

BIANCA DA SILVA ALMEIDA

Análise das respostas imunológicas humoral e celular induzidas após o direcionamento da proteína do envelope do vírus da dengue para células dendríticas DEC205+

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Silvia Beatriz Boscardin

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

Almeida BS. Análise das respostas imunológicas celular e humoral induzidas após o direcionamento da proteína do envelope do vírus da dengue para células dendríticas DEC205⁺. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

As células dendríticas (DCs) são consideradas como apresentadoras de antígenos profissionais, iniciando e modulando as respostas imunológicas. São células migratórias, sendo capazes de fazer a “ponte” entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. As DCs reconhecem e capturam os antígenos no local da infecção, processam e apresentam os mesmos para células T via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Em órgãos linfoides secundários de camundongos existem dois subtipos majoritários de DCs que são classificados de acordo com suas características fenotípicas: as DCs CD8 α ⁺ DEC205⁺ que são encontradas nas zonas de células T, e as DCs CD8 α ⁻ DCIR2⁺, encontradas na periferia das zonas de células T e B. O direcionamento de diferentes antígenos para essas células tem sido uma estratégia promissora para a avaliação das respostas imunológicas humoral e celular. Resumidamente, a estratégia de direcionamento do antígeno de interesse consiste em sua fusão à porção final da cadeia pesada de um anticorpo monoclonal (mAb) que reconhece um receptor endocítico presente na superfície das DCs. Assim, o mAb quimérico, quando injetado, direciona o antígeno de interesse para a população de DCs desejada. Nesse trabalho, direcionamos a proteína do envelope (E) do vírus da dengue sorotipo 2 (DENV2) e seus diferentes domínios para o subtipo de DCs CD8 α ⁺DEC205⁺. Este subtipo foi escolhido por ter importante papel em certas infecções virais, induzir a ativação de linfócitos T CD4⁺ e também por ser capaz de realizar apresentação cruzada de antígenos exógenos para linfócitos T CD8⁺. Para tanto, os mAbs α DEC205-E, α DEC205-EDI/II e α DEC205-EDIII foram produzidos e utilizados para imunizar camundongos BALB/c, na presença de um estímulo de maturação para as DCs, a fim de avaliar as respostas imunológicas induzidas após o direcionamento. Os resultados mostraram que o direcionamento da proteína E inteira ou de seu domínio III (EDIII) foram capazes de induzir robusta resposta celular nos animais quando comparada à ausência de direcionamento (obtida pela imunização com proteínas recombinantes não fusionadas ao mAb). Além disso, quando o EDIII foi direcionado para as DCs CD8 α ⁺DEC205⁺ foi possível mapear dois epítomos imunodominantes reconhecidos pelo haplótipo dos camundongos BALB/c. Quando avaliamos a indução da resposta imune humoral anti-E ou seus domínios, títulos baixos de anticorpos foram detectados nos animais imunizados com os mAbs quiméricos quando comparados a ausência de direcionamento. Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que o direcionamento da proteína E ou do EDIII foi capaz de induzir uma resposta imune celular contra o DENV, fornecendo informações importantes para o delineamento de novas estratégias vacinais contra o vírus da dengue.

Palavras-chave: Células Dendríticas. Vacinas. Dengue. Proteína do envelope.

ABSTRACT

Almeida BS. Analysis of the cellular and humoral immune responses induced after targeting of the dengue virus envelope protein to the DEC205⁺ dendritic cells. [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Dendritic cells (DCs) are considered professional antigen-presenting cells, initiating and modulating immune responses. They are migratory cells, able to bridge “the gap” between the innate immune system and the adaptive immune systems. DCs recognize and capture antigens at the site of infection, process and display them to T cells via the major histocompatibility complex molecules (MHC). In the mouse secondary lymphoid organs there are two major DCs subtypes, which are classified according to their phenotypic characteristics: CD8 α ⁺DEC205⁺ DCs, which are found in the T cell zones and CD8 α ⁻DCIR2⁺ DCs found in the periphery of T and B-cell zones. The targeting of different antigens to these cells has been a promising strategy for the evaluation of humoral and cellular immune responses. Briefly, the targeting strategy consists in the fusion of the antigen of interest to the heavy chain of a chimeric monoclonal antibody (mAb) that recognizes a specific endocytic receptor present on the surface of the DC. Thus, the chimeric mAb, when injected, targets the antigen of interest to the desired DC population. In this work, we targeted the dengue virus serotype 2 (DENV2) envelope (E) protein and its different domains to the CD8 α ⁺DEC205⁺ DCs subtype. This subtype was chosen because of its important role in certain viral infections, its ability to activate CD4⁺ T lymphocytes and also for being able to cross present exogenous antigens to CD8⁺ T lymphocytes. For this purpose, α DEC205-E, α DEC205-EDI/II and α DEC205-EDIII mAbs were produced and used to immunize BALB/c mice, in the presence of a DC maturation stimulus, to evaluate the immunological responses induced after targeting. The results showed that the targeting of E protein or its domain III (EDIII) were able to induce a robust cellular immune response in the animals when compared to the absence of targeting (obtained after immunization with non-fused recombinant proteins). Furthermore, when EDIII was targeted to the CD8 α ⁺DEC205⁺ DCs it was possible to map two immunodominant epitopes recognized by the BALB/c mouse haplotype. When we evaluated the induction of the humoral immune response against the E protein or its domains, low antibody titers were detected in the animals immunized with the chimeric mAbs when compared to the absence of targeting. The data obtained in this work suggest that the targeting of E protein or EDIII was able to induce a cellular immune response against DENV, providing important information for the design of new vaccine strategies against the dengue virus.

Keywords: Dendritic cells. Dengue. Envelope protein. Vaccine.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células Dendríticas

As células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) são células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*) profissionais consideradas centrais na indução de resposta imunológica contra diferentes patógenos e na manutenção da tolerância periférica (1–3). As DCs foram identificadas pela primeira vez em 1970 por Steinman e Cohn em um estudo em que se descreveu sua morfologia, localização e distribuição em órgãos linfoides murinos (1,4). Durante muito tempo as DCs foram alvo de diversos estudos, principalmente em modelo animal.

