV (Scheid, J. F. *et al.*, 2009; Scheid *et al.*, 2011) (Chen *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010).

Diante do exposto, acredita-se que a identificação de anticorpos neutralizantes abre perspectivas para a aplicação de soroterapia em pacientes com risco de dengue severa, além de servir como base para o delineamento racional de vacinas, uma vez que epítomos reconhecidos por estes anticorpos podem ser mapeados e incorporados às mesmas.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a resposta policlonal e gerar anticorpos monoclonais humanos específicos para a proteína E a partir de material genético obtido de células B isoladas do sangue periférico de indivíduos diagnosticados com dengue.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar, expressar e purificar a proteína E em sistema procarioto;
- Obter amostras de soro de pacientes diagnosticados com dengue e verificar os títulos de anticorpos anti-proteína E neles presentes;
- Selecionar os pacientes que apresentarem altos títulos de anticorpos anti-E;
- Avaliar a resposta policlonal desses anticorpos: ensaio de neutralização viral e ADE;
- Coletar e purificar os PBMCs dos pacientes selecionados e que optarem por participar da pesquisa;
- Selecionar e separar os linfócitos B reativos para a proteína E através de citometria de fluxo multiparamétrica;
- Amplificar por PCR as porções variáveis das cadeias leve e pesada das células B obtidas após a separação;
- Clonar e expressar anticorpos recombinantes em células de mamíferos;
- Utilizar estes anticorpos em ensaios de neutralização viral.

Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7. Elsevier Saunders, 2012. 545.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul 2004. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229469> >.

ALT, F. W.; BALTIMORE, D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. **PNAS**, v. 79, n. 13, p. 4118-4122, 1982.

BAUM, A.; GARCIA-SASTRE, A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. **Amino Acids**, v. 38, n. 5, p. 1283-99, May 2010. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19882216> >.

BAZAN, J.; CALKOSINSKI, I.; GAMIAN, A. Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 12, p. 1817-28, Dec 1 2012a. ISSN 2164-554X (Electronic)

2164-5515 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906939> >.

_____. Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 2. Vaccine delivery. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 12, p. 1829-35, Dec 1 2012b. ISSN 2164-554X (Electronic)

2164-5515 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906938> >.

BELTRAMELLO, M. et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 3, p. 271-83, Sep 16 2010. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833378> >.

http://ac.els-cdn.com/S1931312810002799/1-s2.0-S1931312810002799-main.pdf?_tid=7d834b80-113b-11e5-90f1-00000aab0f01&acdnat=1434138471_a1d9faca3061f2d9e1390d93d6526d11 >.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 25 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563266> >.

BRIEN, J. D. et al. Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against dengue virus type 3. **J Virol**, v. 84, n. 20, p. 10630-43, Oct 2010. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702644> >.

CASANOVA ESTRUCH, B. Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment. **Neurologia**, v. 28, n. 3, p. 169-78, Apr 2013. ISSN 1578-1968 (Electronic)

0213-4853 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592627> >.

CHAMBERS, T. J. et al. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting. **Vaccine**, v. 15, n. 14, p. 1494-502, Oct 1997. ISSN 0264-410X (Print)

0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330458> >.

CHEN, L. et al. Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. **Science**, v. 326, p. 1123-1127, 2009.

CO, M. S. et al. Humanized antibodies for antiviral therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 7, p. 2869-73, Apr 1 1991. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849279> >.

CO, M. S.; QUEEN, C. Humanized antibodies for therapy. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 501-2, Jun 6 1991. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2046753> >.

COLCHER, D. et al. Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies. **Q J Nucl Med**, v. 43, n. 2, p. 132-9, Jun 1999. ISSN 1125-0135 (Print)

1125-0135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10429508> >.

CORTI, D.; LANZAVECCHIA, A. Efficient Methods To Isolate Human Monoclonal Antibodies from Memory B Cells and Plasma Cells. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 5, Oct 2014. ISSN 2165-0497 (Electronic)

2165-0497 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104354> >.

