

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOLOGIA E
TOXICOLOGIA)
ÁREA DE FISIOPATOLOGIA

JÉSSICA COSTA NASCIMENTO

Análise do transcriptoma de diferentes tipos de células únicas do sangue periférico de pacientes infectados com o vírus da Dengue para detalhamento da massiva geração de células secretoras de anticorpos

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOLOGIA E
TOXICOLOGIA)
ÁREA DE FISIOPATOLOGIA

JÉSSICA COSTA NASCIMENTO

Análise do transcriptoma de diferentes tipos de células únicas do sangue periférico de pacientes infectados com o vírus da Dengue para detalhamento da massiva geração de células secretoras de anticorpos

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Fisiopatologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira

SÃO PAULO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

N244a	Nascimento, Jéssica Costa Análise do transcriptoma de diferentes tipos de células únicas do sangue periférico de pacientes infectados com o vírus da Dengue para detalhamento da massiva geração de células secretoras de anticorpos / Jéssica Costa Nascimento. - São Paulo, 2023. 70 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). Orientador: Silveira, Eduardo Lani Volpe 1. Dengue. 2. Células secretoras de anticorpos. 3. Triptofano. 4. Transcriptoma. 5. Bioinformática. I. T. II. Silveira, Eduardo Lani Volpe , orientador.
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Aos meus pais, Lúcia e Erundy.

Por serem minha base sólida,

Pelo tempo e dedicação,

Por acreditarem em mim,

Por serem quem são.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por tudo que tenho e por ter guiado meus caminhos até hoje.

Agradeço aos meus pais, por todo apoio que me deram desde o início da minha jornada, sempre acreditando e vendo o melhor em mim. Sem eles, a vida seria árdua e sem graça. Sem eles, esse trabalho não seria possível.

Agradeço aos amigos que fiz no laboratório, Lyvia, Karen, Isabelly, Gabriela, Pedro e Gustavo, pelas conversas, pelos momentos de descontração e pelos conselhos. Sem eles, esse trabalho teria sido solitário.

Agradeço à Karen pelos *scrips* compartilhados e por toda ajuda e suporte no desenvolvimento das análises desse trabalho.

Agradeço ao André por todo suporte no desenvolvimento desse trabalho, por ter compartilhado seu conhecimento e *expertises* em bioinformática, pelas reuniões esclarecedoras e conselhos.

Agradeço ao professor Helder e ao CSBL, por ter cedido espaço em seu laboratório e por todo auxílio que proporcionou para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço ao professor Eduardo pela oportunidade de ter trabalhado em seu laboratório e por tudo que aprendi no decorrer desses anos.

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

RESUMO

NASCIMENTO, J.C. Análise do transcriptoma de diferentes tipos de células únicas do sangue periférico de pacientes infectados com o vírus da Dengue para detalhamento da massiva geração de células secretoras de anticorpos. 2023. 70f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A Dengue induz uma resposta exacerbada e transitória das células secretoras de anticorpos (ASCs) no sangue de pacientes cerca de sete dias após o início dos sintomas. A frequência dessas ASCs chega a representar mais de 50% de todas as células B circulantes neste período. No entanto, ainda é desconhecido se a magnitude dessa resposta tem relação com a gravidade da Dengue. Nosso grupo de pesquisa já mostrou que a cultura de células nucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis com partículas do vírus da Dengue (DENV), por 7 dias, levava a diferenciação de células B em ASCs em magnitude similar àquelas estimuladas por mitógenos. Essas culturas apresentavam um consumo significativamente maior de triptofano (TRP), associado à maior expressão das enzimas IDO1 e IDO2, e, consequentemente, maior síntese de quinurenina (KYN) em relação ao estímulo por mitógenos. Considerando que as concentrações de TRP e KYN detectadas nos sobrenadantes dessas culturas eram diretamente proporcionais ao aumento de ASCs, decidimos investigar o papel desse metabolismo do TRP e de seus respectivos metabólitos na diferenciação das ASCs. Para isso, análises do transcriptoma público de células únicas do sangue periférico de pacientes com Dengue (estudo E-MTAB-9467) foram realizadas para inferir a real participação do metabolismo do TRP na geração de ASCs. Com o programa R foram executadas análises de *Downstream*. Identificamos um aumento massivo das ASCs nas amostras dos pacientes infectados com Dengue. No entanto, os principais genes desencadeadores da ativação do metabolismo do TRP (IDO1 e IDO2) não foram expressos nas subpopulações de células B, mas sim em células dendríticas e monócitos CD14+ respectivamente. Isso sugeriria que esta via não seria ativada nos linfócitos B. Por outro lado, genes codificadores de outros participantes da via do TRP (HSD17B10, ECHS1 e SIRT3) foram detectados em células B e podem estar relacionados com a proliferação das ASCs. Além disso, a análise de enriquecimento mostrou uma aumentada expressão de genes associados com moléculas de MHC de classe II em plasmablastos e plasmócitos de pacientes com Dengue. Porém, com a expressão aumentada de ENTPD1 nessas células durante a fase sintomatológica, nossos dados sugerem também que um eventual papel de plasmablastos e plasmócitos como apresentadoras de antígenos na Dengue poderia induzir uma resposta supressora de células T.

Palavras-chaves: plasmablastos, plasmócitos, Dengue, MHC II, triptofano.

ABSTRACT

NASCIMENTO, J.C. Evaluation of the tryptophan metabolism in the massive generation of antibody-secreting cells in Dengue patients through the transcriptome of single blood cells. 2023. 70p. Dissertation (Master) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Dengue can cause an exacerbated and transient antibody-secreting cell (ASC) response in the blood of patients nearly 7 days of symptomatology. The ASC frequency reaches more than 50% of all circulating B cells during that period. However, it is still unknown whether the magnitude of this response may be directly related to the severity of Dengue. Our research group has already shown that the culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals with Dengue virus (DENV) particles for 7 days led to a differentiation of B cells into ASCs to a magnitude similar to those stimulated by mitogens. These cultures showed significantly higher consumption of tryptophan (TRP), associated with higher expression of enzymes IDO1 and IDO2, and consequently, higher synthesis of quinurenine (KYN) compared to mitogen stimulation. The concentrations of TRP and KYN detected in the supernatants of these cultures were directly proportional to ASC frequency increase. Thus, we have decided to investigate the role of TRP metabolism and its respective metabolites in ASC differentiation. For this, we performed an analysis of single-cell transcriptome with peripheral blood from Dengue patients (dataset from E-MTAB-9467 study). Downstream analyses were performed with R software. Corroborating with literature, we identified a massive increase in ASC frequency of Dengue infected patients. However, the main genes triggering TRP metabolism activation (IDO1 and IDO2) were not expressed in B-cell subsets, but in dendritic cells and CD14+ monocytes, respectively. This would suggest that this pathway would not be activated in B lymphocytes. Nevertheless, genes encoding other participants in the TRP pathway (HSD17B10, ECHS1, and SIRT3) were detected in B cells and may be related to ASC proliferation. Furthermore, a Gene Ontology analysis showed an increased expression of genes associated with MHC class II molecules in plasmablasts and plasma cells of Dengue patients. As these cells also presented an increased expression of ENTPD1 during the symptomatic phase, our data suggest a potential role of plasmablasts and plasma cells as antigen-presenting cells associated with a suppressive T cell response in Dengue.