As DCs estão distribuídas em diferentes tecidos linfoides e não linfoides do corpo, sendo importantes na iniciação e modulação das respostas imunes, especialmente estimulando a proliferação de linfócitos T, tendo a capacidade de fazer uma “ponte” entre o sistema imune inato e o adaptativo (5,6). Essa interação entre os sistemas imunológicos ocorre porque as DCs possuem uma série de receptores capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, capturar esses patógenos na periferia, processá-los, e migrar para os órgãos linfoides secundários para apresentar os antígenos derivados a linfócitos T (7).

Essas células expressam elevados níveis de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) e de moléculas co-estimulatórias, o que as torna células especializadas em apresentar antígenos para as células T (8). Assim, os linfócitos T tornam-se ativados para exercerem suas funções específicas.

Dados na literatura mostram que, quando imaturas, as DCs podem induzir tolerância de células T específicas se apresentarem o antígeno via MHC (9). No entanto, se receberem estímulos inflamatórios do meio ambiente (como detecção de moléculas produzidas durante a inflamação e/ou de padrões associados aos patógenos), as DCs sofrem um processo de maturação e o resultado da apresentação MHC-antígeno é uma forte ativação de células T (10).

1.1.1 Subtipos de DCs em órgãos linfoides de camundongos

Diferentes subtipos de DCs foram identificados com base na sua ontogenia, propriedades funcionais e marcadores fenotípicos, os quais permitem diferenciá-las tanto em camundongos (11) quanto em humanos (12). Devido a essas características fenotípicas, as DCs são classificadas como DCs plasmocitoides (pDCs) e DCs convencionais (cDCs) (12,13).

As pDCs são encontradas em diversos tecidos linfoides e não linfoides (pele, pulmão, rim, intestino, entre outros), porém são células caracterizadas por expressarem baixos níveis da molécula de MHC II e são pouco eficientes em induzir a proliferação de linfócitos T (14,15).

Em órgãos linfoides secundários de camundongos, como o baço e linfonodos, as cDCs são subdivididas em duas populações majoritárias. A caracterização dessas células é dada pela expressão fenotípica de marcadores de superfície celular (11). A subpopulação $CD8\alpha^+DEC205^+$ é caracterizada por expressar a cadeia alfa da molécula CD8 e simultaneamente o receptor endocítico do tipo C para lectinas, CD205 (ou DEC205, por ser um receptor formado por 10 cadeias de lectina, portanto uma dectina) (11). O receptor DEC205 é expresso em níveis elevados em cDCs presentes na zona de células T de órgãos linfoides secundários (16). O segundo subtipo, denominado de $CD8\alpha^-DCIR2^+$, é encontrado entre as zonas de células T e B. São caracterizadas por não expressar a cadeia α da molécula CD8 e nem o receptor endocítico DEC205; ao invés deste, apresentam outro receptor endocítico para lectina do tipo C, o DCIR2 (do inglês *Dendritic Cell Immuno Receptor 2*) (17).

As DCs $CD8\alpha^+DEC205^+$ são bastante eficientes em capturar células mortas e tem importante papel na resistência contra certas infecções virais (18). Diversos estudos comprovam a eficiência das DCs $CD8\alpha^+DEC205^+$ na captura de antígenos e na sua apresentação via moléculas de MHC II para linfócitos T $CD4^+$, além de realizar apresentação cruzada aos linfócitos T $CD8^+$ via MHC classe I (18,19).

1.1.2 Ativação das DCs

Para iniciar uma resposta imune, as DCs identificam padrões moleculares de diferentes patógenos por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (20). Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll like receptors*) são os PRRs mais bem caracterizados no que diz respeito à ativação de DCs, constituindo uma família de moléculas que reconhecem uma variedade de substâncias microbianas, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*). A ativação dos TLRs desencadeia uma cascata de sinalização que resulta na produção de citocinas e quimiocinas, e no aumento da expressão de moléculas de MHC e de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) (21).

As DCs imaturas são caracterizadas por apresentarem baixa expressão de moléculas de MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias, porém apresentam uma alta capacidade de capturar antígenos. Já em contexto inflamatório ou quando as DCs recebem estímulos do meio ambiente, como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e o RNA de dupla fita, por exemplo, essas células passam por diferentes alterações funcionais e fenotípicas resultando no processo de maturação. Esse processo é caracterizado por aumento da expressão das moléculas de MHC II, aumento das moléculas co-estimulatórias e aumento da expressão de moléculas de adesão (como CD54 e CD58) (22,23). Portanto, o processo de maturação das DCs integra-se também com o seu processo de migração (10), e o resultado da apresentação MHC-antígeno é uma forte ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Contudo, é interessante mencionar que outros receptores também exercem papel importante no processo de ativação das DCs, como por exemplo, a família de receptores de lectina tipo C (24,25) como o receptor de manose (MR), ICAM-3 (do inglês *Intercellular adhesion molecule 3*), DC-SIGN (do inglês *Dendritic cell-specific intercelular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*), dectina 1, dectina 2, colectinas, e inclusive o receptor DEC205, presente no subtipo CD8α⁺DEC205⁺ (24–26).

Devido às características fenotípicas e funcionais serem diferentes entre os subtipos de DCs, novas estratégias vacinais estão sendo desenvolvidas baseando-se no direcionamento de antígenos para uma determinada população de DCs específica, possibilitando assim o estudo sobre as diferenças na ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

1.1.3 Direcionamento de antígeno

Nas últimas décadas, anticorpos monoclonais (mAbs) têm sido utilizados para direcionar antígenos de interesse aos diferentes subtipos de DCs *in vivo* (27,28). Nessa estratégia, o mAb tem como alvo os receptores endocíticos localizados na superfície de determinados subtipos de DCs, como por exemplo, os receptores DEC205 e DCIR2. Dessa forma, a proteína de interesse é fusionada na região terminal das cadeias pesadas do mAb e acaba sendo endocitada junto com o anticorpo. Assim, uma vez no interior da célula, o anticorpo quimérico é processado e os antígenos dele derivados são processados, podendo ser apresentados para as células T. Diversos estudos evidenciaram a possibilidade de direcionar proteínas derivadas de diferentes patógenos para as DCs por meio desta estratégia utilizando mAbs (27–31).