COSTIN, J. M. et al. Mechanistic study of broadly neutralizing human monoclonal antibodies against dengue virus that target the fusion loop. **J Virol**, v. 87, n. 1, p. 52-66, Jan 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23077306>
<http://jvi.asm.org/content/87/1/52.full.pdf> >.

CRILL, W. D.; CHANG, G. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **J Virol**, v. 78, n. 24, p. 13975-86, Dec 2004. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564505> >.

DE ALWIS, R. et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e1188, Jun 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713020> >.

DE ALWIS, R. et al. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 19, p. 7439-44, May 08 2012. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22499787> >.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745-8, May 7 2010. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448183>
<http://www.sciencemag.org/content/328/5979/745.full.pdf> >.

DEJNIRATTISAI, W. et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. **Nat Immunol**, v. 16, n. 2, p. 170-7, Feb 2015. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25501631> >.

DEJNIRATTISAI, W. et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. **Nat Immunol**, v. 16, n. 2, p. 170-7, Feb 2015. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25501631>
<http://www.nature.com/ni/journal/v16/n2/pdf/ni.3058.pdf> >.

DUDLEY, D. D. et al. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. **Adv Immunol**, v. 86, p. 43-112, 2005. ISSN 0065-2776 (Print)

0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705419> >.

FIBRIANSAH, G. et al. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. **EMBO Mol Med**, v. 6, n. 3, p. 358-71, Mar 2014. ISSN 1757-4684 (Electronic)

1757-4676 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24421336> >.

FIBRIANSAH, G. et al. A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins. **Nat Commun**, v. 6, p. 6341, Feb 20 2015. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25698059> >.

FUNAYAMA, J. C. et al. Production of human antibody fragments binding to melittin and phospholipase A2 in Africanised bee venom: minimising venom toxicity. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 110, n. 3, p. 290-7, Mar 2012. ISSN 1742-7843 (Electronic)

1742-7835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22017759> >.

GALLICHOTTE, E. N. et al. A new quaternary structure epitope on dengue virus serotype 2 is the target of durable type-specific neutralizing antibodies. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01461-15, Oct 13 2015. ISSN 2150-7511 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26463165> >.

GARCIA, M. et al. Skin innate immune response to flaviviral infection. **Eur Cytokine Netw**, v. 28, n. 2, p. 41-51, Jun 1 2017. ISSN 1952-4005 (Electronic)

1148-5493 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28840835> >.

GIBBONS, R. V. et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 5, p. 910-3, Nov 2007. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984352> >.

GOOD-JACOBSON, K. L.; TARLINTON, D. M. Multiple routes to B-cell memory. **Int Immunol**, v. 24, n. 7, p. 403-8, Jul 2012. ISSN 1460-2377 (Electronic)

0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22451529> >.

GREEN, L. L. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 231, n. 1-2, p. 11-23, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175999001374> >.

GROMOWSKI, G. D.; BARRETT, A. D. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. **Virology**, v. 366, n. 2, p. 349-60, Sep 30 2007. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719070> >.

GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp**, v. 277, p. 3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-3, 2006. ISSN 1528-2511 (Print)

1528-2511 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319151> >.

GUILARDE, A. O. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. **J Infect Dis**, v. 197, n. 6, p. 817-24, Mar 15 2008. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18269315> >.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079655> >.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **Curr Opin Infect Dis**, v. 15, n. 5, p. 471-6, Oct 2002. ISSN 0951-7375 (Print)

0951-7375 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12686878> >.

_____. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 421-67, 2003. ISSN 0065-3527 (Print)

0065-3527 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689700> >.

HALSTEAD, S. B. et al. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 10, p. 712-22, Oct 2010. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883967> >.

HALSTEAD, S. B.; NIMMANNITYA, S.; COHEN, S. N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 42, n. 5, p. 311-328, 1970. ISSN 0044-0086

1551-4056. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5419206>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2591704/> >.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of experimental medicine**, v. 146, n. 1, p. 201-217, 1977. ISSN 0022-1007

1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/406347>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2180729/> >.