Keywords: plasmablasts, plasma cells, Dengue, MHC II, tryptophan.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Aumento de infecção dependente de anticorpo, do inglês <i>Antibody-Dependent Enhancement of infection</i>
ASC	Células secretoras de anticorpos, do inglês <i>Antibody-Secreting Cells</i>
BCR	Receptor de célula B, do inglês <i>B cell receptor</i>
DC	Células Dendríticas, do inglês <i>Dendritic Cells</i>
DEG	Gene diferencialmente expresso, do inglês <i>Differentially Expressed Genes</i>
DENV	Vírus da Dengue
ELISA	Ensaio imuno-enzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i> – plataforma online do NCBI contendo dados públicos de transcriptomas
IDO	Enzima indoleamina- 2,3-dioxigenase
Ig	Imunoglobulina
KYN	Quinurenina
nAbs	Anticorpos neutralizantes, do inglês <i>Neutralizing Antibodies</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , do inglês Banco de dados genômico
NK	Células <i>natural killer</i>
proteína E	Proteína estrutural do envelope do DENV
proteína M	Proteína estrutural da membrana do DENV
proteína NS1	Proteína não estrutural 1 do DENV
proteína NS2A	Proteína não estrutural 2a do DENV
proteína NS2B	Proteína não estrutural 2b do DENV
proteína NS3	Proteína não estrutural 3 do DENV
proteína NS4S	Proteína não estrutural 4a do DENV
proteína NS4B	Proteína não estrutural 4b do DENV
proteína NS5	Proteína não estrutural 5 do DENV

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PC	Componentes Principais, do inglês <i>Principal Components</i>
PCA	Análise de componentes Principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PrM	Precursor de membrana do DENV
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
SCD	Síndrome do choque da Dengue
SVS	Secretaria de vigilância em saúde
TRP	Triptofano
UMAP	Aproximação e projeção <i>de variedade</i> uniforme, do inglês <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos indivíduos do estudo E-MTAB-9464	36
Tabela 2 - Genes das vias do TRP	41
Tabela 3 - Genes diferencialmente expressos (<i>DEGs</i>) regulados positivamente ..	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global do risco de infecção pela Dengue em 2022.....	20
Figura 2 - Distribuição da taxa de incidência e óbitos de Dengue	21
Figura 3 - Representação esquemática do genoma do vírus da Dengue	23
Figura 4 - Processo de invasão celular e replicação do vírus da Dengue	25
Figura 5 - Diferenciação e maturação dos linfócitos B.....	27
Figura 6 - Vias de degradação do TRP	32
Figura 7 - Esquema de delineamento experimental	38
Figura 8 - <i>QC metrics</i>	39
Figura 9 - Correlação de Pearson	40
Figura 10 - Anotação do UMAP Total.....	44
Figura 11 - UMAP de subpopulações de células B	45
Figura 12 - UMAP Severidade	46
Figura 13 - Frequência celular em relação aos dias de infecção	47
Figura 14 - Expressão dos genes das vias do TRP em diferentes subpopulações de células B no decorrer dos dias do estabelecimento da Dengue e pós sintomatologia	50
Figura 15 - Expressão dos genes alterados para melhor visualização	54
Figura 16 - Expressão dos genes das vias do TRP para as subpopulações de PBMC Total	55
Figura 17 - Diferença quantitativa de plasmablastos comparados aos plasmócitos durante o período sintomatológico	57
Figura 18 - Diagrama de <i>Venn</i> dos genes diferencialmente expressos	58
Figura 19 - Análise de Enriquecimento	60-61
Figura 20 – Plasmablastos e plasmócitos derivados da Dengue moderada e grave apresentam perfil supressores	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	DENGUE	19
1.2	O VÍRUS DA DENGUE E SEU CICLO	23
1.3	DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS B E ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL PELO DENV	25
1.4	EXPANSÃO DAS CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICORPOS	29
1.5	METABOLISMO DO TRIPTOFANO	31
2	OBJETIVO GERAL	35
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	SELEÇÃO DO <i>DATASET</i> DE TRANSCRIPTOMA	36
3.2	ANÁLISE DE <i>SINGLE-CELL RNA-seq</i>	37
3.2.1	Pré-processamento dos dados	38
3.2.2	Clusterização, anotação e integração dos dados	40
3.2.3	Análise de expressão dos genes do metabolismo do TRP	41
3.2.4	Análise de <i>DEGs</i>	42
3.2.5	Análise de enriquecimento	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1	REDEFINIÇÃO DO <i>DATASET</i>	43
4.2	ANOTAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS B	43
4.3	PROPORÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS B	46
4.4	SELEÇÃO DOS GENES DO TRIPTOFANO	49
4.5	ANÁLISE DOS GENES DO TRP	49
4.6	ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	56
4.7	ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO	59
4.8	ANÁLISE FUNCIONAL DE PLASMABLASTOS E PLASMÓCITOS DE PACIENTES COM DENGUE MODERADA OU GRAVE	61
5	CONCLUSÃO	63
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE

A Dengue é uma infecção viral sistêmica que tem como agente etiológico o vírus da Dengue (DENV), pertencente à família *Flaviviridae*. Ele é transmitido aos humanos através da picada de mosquitos fêmeas infectados do gênero *Aedes* (UNO; ROSS, 2018). Após um período de incubação de 4-8 dias, esse vírus pode induzir uma série de condições no paciente (KHETARPAL; KHANNA, 2016). Mais especificamente, a infecção por qualquer um dos 4 diferentes sorotipos do DENV (DENV-1 a 4) pode resultar tanto em formas assintomáticas, quanto em formas que variam de moderada a grave, podendo esta última levar o paciente à morte (WHO, 2009). A Dengue moderada ou Clássica (*Dengue Fever*) é caracterizada por apresentar sintomas como dor de cabeça, febre, dor de estômago, erupções cutâneas, *rash* cutâneo, petéquias, mialgia e artralgia. Já a Dengue grave pode ser classificada de duas formas: Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD), as quais apresentam os sintomas de trombocitopenia, extravasamento vascular e hipotensão. Tanto a FHD quanto a SCD podem ser fatais, devido, respectivamente, à hemorragia interna e ao choque sistêmico que causam ao indivíduo (BÄCK; LUNDKVIST, 2013).

Ainda, a Dengue é a arbovirose de maior relevância para a saúde pública mundial (VIEIRA et al., 2019) devido ao enorme número de casos, gravidade da doença e aumento de sua extensão geográfica a partir do período de sua identificação (GUZMAN; HARRIS, 2015). Endêmica em mais de 100 países tropicais e subtropicais do globo (BHATT et al., 2013), estima-se que aproximadamente 3,6 bilhões de pessoas vivam atualmente em áreas de risco de infecção. Anualmente, cerca de 390 milhões são infectadas, e apenas 1/4 delas seriam sintomáticas. Destas últimas, 2 milhões podem apresentar a forma grave da doença, culminando em cerca de 21.000 casos fatais por ano no mundo (Figura 1; MURUGESAN; MANOHARAN, 2020). Dentre os países com maior taxa de incidência de Dengue, destaca-se o Brasil (Figura 1).