Hawiger *et al.* (2001) e Bonifaz *et al.* (2002) demonstraram em seus estudos que a administração do mAb anti-DEC205, fusionado com a ovalbumina (OVA) ou com a lisozima de ovo de galinha (HEL), gerando os mAbs anti-DEC205-OVA e anti-DEC205-HEL, foram capazes de direcionar, eficientemente, os antígenos para a subpopulação CD8 α ⁺DEC205⁺ *in vivo* (9,32). Entretanto, observaram que quando o anticorpo quimérico foi administrado na ausência de um estímulo de maturação, o mesmo foi capaz de induzir tolerância periférica específica ao antígeno em questão. Porém, em outro estudo, quando a administração do anticorpo quimérico foi combinada com um estímulo de maturação das DCs (como o anticorpo agonista anti-CD40), o resultado foi ativação prolongada de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, promovendo também resposta imune humoral contra a proteína de interesse (27).

Outro trabalho também demonstrou que o direcionamento de antígenos na presença de um estímulo de maturação para DCs foi capaz de induzir uma

forte resposta de células T (33). Trumpfheller *et al.* (2006) fusionaram ao mAb anti-DEC205 à proteína Gag do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e administraram em camundongos o anticorpo quimérico na presença do adjuvante Poly I:C (do inglês *polyriboinosinic:polyribocytidylic acid* – RNA dupla fita sintético) e do anticorpo agonista anti-CD40 (33).

Boscardin *et al.* (2006) verificaram que uma única dose do anticorpo quimérico anti-DEC-CSP (CSP, proteína circunsporozoíta de *Plasmodium yoelli*, agente causador da malária murina), na presença de um estímulo de maturação, foi capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ a produzirem IFN- γ em diferentes linhagens de camundongos. Além disso, 7 dias após a administração de uma segunda dose foi observada a indução de uma resposta imune humoral robusta, com títulos de IgM e subclasses IgG contra a proteína CSP (27). Mais recentemente, Amorim *et al.* (2016) demonstraram que, de fato, que a utilização de mAbs em fusão com antígenos clinicamente relevantes é capaz de induzir respostas imunes celulares e humorais bastante robustas (29).

Pensando no contexto vacinal e terapêutico em humanos, Cheong *et al.* (2010) realizaram estudos utilizando camundongos transgênicos que expressavam o receptor DEC205 de humanos (hDEC205), os quais foram imunizados com duas doses do mAb anti-hDEC205 conjugado com a subunidade p24 da proteína Gag do HIV. O resultado dessa imunização foi a indução de uma resposta imune tanto humoral quanto celular. Foi observado também que, após a dose reforço, o título de anticorpos específicos para a proteína aumentou consideravelmente (34).

Assim, a estratégia de direcionamento de antígenos para as DCs tem sido considerada uma ferramenta interessante para o desenvolvimento de vacinas contra diferentes infecções. Este trabalho teve como foco principal direcionar a proteína do envelope do vírus da dengue subtipo 2, e também seus domínios, para a subpopulação de células dendríticas CD8 α ⁺DEC205⁺.

1.2 Dengue

A dengue é uma arbovirose considerada um dos principais problemas de saúde pública do mundo, afetando milhares de pessoas a cada ano. Segundo

dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença é endêmica em mais de 100 países (**figura 1**) (35), sendo generalizada em quase todo o mundo com fatores de riscos influenciados por umidade relativa, temperatura e também pela qualidade das medidas de controle e prevenção em áreas urbanas. Estudos recentes sobre a prevalência da dengue no mundo estimam que 3,9 bilhões de pessoas em 128 países correm o risco da infecção por dengue (36,37). O Brasil é um dos países mais afetados por essa enfermidade. A incidência da doença tem se tornado bastante elevada em diversos municípios brasileiros. De acordo com o Ministério da Saúde, no ano de 2016 foram notificados 1,5 milhão de casos no país, aproximadamente três vezes mais do que em 2014. Porém no ano de 2017, até abril, foram notificados 113.381 casos prováveis de dengue em todo país, uma redução de 90,3% em relação ao mesmo período de 2016 (1.180.472) (38).

A dengue é uma doença causada por um arbovírus, o vírus da dengue (DENV), transmitido ao homem por meio da picada do mosquito fêmea do gênero *Aedes*. As medidas de controle e prevenção da doença ainda continuam focadas no agente transmissor, embora algumas pesquisas para o desenvolvimento de vacinas estejam avançando. Ainda não existe tratamento específico para a doença, porém mais recentemente foi introduzida em países com áreas endêmicas a primeira vacina contra dengue, a Dengvaxia (CYD-TDV – *Chimeric - Yellow Fever Virus-DENV Tretavalent Dengue Vaccine*). Desenvolvida pela Acambis e licenciada pela Sanofi Pasteur para uso em indivíduos com idades entre 9 e 45 anos. Apesar da imunogenicidade dessa vacina, alguns ensaios clínicos demonstraram uma proteção parcial e não equilibrada entre os sorotipos do DENV (39,40). Sendo assim, é de extrema importância que haja mais estudos focados no desenvolvimento de vacinas contra a dengue.