HAMEL, K. M.; LIARSKI, V. M.; CLARK, M. R. Germinal Center B-cells. **Autoimmunity**, v. 45, n. 5, p. 333-347, 2012/08/01 2012. ISSN 0891-6934. Disponível em: < <https://doi.org/10.3109/08916934.2012.665524> >.

HERZOG, S.; RETH, M.; JUMAA, H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 195, 03/01/online 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nri2491> >.

HOBART, M. J. et al. Immunoglobulin heavy chain genes in humans are located on chromosome. **Ann Hum Genet**, v. 45, n. 4, p. 331-5, Oct 1981. ISSN 0003-4800 (Print)

0003-4800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6805411> >.

HOMBACH, J. et al. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 760-2, Feb 22 1990. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2304550> >.

JUSTEMENT, L. B. et al. Membrane IgM and IgD molecules fail to transduce Ca²⁺ mobilizing signals when expressed on differentiated B lineage cells. **J Immunol**, v. 144, n. 9, p. 3272-80, May 1 1990. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2109774> >.

KIELIAN, M. Class II virus membrane fusion proteins. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 38-47, Jan 5 2006. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364734> >.

KIELIAN, M.; REY, F. A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 1, p. 67-76, Jan 2006. ISSN 1740-1526 (Print)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357862> >.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-7, Aug 7 1975. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1172191> >.

_____. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. **J Immunol**, v. 174, n. 5, p. 2453-5, Mar 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728446> >.

KRAUSS, J. Recombinant antibodies for the diagnosis and treatment of cancer. **Mol Biotechnol**, v. 25, n. 1, p. 1-17, Sep 2003. ISSN 1073-6085 (Print)

1073-6085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679630> >.

KÜPPERS, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. **Nature Reviews**, v. 5, p. 251-262, 2005.

LAI, C. J. et al. Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody and protection against DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys by passively transferred humanized antibody. **J Virol**, v. 81, n. 23, p. 12766-74, Dec 2007. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881450> >.

LAMBRECHTS, L.; FAILLOUX, A. B. Vector biology prospects in dengue research. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1080-2, Dec 2012. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295765> >.

LANZAVECCHIA, A.; CORTI, D.; SALLUSTO, F. Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 6, p. 523-8, Dec 2007. ISSN 0958-1669 (Print)

0958-1669 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063358> >.

LI, L. et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1830-4, Mar 28 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369147> >.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunol Rev**, v. 225, p. 300-13, Oct 2008. ISSN 1600-065X (Electronic)

0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18837790> >.

MATHEW, A. et al. B-cell responses during primary and secondary dengue virus infections in humans. **J Infect Dis**, v. 204, n. 10, p. 1514-22, Nov 15 2011. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930609>

<http://jid.oxfordjournals.org/content/204/10/1514.full.pdf> >.

MCBRIDE, O. W. et al. Localization of human variable and constant region immunoglobulin heavy chain genes on subtelomeric band q32 of chromosome 14. **Nucleic Acids Res**, v. 10, n. 24, p. 8155-70, Dec 20 1982. ISSN 0305-1048 (Print)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6819544> >.

MCBRIDE, O. W. et al. Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. **J Exp Med**, v. 155, n. 5, p. 1480-90, May 1 1982. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6802926> >.

MCBRIDE, O. W. et al. Chromosomal Location of Human Kappa and Lambda Immunoglobulin Light Chain Constant Region Genes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 155, p. 1480-1490, 1982.

MCCAFFERTY, J. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, n. 6301, p. 552-554, 1990. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/348552a0> >.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-9, Jan 22 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14737159> >.

MORRISON, S. L. et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 21, p. 6851-6855, 1984.

MORRONE, S. R.; LOK, S.-M. Structural perspectives of antibody-dependent enhancement of infection of dengue virus. **Current Opinion in Virology**, v. 36, p. 1-8, 2019/06/01/ 2019. ISSN 1879-6257. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625718301731> >.

MOUQUET, H. et al. Memory B Cell Antibodies to HIV-1 gp140 Cloned from Individuals Infected with Clade A and B Viruses. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e24078, 2011.