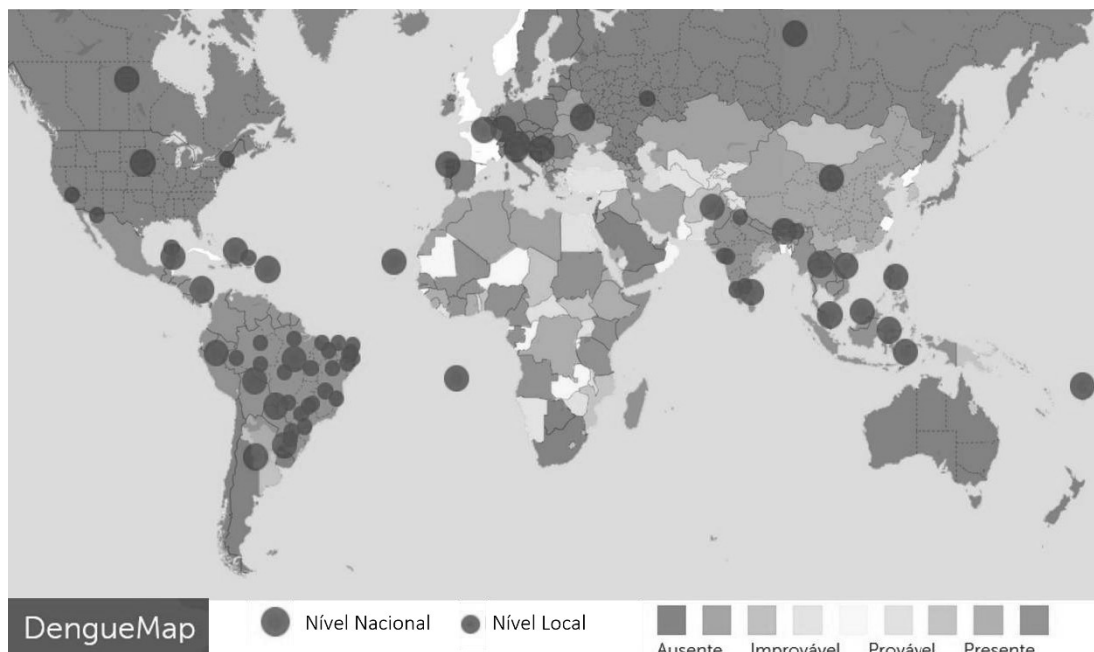


Figura 1 - Distribuição global do risco de infecção pela Dengue em 2022. A escala de cor representa as áreas de risco, do azul escuro (ausente) até o vermelho (presente). O mapa é criado baseado em um compilado de diferentes fontes, incluindo relatórios, literatura, sistemas nacionais de vigilância, entre outros. Os círculos em vermelho representam os relatórios recentes de casos Nacionais (círculo maior) ou Locais (círculo menor) obtidos através de dados oficiais. Fonte: HEALTHMAP¹ (2022).

No Brasil, foi registrado um aumento de 30% no número de casos suspeitos de Dengue em 2023, até o final de abril, em comparação com o mesmo período de 2022 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). As regiões geográficas mais afetadas foram o Sul, Sudeste e Centro-Oeste e os estados com os maiores índices de incidência são Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Rondônia (Figura 2). A Região Sudeste concentrou a maioria dos casos graves e com sinais de alarme, bem como os óbitos confirmados. É importante destacar que os quatro sorotipos virais (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) estão em circulação no Brasil, com predominância do DENV1. O número de casos suspeitos de Dengue no Brasil em 2023 ultrapassou o limite máximo esperado, considerando a série histórica (Figura 2; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

¹ (<https://www.healthmap.org/Dengue/pt/>)

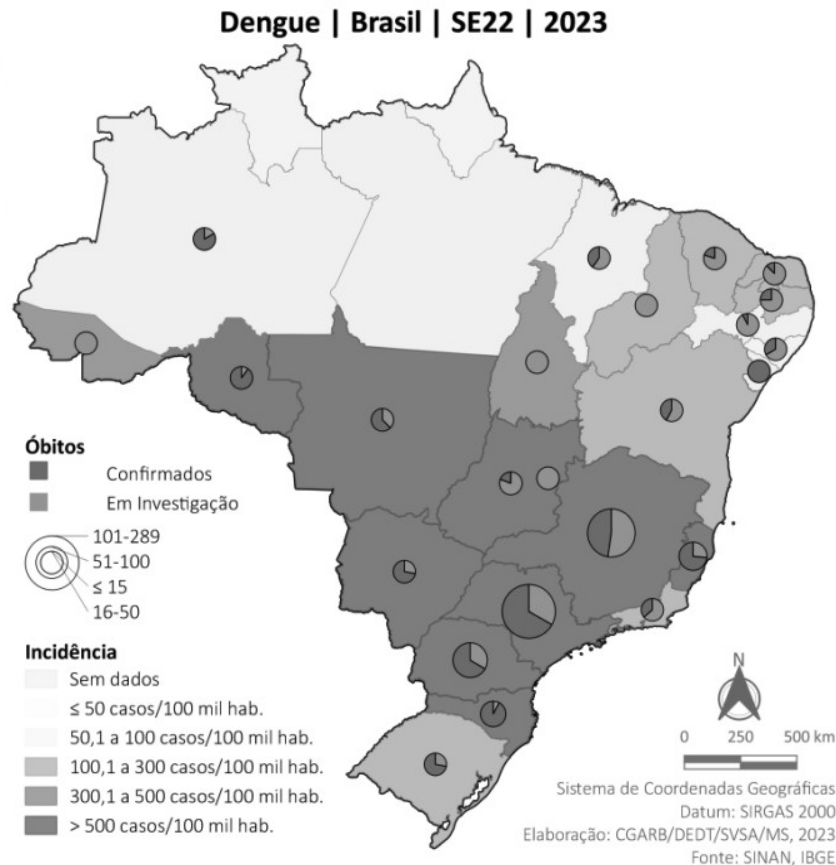


Figura 2 - Distribuição da taxa de incidência e óbitos de Dengue. As regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste apresentaram as maiores taxas de incidência de Dengue, com mais de 500 casos/100 mil habitantes, seguida das regiões Nordeste e Norte com taxas mais baixas. As informações são referentes às notificações ocorridas na Semana Epidemiológica 22 (SE 22), de junho de 2023, disponibilizadas no SINAN online².

Com a atual situação epidemiológica do Brasil, torna-se necessário a busca por medidas para prevenir que as pessoas sejam infectadas e combater o vírus. Desta forma, a vacinação é uma das principais estratégias para o combate da Dengue. A primeira vacina liberada pela ANVISA foi a Dengvaxia em 2015, e mesmo com isso, ainda houve um aumento significativo dos casos de Dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Isto pode ser explicado devido a algumas características desta vacina, como a restrição de idade (liberada para pessoas entre 9-45 anos), por não ser recomendada para quem não teve contato com o vírus da Dengue, e por ser distribuída apenas no mercado privado com um alto preço (PAZ-BAILEY, 2021). Além disso, estudos do próprio fabricante indicam algumas contraindicações da vacina. Por exemplo, indivíduos soronegativos vacinados, em longo prazo, têm maior propensão de desenvolver a forma grave da doença quando infectados. Desta forma, a vacina é

² (<https://www.gov.br/saude/pt-br/search?SearchableText=informe-semanal-coe-arboviroses-07-06>)

indicada para indivíduos de 9 a 45 anos com infecção prévia por qualquer sorotipo do DENV e seu esquema de administração consiste em três doses, que devem ser intercaladas num intervalo de 6 meses (PAZ-BAILEY, 2021).