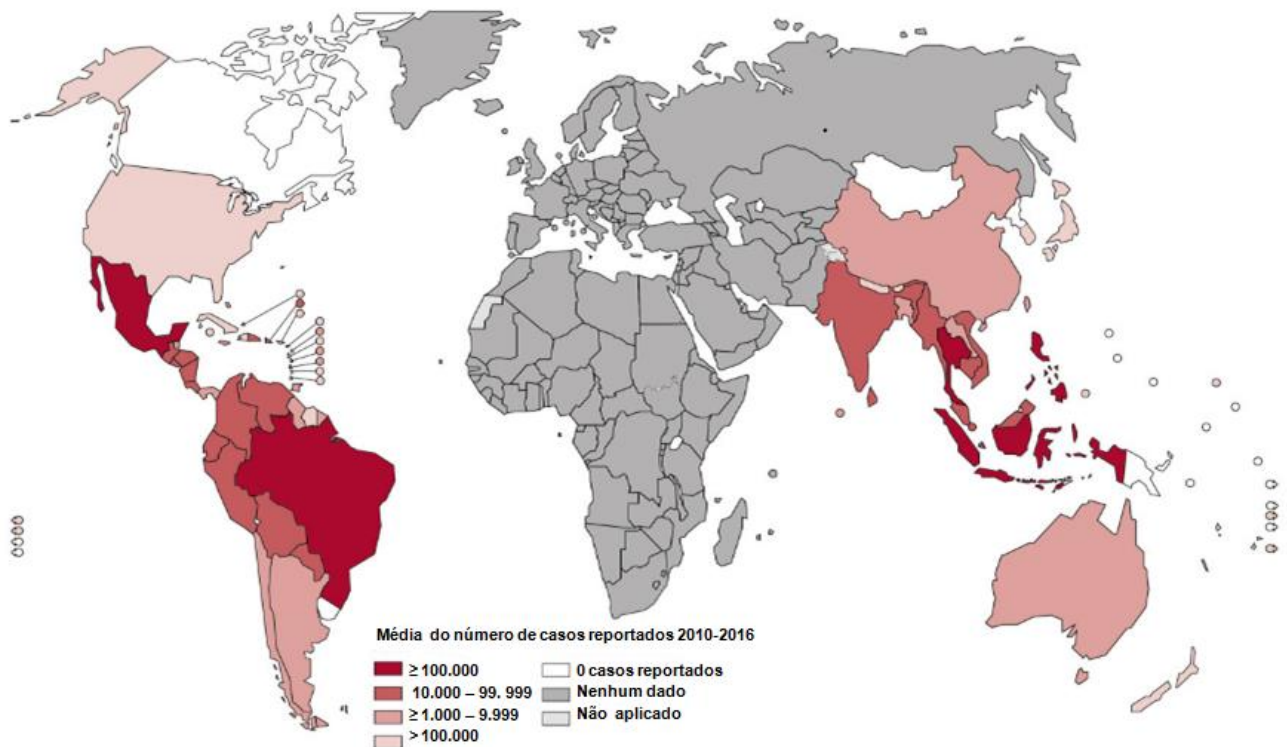


Figure 1 Mapa da média do número de casos suspeitos ou confirmados de dengue notificados entre 2010-2016. Mapa adaptado da Organização Mundial da Saúde (WHO-World Health Organization, 2017). O mapa foi adaptado do site www.who.int.

1.2.1 Transmissão do DENV em humanos

A transmissão do DENV para o homem se faz principalmente pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Aedes*, sendo que no Brasil a espécie que mais prevalece é o *Aedes aegypti* (41). O ciclo de transmissão do vírus (**figura 2**) pode se iniciar quando o mosquito se infecta ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. O vírus multiplica-se no intestino médio do vetor e infecta outros tecidos chegando, finalmente, às glândulas salivares. O período de incubação extrínseca ocorre em cerca de 8-12 dias. Após esse período, e durante o processo de hematofagia, o vetor é capaz de transmitir o DENV para o homem. Após a picada do mosquito infectado, o DENV infecta inicialmente células como macrófagos e DCs. Os sintomas se iniciam 4-7 dias após a infecção, quando há um aumento da viremia (42). É principalmente nesse período que o indivíduo infectado encontra-se com elevado risco de transmitir o DENV para o vetor e, conseqüentemente, continuar o ciclo de transmissão (43).