MOUQUET, H. et al. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 591-595, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature09385>

<http://www.nature.com/nature/journal/v467/n7315/abs/nature09385.html#supplementary-information> >.

NASIRUDEEN, A. M. et al. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e926, Jan 4 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245912> >.

NAYAK, V. et al. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. **J Virol**, v. 83, n. 9, p. 4338-44, May 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244332> >.

NELSON, P. N. et al. Monoclonal antibodies. **Mol Pathol**, v. 53, n. 3, p. 111-7, Jun 2000. ISSN 1366-8714 (Print)

1366-8714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10897328> >.

NEWSOME, B. W.; ERNSTOFF, M. S. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy; have the magic bullets arrived? **Br J Clin Pharmacol**, v. 66, n. 1, p. 6-19, Jul 2008. ISSN 1365-2125 (Electronic)

0306-5251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18503606> >.

NOWAK, T.; WENGLER, G. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. **Virology**, v. 156, n. 1, p. 127-37, Jan 1987. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3811228> >.

OETTINGER, M. A. et al. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. **Science**, v. 248, n. 4962, p. 1517-1523, June 22, 1990 1990. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/248/4962/1517.abstract> >.

OLKOWSKI, S. et al. Reduced risk of disease during postsecondary dengue virus infections. **J Infect Dis**, v. 208, n. 6, p. 1026-33, Sep 2013. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23776195> >.

PERELSON, A. S.; WEISBUCH, G. Immunology for physicists. **Reviews of Modern Physics**, v. 69, n. 4, p. 1219-1268, 10/01/ 1997. Disponível em: < <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.69.1219> >.

PEREZ-ANDRES, M. et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 78B, n. S1, p. S47-S60, 2010. ISSN 1552-4949. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cyto.b.20547> >.

PRIYAMVADA, L. et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 28, p. 7852-7, Jul 12 2016. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27354515> >.

REFF, M. E.; HARIHARAN, K.; BRASLAWSKY, G. Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies. **Cancer Control**, v. 9, n. 2, p. 152-66, Mar-Apr 2002. ISSN 1073-2748 (Print)

1073-2748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11965235> >.

REICHERT, J. M. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. **MAbs**, v. 3, n. 1, p. 76-99, Jan-Feb 2011. ISSN 1942-0870 (Electronic)

1942-0862 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051951> >.

REICHERT, J. M. et al. Monoclonal antibody successes in the clinic. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 9, p. 1073-8, Sep 2005. ISSN 1087-0156 (Print)

1087-0156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151394> >.

REMAKUS, S.; SIGAL, L. J. Memory CD8(+) T cell protection. **Adv Exp Med Biol**, v. 785, p. 77-86, 2013. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23456840> >.

RIGAU-PEREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-7, Sep 19 1998. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9752834> >.

RIVINO, L. T cell immunity to dengue virus and implications for vaccine design. **Expert Rev Vaccines**, v. 15, n. 4, p. 443-53, 2016. ISSN 1744-8395 (Electronic)

1476-0584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26560171> >.

RIVINO, L.; LIM, M. Q. CD4(+) and CD8(+) T-cell immunity to Dengue - lessons for the study of Zika virus. **Immunology**, v. 150, n. 2, p. 146-154, Feb 2017. ISSN 1365-2567 (Electronic)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27763656> >.

ROUVINSKI, A. et al. Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 109-13, Apr 02 2015. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25581790> >.

SANT, A. J.; MCMICHAEL, A. Revealing the role of CD4(+) T cells in viral immunity. **J Exp Med**, v. 209, n. 8, p. 1391-5, Jul 30 2012. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851641> >.

SANTOS SOUZA, H. F.; DA SILVA ALMEIDA, B.; BOSCARDIN, S. B. Early dengue virus interactions: the role of dendritic cells during infection. **Virus Res**, v. 223, p. 88-98, Sep 2 2016. ISSN 1872-7492 (Electronic)

0168-1702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27381061> >.