Recentemente, a ANVISA aprovou a comercialização de uma nova vacina no Brasil, a Qdenga, produzida pela empresa Takeda Pharma Ltda. Essa é uma vacina tetravalente atenuada, composta por quatro diferentes sorotipos do vírus causador da doença, ou seja, visa proteção contra os quatro sorotipos do DENV e apresenta eficácia global de 80,2% (“Anvisa aprova nova vacina para a Dengue”, [s.d.]). A Qdenga não possui contraindicações e não aumenta o risco de o paciente desenvolver Dengue grave, diminuindo o risco de hospitalização (ANGELIN et al., 2023). É liberada para pessoas entre 4-60 anos, tanto soronegativas como soropositivas para Dengue, e seu regime de vacinação consiste em duas doses aplicadas a cada 3 meses (ANGELIN et al., 2023).

A empresa Novartis também possui uma formulação vacinal contra a Dengue, ainda em estudo, que vem sendo desenvolvida há mais de dez anos pelo Instituto Butantan em parceria com o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (NIAID). Nas fases iniciais clínicas, ela apresentou imunogenicidade superior a 90% e 100% para aqueles indivíduos que já tiveram Dengue (RUSSELL et al., 2022). É uma vacina tetravalente feita a partir de partículas atenuadas dos 4 sorotipos do DENV. Seu uso também visa proteger a população contra todos os sorotipos da doença. Atualmente na fase clínica 3, há uma projeção de seu estudo ser finalizado até 2024 (RUSSELL et al., 2022). Com a eventual liberação desta vacina, juntamente com a comercialização da Qdenga, é possível que o Brasil diminua, finalmente, o número de casos nos próximos anos a partir de investimentos por parte do governo federal em campanhas de vacinação.

Outra estratégia para combater a disseminação da Dengue é o uso de inseticidas para erradicar as formas imatura e adulta dos mosquitos *Aedes*. Uma outra forma, bem menos agressiva, inclusive ao meio ambiente, é não deixar água parada em vasos, pneus etc. As áreas escolhidas para o combate ao mosquito são principalmente ambientes urbanos com alto crescimento demográfico, em condições precárias de saneamento e com temperaturas elevadas, propiciando uma maior taxa de proliferação do vetor da Dengue (CARMO et al., [s.d.]; MENDONÇA; SOUZA; DUTRA, 2009).

1.2 O VÍRUS DA DENGUE E SEU CICLO

Pertencente à família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*, o DENV caracteriza-se por ser pequeno e esférico (cerca de 50 nm de diâmetro), envelopado e com um genoma de RNA fita simples. Este genoma codifica uma poliproteína que posteriormente é clivada em três proteínas estruturais: o capsídeo, a pré-membrana (ou precursor de membrana - PrM) e o envelope (E, de vital importância para a ligação e entrada na célula hospedeira); e outras sete proteínas não estruturais que auxiliam na replicação, montagem viral e evasão da resposta imune do hospedeiro, além da replicação do RNA viral: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 3; revisado por BÜRGER, 2018; revisado por KATO; HISHIKI, 2016).

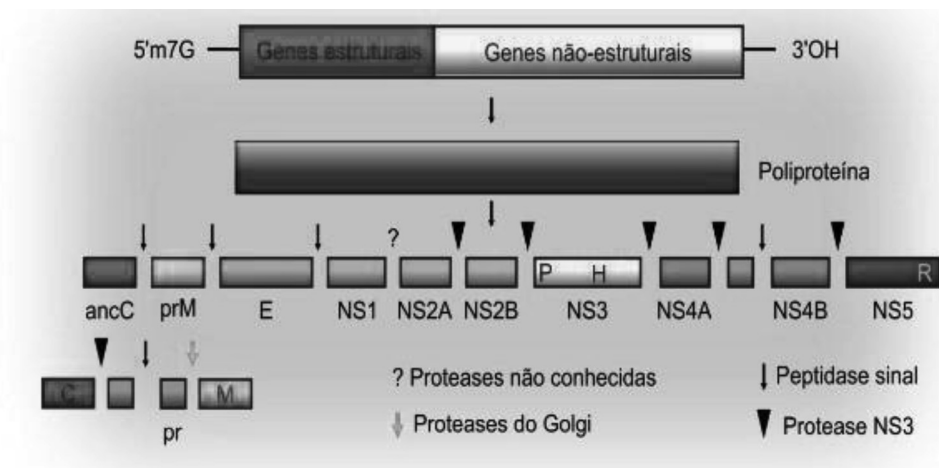


Figura 3 - Representação esquemática do genoma do vírus da Dengue. A abreviação 5'm7G significa que o vírus possui um grupamento 7-metil-guanosina (ribonucleotídeo de guanina metilada) na região 5', enquanto a 3'OH significa que não apresenta cauda poli-A na região 3'. Os genes são traduzidos pela poliproteína e as abreviações C, E, prM e NS indicam os genes que codificam para as proteínas do Capsídeo (C), Envelope viral (E) e pré-membrana (M). NS - proteínas não estruturais: NS1 é a glicoproteína responsável pela replicação do RNA viral; NS2A e NS2B são polipeptídeos hidrofóbicos clivados por proteases virais; NS3 tem a propriedade de uma serino-protease, sendo o NS2B seu co-fator, é necessária para a replicação do RNA através de seu domínio intermediário, além de ter atividade RNA trifosfatase no domínio C-terminal; NS4A e NS4B são polipeptídeos hidrofóbicos associados a membrana; e NS5 tem função de RNA polimerase RNA-dependente (Puig-BasAgoiti et al., 2006). Figura adaptada de AMARAL, 2012.

Para que o vírus possa adentrar no hospedeiro e infectar suas células, ele depende primeiramente que seu vetor, a fêmea do mosquito *Aedes*, pique o indivíduo e libere as partículas virais na derme do hospedeiro. Com a disseminação através da corrente sanguínea, estas partículas podem infectar diferentes órgãos e replicar-se

em muitos tipos celulares, sendo as populações de células dendríticas as primeiras a serem infectadas, seguidas pelos monócitos e macrófagos (HIDARI; SUZUKI, 2011). Ressalta-se também que linfócitos T e B também podem ser infectados, tanto em cultura de células, como in vivo (SILVEIRA et al., 2018; YAM-PUC, 2015). Contudo, as partículas virais liberadas por linfócitos B não se mostraram funcionais após infecção (CORREA et al., 2015; TAKAHASHI; SUZUKI, 2017).