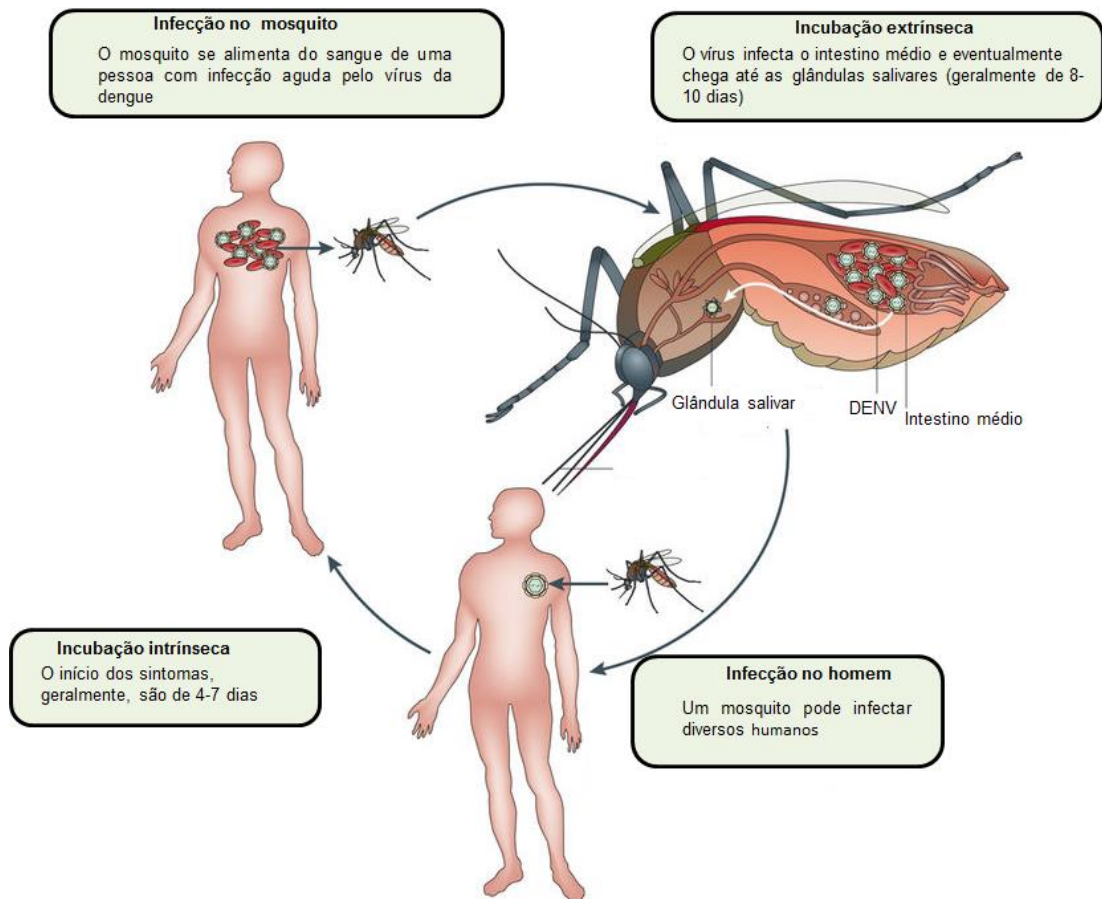


Figure 2 - Ciclo de transmissão do DENV em humanos e mosquitos. Durante o processo de hematofagia em um indivíduo na fase de viremia, o mosquito pode tornar-se infectado pelo DENV. Na fase extrínseca, que dura cerca de 8-10 dias, o vírus inicialmente infecta células do intestino médio e outros tecidos, antes de se disseminar para as glândulas salivares do vetor. Um mosquito infectado pode transmitir o DENV para vários seres humanos durante sua alimentação sanguínea. Após a infecção (4-7 dias), o indivíduo pode começar a apresentar os sintomas, sendo capaz de transmitir o vírus para um novo mosquito. Tanto indivíduos assintomáticos quanto sintomáticos podem transmitir o DENV para os mosquitos. Figura adaptada da revisão de Guzman, 2016 (42).

1.2.2 Manifestações clínicas da dengue

A dengue é uma doença viral que pode ser assintomática, causar sintomas mais brandos ou até quadros graves como o choque hipovolêmico (com ou sem hemorragia). A infecção pode resultar em uma série de manifestações clínicas, em que a sequência de infecções por diferentes sorotipos do vírus pode ser um fator importante para a gravidade e progressão da doença (41,42,43).

A dengue é uma doença aguda caracterizada, principalmente, por febre alta (40 °C) acompanhada por sintomas como: dor de cabeça, dor atrás dos olhos, dores musculares e articulares, náuseas, vômitos, glândulas inchadas

(na virilha e pescoço) ou erupções cutâneas. Na maioria das vezes, a doença se manifesta na forma mais branda conhecida como Febre da Dengue. Contudo, em alguns indivíduos, pode ocorrer a forma mais severa, sendo classificada como Dengue com Sinais de Alarme ou Dengue Grave (44,47).

As formas graves da doença podem estar associadas às infecções sucessivas com os sorotipos do DENV. A teoria ADE (do inglês *Antibody Dependent Enhancement*) defende que anticorpos induzidos durante o desenvolvimento da resposta imune contra uma infecção primária por um sorotipo do DENV podem facilitar uma infecção secundária por sorotipo heterólogo. Essa facilitação é dada pelo reconhecimento do complexo vírus-anticorpo por receptores Fc presentes nas células do hospedeiro (48–50).

1.2.3 O vírus da dengue

Existem quatro sorotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (46,51,52). Esses sorotipos são antigenicamente distintos, mas compartilham 65–70% de similaridade a nível de aminoácidos (53,54). O DENV pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, no qual também estão inclusos outros vírus de importância epidemiológica como, por exemplo, o vírus da febre amarela (YFV) e o vírus da Zika (ZIKV) (55). Os vírus dessa família são pequenos e envelopados, com diâmetro aproximado de 500 Å, e possuem como material genético um RNA de fita simples positiva (11.700 nucleotídeos). Este RNA codifica uma poliproteína que passa por diferentes processos de clivagem dando origem a sete proteínas não estruturais (NS-1, NS-2a, NS-2b, NS-3, NS-4a, NS-4b, NS-5), e a três proteínas estruturais, responsáveis pela formação da estrutura viral. São elas: a proteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (M), que é sintetizada como um precursor (prM, com aproximadamente 21 kDa), e a proteína do envelope (E) (56,57). As proteínas E e M desempenham um papel crítico durante o ciclo de replicação viral, especialmente na entrada da célula alvo. Essas proteínas passam por diferentes alterações conformacionais que auxiliam na mudança do vírus da sua forma imatura para a madura (58).

Nos processos de replicação o DENV precisa, necessariamente, utilizar

o metabolismo das células hospedeiras, tanto de mosquitos quanto de mamíferos para a geração de novas partículas virais. Em pH neutro e com uma temperatura em torno de 28-30 °C, ambiente tipicamente encontrado em mosquitos, a parte externa do vírus se mantém com 90 homodímeros da proteína E dispostos paralelamente (59–62). Por outro lado, a 37 °C, temperatura fisiológica em humanos, a partícula viral consiste de proteínas E mais heterogêneas com interações intra e inter-diméricas expondo a proteína M (59,63,64). O ciclo de replicação se inicia com o reconhecimento da célula alvo por meio de interações entre as proteínas do envelope e os receptores presentes na membrana das células alvo (**figura 3**). Essa interação leva à internalização da partícula viral pelo processo de endocitose, e é feita através de receptores ainda desconhecidos (42).

Diversos receptores têm sido propostos como candidatos na internalização do DENV, incluindo glicosaminas, como heparan sulfato e lectinas, DC-SIGN, o receptor MR de macrófagos (MMR), o receptor de lipopolisacarídeo (LPS) e o receptor CD14 (65). Há ainda a possibilidade da entrada do vírus por meio de receptores que reconhecem a porção Fc de imunoglobulinas. Nesse caso, a entrada do vírus na célula é facilitada por anticorpos não-neutralizantes induzidos durante uma infecção prévia, fenômeno conhecido como ADE (**figura 4**) (48,66).