SCHATZ, D. G.; OETTINGER, M. A.; BALTIMORE, D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. **Cell**, v. 59, n. 6, p. 1035-1048, 2015/05/11 1989. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90760-5](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90760-5) >.

SCHEID, J. F. et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. **Nature**, v. 458, n. 7238, p. 636-640, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature07930>

< http://www.nature.com/nature/journal/v458/n7238/supinfo/nature07930_S1.html >.

SCHEID, J. F. et al. A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 343, n. 2, p. 65-67, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175908003645> >.

SCHEID, J. F. et al. A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. **J Immunol Methods**, v. 343, n. 2, p. 65-7, Apr 15 2009. ISSN 1872-7905 (Electronic)

0022-1759 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100741> >.

SCHEID, J. F. et al. Differential regulation of self-reactivity discriminates between IgG+ human circulating memory B cells and bone marrow plasma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 44, p. 18044-8, Nov 1 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025722>

< <http://www.pnas.org/content/108/44/18044.full.pdf> >.

SCHIRRMANN, T. et al. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 412-26, Jan 10 2011. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221060> >.

SCHROEDER, H. W., JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S41-52, Feb 2010. ISSN 1097-6825 (Electronic)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176268> >.

SEIFERT, M.; KÜPPERS, R. Human memory B cells. **Leukemia**, v. 30, p. 2283, 08/08/online 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/leu.2016.226> >.

SETH, R. B. et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 669-82, Sep 9 2005. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125763> >.

SHEN, P.; FILLATREAU, S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 7, p. 441-51, Jul 2015. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26065586> >.

SHRESTHA, B. et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000823, Apr 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20369024> >.

SMITH, S. A. et al. The potent and broadly neutralizing human dengue virus-specific monoclonal antibody 1C19 reveals a unique cross-reactive epitope on the bc loop of domain II of the envelope protein. **MBio**, v. 4, n. 6, p. e00873-13, Nov 19 2013. ISSN 2150-7511 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24255124> >.

SMITH, S. A. et al. Isolation of dengue virus-specific memory B cells with live virus antigen from human subjects following natural infection reveals the presence of diverse novel functional groups of antibody clones. **J Virol**, v. 88, n. 21, p. 12233-41, Nov 2014. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100837> >.

SMITH, S. A. et al. Persistence of circulating memory B cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection. **J Virol**, v. 86, n. 5, p. 2665-75, Mar 2012. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22171265> >.

SPROKHOLT, J.; HELGERS, L. C.; GEIJTENBEEK, T. B. Innate immune receptors drive dengue virus immune activation and disease. **Future Virol**, v. 13, n. 4, p. 287-305, Mar 2017. ISSN 1746-0794 (Print)

1746-0794 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29937918> >.

SPROKHOLT, J. K. et al. RIG-I-like receptor activation by dengue virus drives follicular T helper cell formation and antibody production. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 11, p. e1006738, Nov 2017a. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29186193> >.

_____. RIG-I-like Receptor Triggering by Dengue Virus Drives Dendritic Cell Immune Activation and TH1 Differentiation. **J Immunol**, v. 198, n. 12, p. 4764-4771, Jun 15 2017b. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28507028> >.

SRIKIATKHACHORN, A.; MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. **Semin Immunopathol**, v. 39, n. 5, p. 563-574, Jul 2017. ISSN 1863-2300 (Electronic)

1863-2297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28401256> >.

SUTTON, L. A. et al. Antigen selection in B-cell lymphomas--tracing the evidence. **Semin Cancer Biol**, v. 23, n. 6, p. 399-409, Dec 2013. ISSN 1096-3650 (Electronic)

1044-579X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932942> >.

TEOH, E. P. et al. The structural basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 139, p. 139ra83, Jun 20 2012. ISSN 1946-6242 (Electronic)

1946-6234 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22723463> >.

THOMAS, S. J.; ENDY, T. P. Critical issues in dengue vaccine development. **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, n. 5, p. 442-50, Oct 2011. ISSN 1473-6527 (Electronic)

0951-7375 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21799408> >.

TILLER, T. et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. **Journal of Immunological Methods**, v. 329, p. 112-124, 2008.