Para que haja a entrada do vírus na célula do hospedeiro, partículas virais maduras se acoplam à superfície das células através da ligação da proteína do envelope (E) com diversos possíveis receptores celulares. Ainda, moléculas de carboidratos, como as glicosaminoglicanas (GAGs) e os glicoesfingolípídeos (GSL) podem atuar como co-receptores; proteínas lectinas, expressas de células dendríticas a macrófagos, atuam como receptores em determinados casos; o receptor CD14-associado a proteínas aparentam estar envolvidos (BEGUM et al., 2019; HIDARI; SUZUKI, 2011); receptores Fc, expressos em leucócitos, que juntamente com a presença de anticorpos não neutralizantes também facilitam a entrada do vírus na célula. Normalmente, a entrada de partículas virais dentro das células alvo ocorre por endocitose (TAKAHASHI; SUZUKI, 2017). Uma vez dentro de suas células alvo, as partículas virais dão início ao ciclo de replicação viral (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

Dentro do endossomo, a partícula viral induz uma mudança no pH do meio que facilita o rearranjo da proteína E viral que se funde com a membrana do endossomo, liberando o nucleocapsídeo dentro do citoplasma da célula. Assim, o RNA viral é exposto e fica disponível para a replicação viral, se associando ao retículo endoplasmático rugoso (RER), onde ocorre a tradução da proteína viral. Em seguida, ocorre a montagem dos vírions em associação com as membranas intracelulares e um nucleocapsídeo é formado novamente. No momento que são dirigidos ao lúmen do RER, estes vírions adquirem a proteína E. Juntamente com a proteína prM, elas duas são sintetizadas e permanecem integradas às membranas do RER (RODENHUIS-ZYBERT, 2010; KATO; HISHIKI, 2016). Após as subunidades de proteína prM recobrirem os peptídeos de fusão do topo das subunidades da proteína E, elas são transportadas até o complexo de Golgi, onde irão maturar devido a redução do pH que força uma mudança conformacional irreversível nas proteínas prM e E (ROY; BHATTACHARJEE, 2021). Em seguida, estas proteínas são clivadas pela protease furina, liberando a proteína M. Em decorrência da clivagem, ocorre uma

desorganização do heterotrímero, permitindo a reorganização de E em homodímeros que formam a superfície das partículas virais maduras. Depois, estas são liberadas da célula por exocitose, podendo infectar novas células (Figura 4; SCREATON et al., 2015).

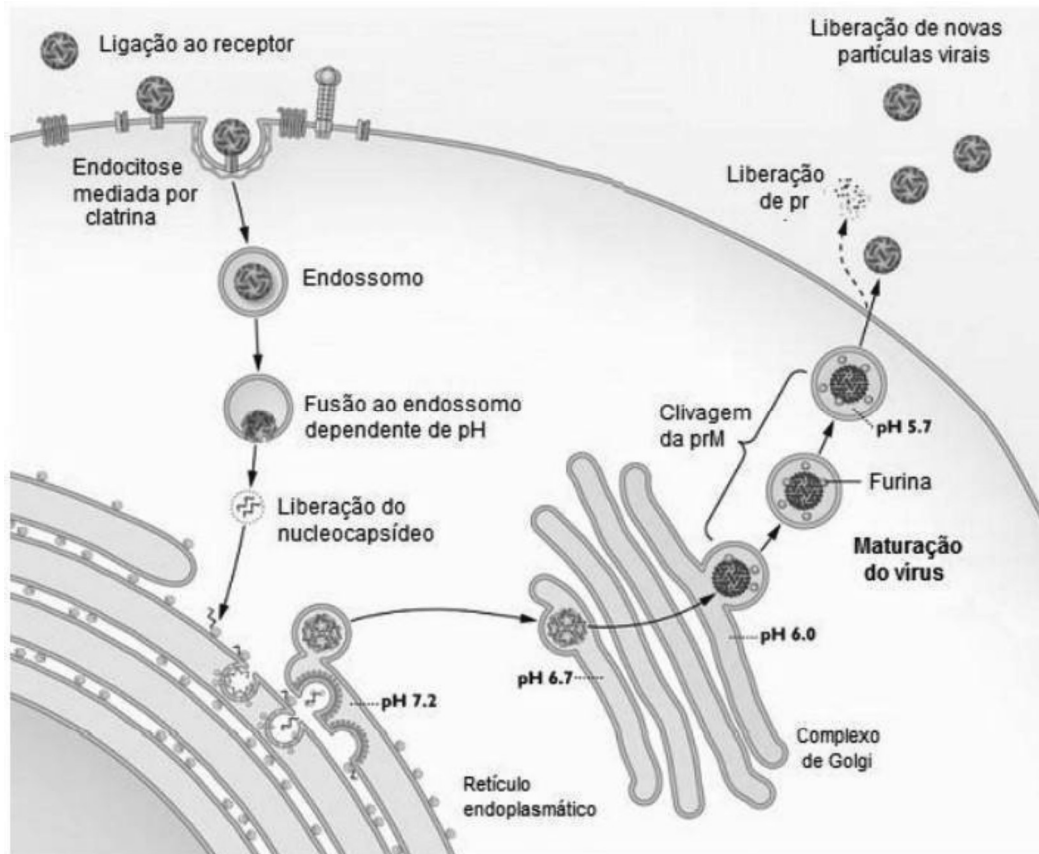


Figura 4 - Processo de invasão celular e replicação do vírus da Dengue. Na ilustração acima destacam-se as etapas de invasão e replicação do DENV dentro da célula hospedeira. O vírus liga-se ao receptor, sendo endocitado. Com a mudança de pH dentro do endossomo, ocorre a fusão da membrana do endossomo com as proteínas do envoltório viral, seguida da liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula. O RNA viral é liberado do nucleocapsídeo, adentrando no REM, onde ele é replicado e traduzido. Vírions imaturos são liberados até o complexo de Golgi onde ocorre a maturação das proteínas prM e E. Ao sair do Complexo de Golgi, ocorre a reorganização das proteínas de membrana, através da clivagem de prM levando a maturação do vírus, e, finalmente, a célula libera, por exocitose, novas partículas virais maduras. Modificada de PIERSON (2020).

1.3 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS B E ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL PELO DENV

Durante uma infecção viral, mesmo aguda, como a do DENV, a resposta humoral é fundamental para o *clearance* do patógeno, fazendo com que as células B,

responsáveis pela geração e liberação de anticorpos, tenham similar relevância. Células B também desempenham os papéis de apresentadoras de antígenos, moduladoras da diferenciação de células T e produtoras de citocinas regulatórias e pró-inflamatórias (SANZ et al., 2019).