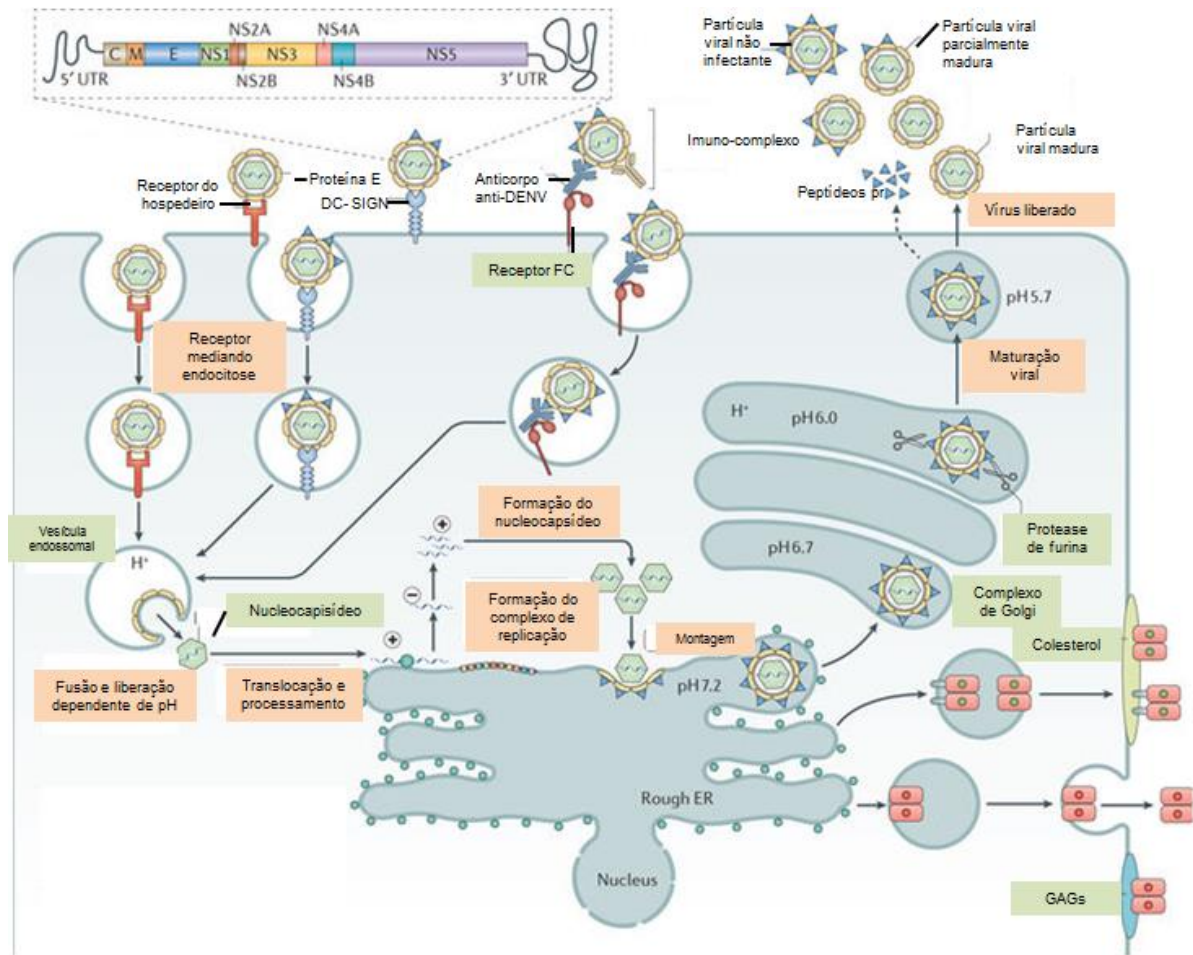


Figure 3- Ciclo de replicação do vírus da dengue. O DENV é reconhecido por células do hospedeiro, ocorrendo a ligação entre as proteínas do envelope viral e receptores desconhecidos. Esses receptores medeiam também a entrada do vírus nas células do hospedeiro por endocitose. Após a endocitose, o DENV passa por alterações estruturais dependentes de pH, que facilita a fusão das membranas endossomal e viral e conseqüente liberação do material genético. O RNA é traduzido para uma poliproteína longa, a qual é clivada por proteases do vírus ou do hospedeiro, originando assim as proteínas individuais do DENV. A forma precursora da proteína de membrana (prM) e a proteína do envelope são incorporadas no retículo endoplasmático rugoso ao nucleocapsídeo para constituir a partícula viral imatura. Essa partícula é transportada para o complexo de Golgi, onde o pH baixo provoca um rearranjo substancial das proteínas prM e E que permitem a constituição da partícula viral madura. A partícula madura é liberada juntamente com peptídeos pr, provenientes da proteína prM. Além disso, pode ocorrer a liberação de partículas imaturas com a prM intacta, porém essas não são capazes de infectar novas células do hospedeiro. Figura adaptada da revisão de Guzman, 2016 (42).

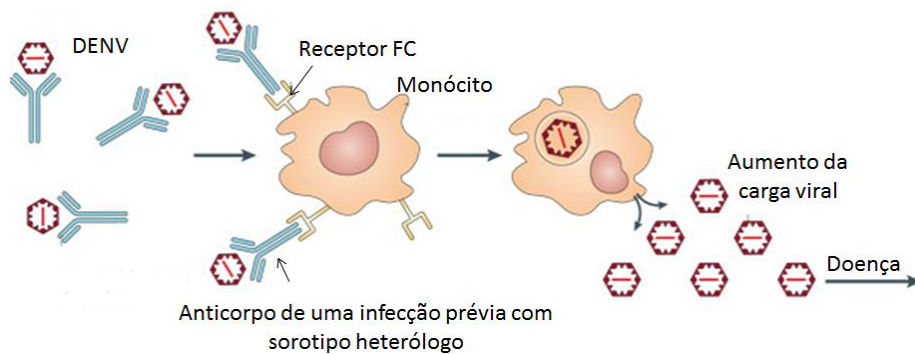


Figure 4- Modelo do aumento da infecção pelo DENV dependente de anticorpo – ADE. A infecção pelo DENV pode ser favorecida pela presença de anticorpos provenientes de uma infecção prévia pelo vírus. Os anticorpos pré-existentes se ligam à partícula viral infectante durante uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo do DENV. Esses anticorpos heterólogos (infecção prévia com sorotipo distinto) não são capazes de neutralizar o vírus e impedir a infecção. Em vez disso, o complexo formado (vírus + anticorpo) é reconhecido por receptores Fc presentes em células circulantes do hospedeiro. Por meio desse receptor, o anticorpo facilita a entrada do vírus na célula de forma mais eficiente, resultando em aumento da replicação viral e conseqüentemente podendo evoluir para uma doença mais severa. Figura adaptada da revisão de Whitehead, 2007 (67).