TILLER, T. et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. **J Immunol Methods**, v. 329, n. 1-2, p. 112-24, Jan 1 2008. ISSN 0022-1759 (Print)

0022-1759 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996249> >.

TSAI, W. Y. et al. High-avidity and potently neutralizing cross-reactive human monoclonal antibodies derived from secondary dengue virus infection. **J Virol**, v. 87, n. 23, p. 12562-75, Dec 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24027331> >.

UNO, N.; ROSS, T. M. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 167, Oct 10 2018. ISSN 2222-1751 (Electronic)

2222-1751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30301880> >.

VAN DER SCHAAR, H. M.; WILSCHUT, J. C.; SMIT, J. M. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 613-29, 2009. ISSN 1878-3279 (Electronic)

0171-2985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261353> >.

VANDERLEYDEN, I.; LINTERMAN, M. A.; SMITH, K. G. Regulatory T cells and control of the germinal centre response. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 5, p. 471, 2014. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25606598> >.

WAHALA, W. M. et al. Recombinant dengue type 2 viruses with altered e protein domain III epitopes are efficiently neutralized by human immune sera. **J Virol**, v. 86, n. 7, p. 4019-23, Apr 2012. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278250> >.

WAHALA, W. M. et al. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 103-13, Sep 15 2009. ISSN 1096-0341 (Electronic)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631955> >.

WAHALA, W. M.; SILVA, A. M. The human antibody response to dengue virus infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374-95, Dec 2011. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355444> >.

WANG, J. P. et al. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7114-21, Nov 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082628> >.

WANG, W. K. et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **Virology**, v. 305, n. 2, p. 330-8, Jan 20 2003. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12573578> >.

WARDEMANN, H.; BUSSE, C. E. Novel Approaches to Analyze Immunoglobulin Repertoires. **Trends Immunol**, v. 38, n. 7, p. 471-482, Jul 2017. ISSN 1471-4981 (Electronic)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28566130> >.

WARDEMANN, H.; KOFER, J. Expression Cloning of Human B Cell Immunoglobulins. In: KÜPPERS, R. (Ed.). **Lymphoma**: Humana Press, v.971, 2013. p.93-111. (Methods in Molecular Biology).

WARDEMANN, H. et al. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1374-1377, September 5, 2003 2003. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/301/5638/1374.abstract> >.

WARDEMANN, H. et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1374-7, Sep 5 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12920303> >.

WEBSTER, D. P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 11, p. 678-87, Nov 2009. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850226> >.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 7, p. 518-28, Jul 2007. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558424> >.

WILDER-SMITH, A. et al. Dengue. **Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350-363, Jan 26 2019. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30696575> >.

WILSON, P. C.; ANDREWS, S. F. Tools to therapeutically harness the human antibody response. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 10, p. 709-19, Oct 2012. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007571> >.

XU, M. et al. Plasmablasts generated during repeated dengue infection are virus glycoprotein-specific and bind to multiple virus serotypes. **J Immunol**, v. 189, n. 12, p. 5877-85, Dec 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152560> >.

YENAMANDRA, S. P. et al. Expression Profile of Nuclear Receptors upon Epstein-Barr Virus Induced B Cell Transformation. **Experimental Oncology**, v. 31, n. 2, p. 92-96, 2009.

ZHANG, M.; SRIVASTAVA, G.; LU, L. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. **Cell Mol Immunol**, v. 1, n. 2, p. 89-94, Apr 2004. ISSN 1672-7681 (Print)

1672-7681 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212894> >.

ZHANG, W. et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nat Struct Biol**, v. 10, n. 11, p. 907-12, Nov 2003. ISSN 1072-8368 (Print)

1072-8368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528291> >.

ZHANG, Z. S. et al. High-level expression of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein and induction of neutralizing antibodies in BALB/C mice. **J Virol Methods**, v. 143, n. 2, p. 125-31, Aug 2007. ISSN 0166-0934 (Print)

0166-0934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17532481> >.

ZHOU, T. et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 811-7, Aug 13 2010. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616231> >.