As etapas de desenvolvimento das células B são controladas pela expressão dos receptores de célula B (BCR) e se iniciam na medula óssea com células troncos hematopoiéticas de origem linfóide como progenitoras iniciais (CLPs). Durante a diferenciação das CLPs em células pró B (Pró B), ocorrem rearranjos na cadeia pesada das imunoglobulinas (Ig) que se iniciam com a recombinação de fragmentos D-J dos BCRs (YAM-PUC et al., 2018). Em seguida, ocorre a recombinação de um fragmento V com o DJ, alterando o fenótipo da célula para Pró B grande que produz a proteína funcional da cadeia pesada $Ig\mu$. A ligação da cadeia pesada às cadeias leves das Igs e ao dímero $Ig\alpha/\beta$, formam o receptor pré-BCR que é expresso na superfície celular (ROGHANIAN; NEWMAN, 2016). A ativação do receptor pré-BCR desencadeia um processo de intensa proliferação e diferenciação, culmina na formação das células Pró B pequenas que passam por um rearranjo de fragmentos V-J na cadeia leve das Ig. Com isso, é produzido um BCR funcional, expresso como IgM, na superfície das células B imaturas (YAM-PUC et al., 2018). Em seguida, as células B imaturas passam por diferentes estágios de diferenciação, expressando IgD e IgM e BCR funcional em sua superfície celular, sendo chamadas de células B transitórias, que migram para o baço, onde se diferenciam em células B transitórias T1 e T2, que se tornarão células B maduras de vida longa localizadas nos folículos (FO) ou na zona marginal (MZ) (ROGHANIAN; NEWMAN, 2016).

Da medula óssea, as células B transitórias também podem migrar diretamente para o sangue periférico, se diferenciando em células B maduras (Naive), expressando em sua superfície IgM e IgD (GARIMALLA et al., 2019; SANZ et al., 2019). Estas células B Naive circulam entre os folículos linfóides dos linfonodos e baço e de volta ao sangue periférico. Ao entrarem em contato com um antígeno, elas são ativadas e migram para um órgão linfóide secundário, onde formam uma estrutura conhecida como folículo de células B. Esta estrutura faz parte do centro germinativo, onde ocorre a proliferação e diferenciação de células B ativadas em células B de memória ou em plasmablastos (Figura 5; VICTORA; MESIN, 2014). Simultaneamente, são geradas mutações nos genes das Igs (MEYER-HERMANN et al., 2012; VICTORA; NUSSENZWEIG, 2012), característica esta que resulta no aumento da

afinidade dos BCRs contra o antígeno específico (CARSETTI et al., 2022). Alguns genes são utilizados como marcadores para distinguir as diferentes subpopulações de célula B derivadas desses estágios de desenvolvimento (CARSETTI et al., 2022). Por exemplo, o gene PAX5 é expresso majoritariamente nos estágios iniciais das linhagens de células B, mas não nos estágios finais; já os genes BLIMP-1 (ou PRDM-1) e Xbp-1, são normalmente ativados após a diferenciação de células B em plasmablastos (SANZ et al., 2019).

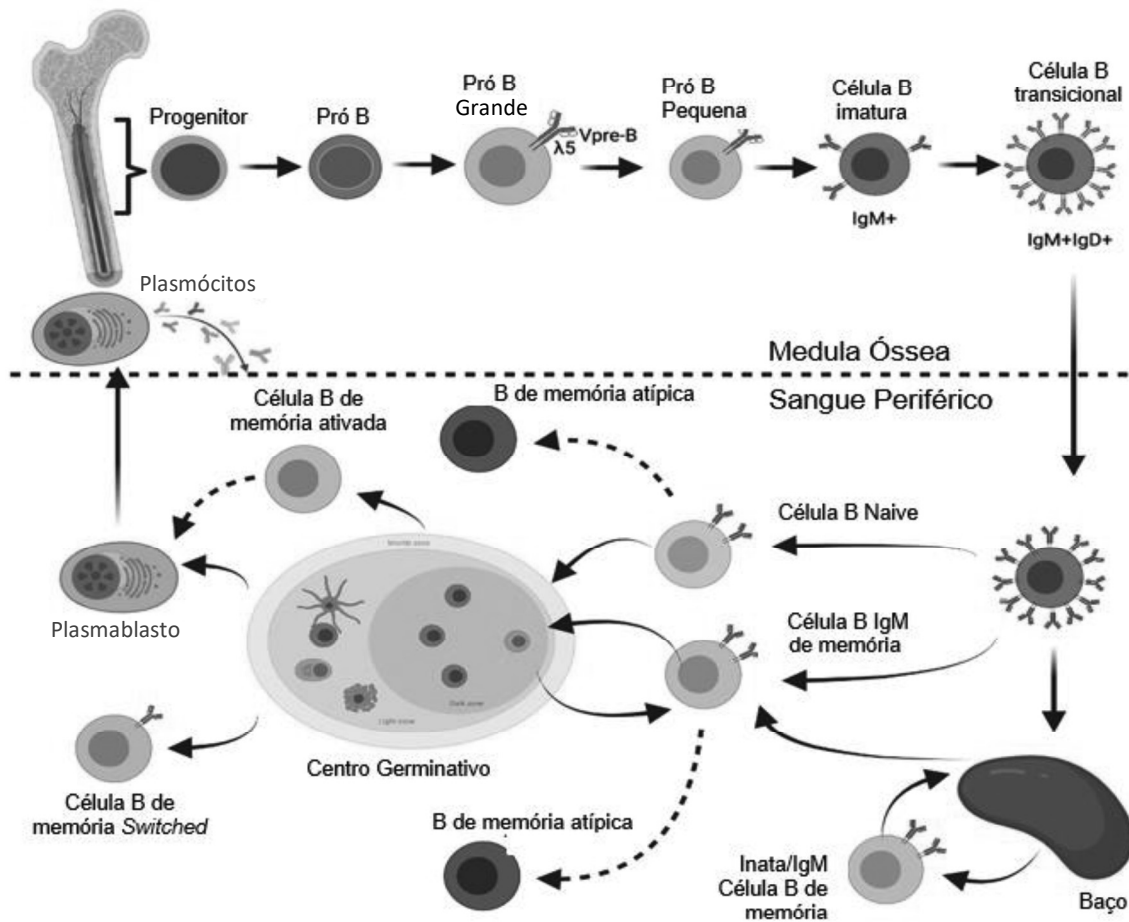


Figura 5 - Diferenciação e maturação dos linfócitos B. Esquema do desenvolvimento e maturação das células B. O esquema é dividido pela parte superior (medula óssea), onde são geradas as células B transitórias; e pela parte inferior (sangue periférico), onde as células B maduras (naive) migram para os órgãos linfoides secundários (baço, linfonodos, MALTs, GALTs, etc), formando parte do centro germinativo. Ali, ocorre o processo de hipermutação somática que culmina no aumento da especificidade dos anticorpos. Ao serem ativadas pelo antígeno específico, as células com BCRs de alta afinidade aos antígenos do patógeno podem ser diferenciadas em plasmablastos ou em células B de memória. Os plasmablastos tendem a migrar principalmente para a medula óssea, onde se diferenciarão em plasmócitos de vida longa, secretando anticorpos detectados primariamente no soro por um grande período. Modificada de CARSETTI et al., 2022.