1.2.4 Proteína do envelope do DENV

A proteína E, foco do nosso trabalho, tem tamanho aproximado de 53 kDa, está ancorada no envelope viral e é constituída de um dímero de extensão alongada, paralela à bicamada lipídica do capsídeo viral. Cada monômero é formado por três domínios funcionais e estruturais (**figura 5**): domínio central (EDI); o domínio responsável pela dimerização que contém o peptídeo de fusão (EDII); e o domínio que se liga ao receptor da célula alvo (EDIII) (56,60,68,69). Enquanto o EDIII é codificado em uma única sequência dentro do genoma viral, o EDI e EDII (EDI/II) são descontínuos em relação à proteína e codificados em segmentos genômicos intercalados (três para o EDI e dois para o EDII) (70).

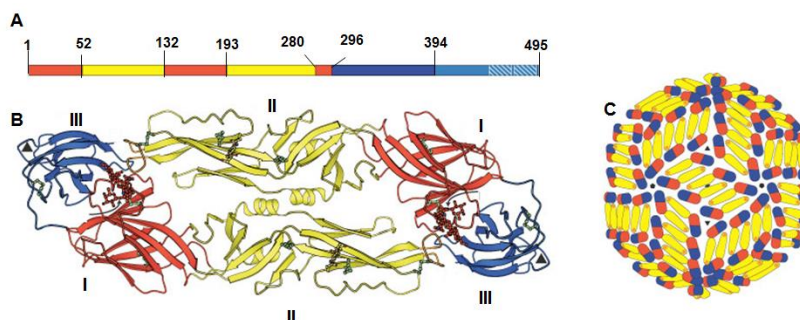


Figure 5 - Estrutura da proteína do envelope do DENV. A - Ectodomínio do vírus da dengue: o domínio I (vermelho), domínio II (amarelo) e o domínio III (azul). B - Estrutura dimérica da proteína E. Essa conformação da proteína E solúvel está presente na partícula viral madura. C - Proteína E na superfície do vírus organizada em 90 dímeros de forma icosaédrica. Figura adaptada de Modis *et. al.*, 2004 (69)

1.2.5 Resposta imunológica contra a proteína E

A proteína E exerce um papel muito importante na infectividade do DENV, pois é ela que se liga ao receptor específico que permitirá a invasão viral (69,71). Apresenta-se também como um forte imunógeno, capaz de induzir anticorpos com grande capacidade neutralizante, bloqueando a ligação da partícula viral às células alvo e a fusão das membranas, viral e endossômica, abortando assim o estabelecimento da infecção (69,71,72). Tem sido demonstrado que a reatividade cruzada de anticorpos e também de células T de memória estão envolvidas na patogênese da dengue (49,73–76). Essa proteína contém a maioria dos epítomos contra os quais são dirigidos anticorpos neutralizantes (45). Acredita-se que a resposta imune contra a proteína E seja responsável pelo desenvolvimento de uma proteção duradoura que é observada contra o mesmo sorotipo do vírus da dengue e também por uma proteção cruzada e de curta duração contra os outros sorotipos heterólogos (77).

Messer *et al.* (2014) propuseram que a região do EDI/II poderia ser alvo de anticorpos neutralizantes de longa duração sorotipo específico (78). Em outro estudo, ao mapear epítomos do EDI/II utilizando mAbs provenientes de pacientes infectados com DENV, foi observado que a maioria dos mAbs se ligaram à uma região conservada do “loop” de fusão do EDII. Porém, os mAbs que reconheceram essa região apresentaram baixa capacidade neutralizante contra o DENV (79).

O EDIII tem importância crucial na interação célula-vírus, por meio de sítios de ligação a receptores presentes na superfície de células do hospedeiro. Alguns epítomos localizados nessa região são capazes de induzir uma resposta de anticorpos neutralizantes subtipo específicos (51,77,80,81). Sendo assim, esse domínio tem sido considerado importante para as formulações vacinais e para a avaliação das respostas imunológicas humoral e celular (82,83).

Com base nas informações descritas acima, consideramos relevante estudar com maiores detalhes as características das repostas imunológicas humoral e celular contra a proteína E e seus domínios (EDI/II e EDIII), induzidas após o direcionamento destas porções para as DCs CD8 α ⁺DEC205⁺.

2 CONCLUSÃO

Baseados nos dados obtidos até o momento, podemos concluir que:

1. Os mAbs quiméricos contendo a proteína E ou seus diferentes domínios foram produzidos com sucesso e ligaram-se ao receptor DEC205 murino;
2. Os títulos de anticorpos anti-E, anti-EDI/II e anti-EDIII foram muito baixos ou inexistentes quando os animais foram imunizados com os mAbs quiméricos;
3. Imunização com o domínio EDIII recombinante induziu altos títulos de anticorpos anti-EDIII com capacidade neutralizante;
4. O direcionamento da proteína E inteira ou do EDIII induziu forte resposta celular provavelmente mediada por linfócitos T CD4⁺ contra peptídeos localizados na região do EDIII.

REFERÊNCIAS*

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

1. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142–62.
2. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015. p. 9–22.
3. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563–604.
4. Steinman R, Cohn Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974;139(2):380–97.
5. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. 1997. p. 10–6.
6. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(March):245–52.
7. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and t cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621–67.
8. Inaba K, Koide S, Steinman RM. Properties of memory T lymphocytes isolated from the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(22):7686–90.
9. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, *et al*. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001;194(6):769–79.
10. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):621–67.
11. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, *et al*. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* (80-). 2007;315(5808):107–11. [publication/doi/10.1126/science.1136080](https://doi.org/10.1126/science.1136080)