Com relação às funções dos anticorpos, eles podem controlar a infecção viral, bloqueando a interação do vírus com a células hospedeiras, no chamado processo de neutralização (WAHALA; SILVA, 2011). Em um primeiro contato com o vírus, na infecção primária, os principais alvos dos anticorpos são as proteínas estruturais E, prM e C, além da proteína NS3 (revisado por BONEZI et al, 2020; ROTHMAN, 2011). Os anticorpos gerados após a infecção podem proteger o indivíduo contra diferentes sorotipos do DENV. Inclusive, anticorpos neutralizantes (nAbs) contra os 4 sorotipos da Dengue já foram gerados contra diferentes epítomos de E (DEJNIRATTISAI et al., 2015; ROBINSON et al., 2015). Por outro lado, o indivíduo que for novamente infectado por um sorotipo diferente daquela primeira exposição, possui anticorpos específicos ao primeiro sorotipo e, mesmo assim, pode apresentar formas graves de FHD e SCD. Uma das explicações para essas diferentes condições é que, na infecção secundária, o sistema imune é ativado para lidar com ambos os sorotipos. Novas células B Naive precisam ser ativadas contra o novo sorotipo de DENV para proliferarem e se diferenciarem em ASCs secretoras de anticorpos de alta afinidade. Enquanto isso ocorre, as células B de memória, geradas na primeira infecção, são mais rapidamente ativadas e se diferenciam em maior número de ASCs. Estas últimas secretam altos títulos de anticorpos de baixa afinidade contra o sorotipo da infecção anterior (imunidade cruzada). Logo, os anticorpos de baixa afinidade reagem contra partículas do novo sorotipo viral, formando imunocomplexos, reconhecidos através de receptores Fc expressos majoritariamente por macrófagos. Em seguida, estes imunocomplexos conjugados com receptores Fc são internalizados por endossomos. Após a alteração do pH no endossomo e fusão do envelope viral com a membrana da organela celular, o nucleocapsídeo viral escapa para o citoplasma, onde acessam o REM para se replicar. Como consequência, há um aumento significativo da carga viral dependente dos anticorpos (ADE), e um maior número de células é infectada, gerando uma infecção de maior proporção que é associada à uma doença mais grave (ADAM et al., 2021; ST. JOHN; RATHORE, 2019)

1.4 EXPANSÃO DAS CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICORPOS

Uma característica curiosa que ocorre com as populações de células B quando o indivíduo é infectado pelo DENV, assim como para as de outros vírus (Febre Amarela, Hantavírus e SARS-CoV2) (HEPOJOKI et al., 2021; VARNAITÉ et al., 2020), é a massiva resposta celular que suporta a produção de anticorpos. Pacientes infectados pelo DENV apresentam, transitoriamente, um significativo aumento na frequência de células secretoras de anticorpos (ASCs, do inglês *antibody-secreting cells*) na circulação próximo de 7 dias do surgimento dos sintomas (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012). Embora esta resposta coincida com o período de tempo que os sintomas mais graves são observados (WRAMMERT et al., 2012), ainda não se sabe se essa expansão celular tem qualquer participação na patogenicidade da doença. Ainda, é sabido que a grande maioria dessas ASCs é específica a epítomos do envelope do DENV (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012). Além disso, a grande maioria das ASCs que participam da expansão celular são caracterizadas como secretoras de IgG ou de IgA (KORAKA, 2001; VAZQUEZ, 2014; BACHAL, 2015; ZHAO, 2016; WAICKMAN, 2020). Devido à ativação de células B de memória por reatividade cruzada entre os sorotipos de DENV (PRIYAMVADA et al., 2016), a expansão das ASCs é ainda maior em infecções secundárias (THAI et al., 2011), as quais estão diretamente associadas às formas mais graves da doença (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013). Curiosamente, pacientes que apresentam Dengue grave também apresentam uma resposta de maior magnitude de ASCs específicas ao vírus que os pacientes com Dengue moderada (THAI et al., 2011).

Outro ponto que permanece pouco compreendido nesse cenário é o motivo pelo qual a infecção pelo DENV induz uma resposta tão alta de ASCs *in vivo*. Enquanto a presença destas células no sangue periférico representa menos de 1% das células B circulantes em indivíduos normais, ela corresponde a mais de 50% de todas as células B detectadas no sangue de pacientes com Dengue. Essa representatividade é muito maior que as observadas após a vacinação completa com as formulações específicas para os vírus da febre amarela ou influenza que atingem 10% em média (WRAMMERT et al., 2012). Relatos de casos demonstram que infecções pelo DENV induzem uma frequência de ASCs tão elevada que assemelham-se à uma leucemia plasmocitária (GAWOSKI & OOI, 2003; THAI et al.,

2011) ou mieloma, onde as ASCs correspondem a, pelo menos, 20% das células B circulantes (KOSMO; GALE, 1987). Considerando que a infecção pelo DENV causa tanto alterações genéticas (LOKE et al., 2010; POPPER et al., 2012), epigenéticas (GOMES et al., 2016; HAPUGASWATTA et al., 2020) e metabólicas (BECERRA et al., 2009; JORDAN; RANDALL, 2016) nas mais diversas células do hospedeiro, é possível que múltiplos mecanismos estejam envolvidos na massiva expansão de ASCs vista durante esta doença.

Recentemente, nosso grupo começou a investigar a razão desta exacerbada resposta, utilizando um modelo de diferenciação de células B *in vitro*. Para isso, PBMCs oriundas de indivíduos saudáveis foram incubadas com partículas do DENV por 7 dias (BONEZI et al., 2020; BONEZI et al., 2022). Este modelo se mostrou capaz de induzir a diferenciação das células B em ASCs na mesma magnitude que quando estimuladas com mitógenos (*Streptococcus aureus* cowan, *Pokeweed mitogen* e CpG ODN 2006), tanto na aquisição do fenótipo, como na obtenção da função de secreção de IgG (BONEZI et al., 2020; BONEZI et al., 2022). Neste modelo, a capacidade de diferenciação destas células em ASCs se mostrou independente da exposição prévia dos doadores ao DENV. As amostras que apresentaram maior diferenciação quando expostas ao DENV em relação aos mitógenos eram provenientes de indivíduos com títulos insignificantes de IgG anti-domínio III do envelope viral ou anti-partícula do DENV (BONEZI et al., 2020). Por outro lado, a diferenciação destas células em ASCs se mostrou dependente tanto da presença de partículas virais viáveis, como do contato físico das células B com as demais células presentes nos PBMCs. Contudo, células B isoladas ou mantidas em cultura sem contato direto com as demais PBMCs (sistema *transwell*) não se diferenciaram em ASCs na presença do DENV, mas sim somente quando incubadas com mitógenos (BONEZI et al., 2020).

1.5 METABOLISMO DO TRIPTOFANO

A relação entre a diferenciação massiva das células B em ASCs neste contexto de infecção pelo DENV e o metabolismo celular envolvido neste processo é desconhecida (WATERS et al., 2018). Considerando que pacientes com Dengue apresentam maior atividade da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) que reduz os níveis de triptofano (TRP) e aumenta os de quinurenina (KYN) no soro durante os sintomas (BECERRA et al., 2009; ZHAI et al., 2019), decidimos investigar se o metabolismo do TRP estava envolvido no nosso modelo de diferenciação celular *in vitro*.