12. Shortman K, Liu Y. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):151–61.
13. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(1):19–30.
14. Asselin-Paturel C, Boonstra a, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol.* 2001;2(12):1144–50.
15. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;194(8):1171–8.
16. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, *et al.* Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med.* 1996;184(4):1413–24.
17. Heymann F, Holscher C, Dorsett Y, Wolf G, Kurts C, O'Connor RJ, *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med.* 2001;194(6):769–79.
18. Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, *et al.* The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med.* 2002;195(10):1289–302.
19. Allan RS, Smith CM, Belz GT, van Lint AL, Wakim LM, Heath WR, *et al.* Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science.* 2003;301(5641):1925–8.
20. Brocke T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med.* 1997;185(3):541–50.
21. Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, *et al.* The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med.* 1994;180(5):1849–60.
22. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001. p. 255–8.
23. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, *et al.* CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate

- along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood*. 1997;90(4):1458–70.
24. Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol*. 2012;13(9):817–22.
 25. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):77–84.
 26. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF-B. *Immunity*. 2007;26(5):605–16.
 27. Boscardin SB, Hafalla JCR, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, *et al*. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med*. 2006;203(3):599–606.
 28. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S-I, Soares H, *et al*. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *J Exp Med J Exp Med*. 2004;38151000(6):815–24.
 29. Amorim KNS, Rampazo E V., Antonialli R, Yamamoto MM, Rodrigues MM, Soares IS, *et al*. The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205+ dendritic cells. *Sci Rep*. 2016;6:39250.
 30. Henriques HR, Rampazo E V, Gonçalves AJS, Vicentin ECM, Amorim JH, Panatieri RH, *et al*. Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):233008648–903079.
 31. Rampazo E V., Amorim KNS, Yamamoto MM, Panatieri RH, Rodrigues MM, Boscardin SB. Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *PLoS One*. 2015;10(2).
 32. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major

- Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8⁺ T Cell Tolerance. *J Exp Med*. 2002;196(12):1627–38.
33. Trumfheller C, Finke JS, López CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, *et al*. Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med*. 2006;203(3):607–17.
 34. Cheong C, Choi JH, Vitale L, He LZ, Trumfheller C, Bozzacco L, *et al*. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood*. 2010;116(19):3828–38.
 35. World Health Organization (WHO). WHO | Dengue and severe dengue. Who. 2016.
 36. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al*. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7.
 37. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, *et al*. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8).
 38. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 3, 2016. *Bol Epidemiológico*. 2016;47(6):1–7.
 39. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, *et al*. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: A randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2012;380(9853):1559–67.
 40. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHM, Chotpitayasunondh T, Chua MN, *et al*. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: A phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014;384(9951):1358–65.
 41. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud Avançados*. 2008;22(64):53–72.

42. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:16055.
43. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480–96.
44. Guzman MG, Harris E. Dengue. In: *The Lancet.* 2015. p. 453–65.
45. Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007;30(5–6):329–40.
46. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2010. p. 2773–86.
47. Hadinegoro SRS. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified *Paediatr Int Child Health.* 2012;32(sup1):33–8.
48. Halstead SB, Udomsakdi S, Simasthien P, Singharaj P, Sukhavachana P, Nisalak A. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. *Yale J Biol Med.* 1970;42(5):261–75.
49. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses.* 2010;2(12):2649–62.
50. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology.* 2013. p. 1445–59.
51. Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Found Symp.* 2006;277:177-187-192, 251–3.
52. Lambrechts L, Lequime S. Evolutionary dynamics of dengue virus populations within the mosquito vector. *Current Opinion in Virology.* 2016. p. 47–53.
53. OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborio S, *et al.* Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics and Serotype-Specific Immunity. *Sci Transl Med* 2011;3(114):128.
54. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue

- viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005;79(2):853–9.
55. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine.* 2012. p. 4301–6.
 56. Li long, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, *et al.* The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science.* 2008;319(5871):1830–4.
 57. Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology Advances.* 2011. p. 239–47.
 58. Yu I, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, *et al.* Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science (80-).* 2008;319(5871):1834–7.
 59. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):6986–91.
 60. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev S V., Corver J, Lenches E, *et al.* Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002;108(5):717–25.
 61. Huang CYH, Butrapet S, Moss KJ, Childers T, Erb SM, Calvert AE, *et al.* The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. *Virology.* 2010;396(2):305–15.
 62. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):13–22.
 63. Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, *et al.* Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;20(1):105–10.
 64. Fibriansah G, Ng T-S, Kostyuchenko VA, Lee J, Lee S, Wang J, *et al.* Structural changes in dengue virus when exposed to a temperature of 37°C. *J Virol.* 2013;87(13):7585–92.
 65. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, *et al.* Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 2003;4(7):723–8.
 66. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, *et al.* Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus

- Infection in Humans. *Science* (80-). 2010;328(5979):745–8.
67. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature*. 2007;5(July):518–28.
 68. Klein DE, Choi JL, Harrison SC. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *J Virol*. 2013;87(4):2287–93.
 69. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427(6972):313–9.
 70. Modis Y. Relating structure to evolution in class II viral membrane fusion proteins. *Curr Opin Virol*. 2014;5(1):34–41.
 71. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Virology*. 2015. p. 498–507.
 72. Colman PM, Lawrence MC. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(4):309–19.
 73. Halstead SB, Rohanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(1):154–6.
 74. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):532–43.
 75. Park MS, Kim J II, Park S, Lee I, Park M-S. Original Antigenic Sin Response to RNA Viruses and Antiviral Immunity. *Immune Netw*. 2016;16(5):261–70.
 76. Flipse J, Smit JM. The Complexity of a dengue vaccine: A review of the human antibody response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015. p. 1–18.
 77. Mondotte JA, Lozach P-Y, Amara A, Gamarnik A V. Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. *J Virol*. 2007;81(13):7136–48.
 78. Messer WB, de Alwis R, Yount BL, Royal SR, Huynh JP, Smith SA, *et al*. Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(5):1939–44.
 79. Smith SA, de Alwis AR, Kose N, Harris E, Ibarra KD, Kahle KM, *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*. 2013;4(6).

80. Chen J, Wen K, Li XQ, Yi HS, Ding XX, Huang YF, *et al.* Functional properties of DENV EDIII-reactive antibodies in human DENV-1-infected sera and rabbit antiserum to EDIII. *Mol Med Rep.* 2016;14(2):1799–808.
81. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999;73(6):4738–47.