É importante salientar que o TRP é um aminoácido essencial metabolizado principalmente pela via das KYN, de onde surge a formação de compostos como a N-formilquinerunina (NFK) e a KYN (Figura 6), e a via serotoninérgica que gera compostos como a serotonina e melatonina. Ambas as vias estão relacionadas à regulação da resposta imune e neurotransmissão (OPITZ et al., 2020, MIGLIORINI, 2010). Os principais genes envolvidos na via das KYN são os codificadores das enzimas que representam os passos limitantes dessa via: a triptofano 2,3 dioxigenase (TDO), responsável pelos níveis séricos de TRP e KYN; e a indolamina 2,3 dioxigenase (IDO1 e IDO2) (Figura 6). Essas enzimas são expressas em diversos tecidos, catalisando a oxidação de TRP a NFK. A expressão dessas enzimas é induzida por interferon-gama (IFN- γ) em diversos tipos de células imunes (células dendríticas, monócitos, macrófagos e eosinófilos), assim como em células epiteliais, fibroblastos, músculo vascular liso, células endoteliais e até em linhagens tumorais (MIGLIORINI, 2010). Essa amplitude de expressão de IDO reitera toda a relevância do metabolismo de TRP em mamíferos (MIGLIORINI, 2010).

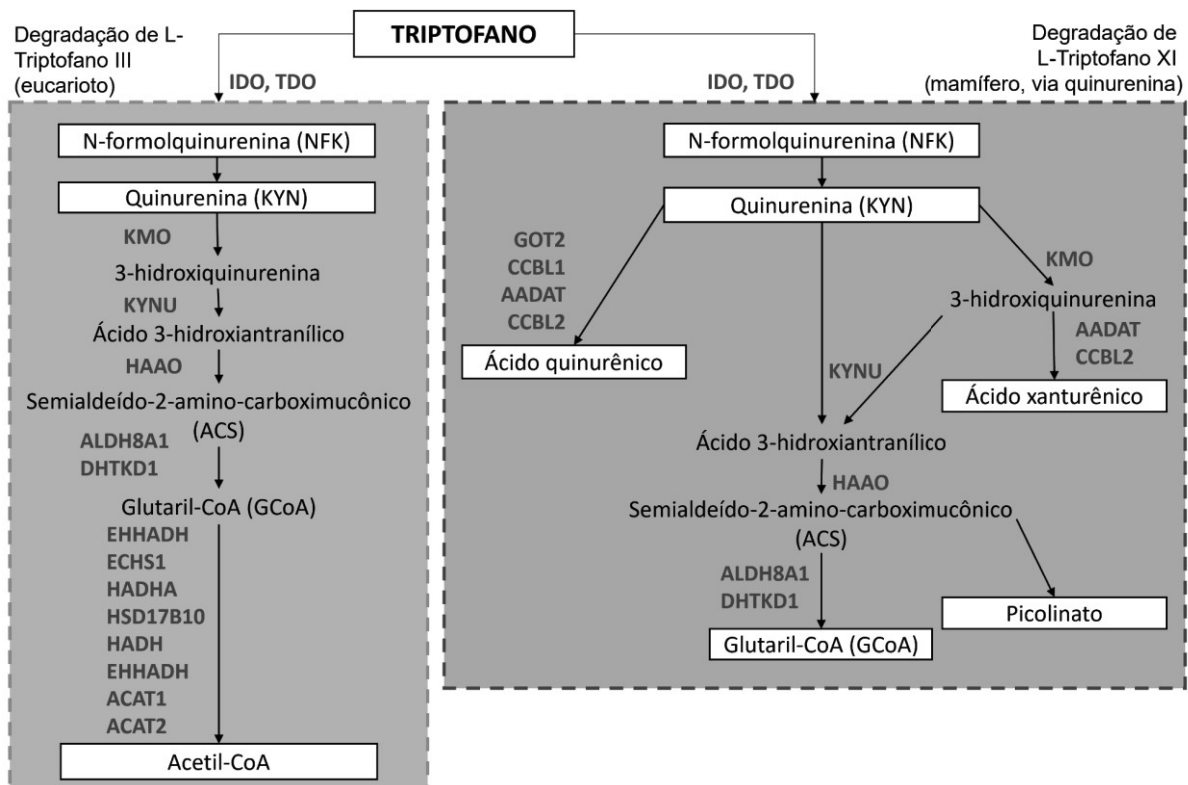


Figura 6 - Vias de degradação do TRP. O esquema do metabolismo foi simplificado utilizando como base as informações das vias de degradação do TRP da plataforma MetaCyc³. Na parte esquerda da figura, temos a via de degradação de L-Triptofano III (eucarioto), enquanto à direita, a via de degradação de L-Triptofano XI (mamífero, via KYN). Destacados em branco estão os principais compostos gerados pelas duas vias (N-formolquinurenina (NFK), Quinurenina (KYN), Acetil-CoA, Ácido quinurênico, Glutaril-CoA (GCoA), Picolinato e Ácido xanturênico). Ao lado das setas, em azul, estão os genes envolvidos nas determinadas etapas das vias.

Na via das KYN, são produzidos outros compostos que auxiliam no processo de imunomodulação, como o 3-hidroxiquinurenina e a própria KYN que são capazes de induzir linfócitos T reguladores (Tregs) e células dendríticas com ação supressora (MIGLIORINI, 2010). Outros estudos demonstraram que a ativação do metabolismo do TRP tem ação anti-inflamatória e efeitos imunossupressores em infecções pulmonares, renais, autoimunes e hepáticas, sendo que em um modelo de camundongos deficientes emIDO, houve a modulação das células B e supressão da citotoxicidade das células *Natural killers* (NK) protegendo os camundongos da inflamação gástrica crônica (SORGDRAGER et al., 2019).

Alguns estudos indicam um aumento das disfunções imunológicas, associando o excesso deIDO em algumas infecções, como a pelo vírus Influenza, com inflamação

³ (<https://metacyc.org/META/substring-search?type=NIL&object=tryptophan>)

nos pulmões; ademais, a inibição da atividade do IDO contribui para a ativação de células T de memória responsáveis pela proteção contra este vírus (WU; GONG; LIU, 2018). Foi também constatado que os genes IDO1-2 e TDO2 modulam a resposta imune, através da privação de TRP e de outros compostos participantes da via da KYN, levando ao avanço de alguns tipos de câncer. A falta de TRP facilita o escape imune tumoral pela indução de células T reguladores e pela regulação negativa dos receptores de células T CD8+ e células dendríticas (OPITZ et al., 2020; WU; GONG; LIU, 2018; NEWMAN et al., 2021).

Não apenas as células T e células dendríticas são afetadas pelo metabolismo do TRP, mas também há indícios de que as células B podem ser afetadas por este mecanismo. Sabe-se que os metabólitos KYN e TRP se ligam ao receptor Aryl hidrocarboneto (AhR) das células B. Entretanto, o papel deste ligante e sua relação com o metabolismo do TRP na diferenciação e proliferação de células B ainda não foi identificado (DAGENAIS-LUSSIER et al., 2021). Um estudo feito com artrite reumatoide indica que a IDO está diretamente relacionada com a inflamação, posto que inibindo a mesma enzima, foi observada uma diminuição da resposta de células B, assim como dos títulos de anticorpos, e do nível de citocinas inflamatórias (DAGENAIS-LUSSIER et al., 2021).

Nosso grupo realizou uma série de experimentos com o intuito de elucidar a relação dos compostos gerados pela via do TRP com a geração de ASCs induzida nas células B contidas em PBMCs cultivadas com partículas do DENV. Nessas culturas foram detectadas uma maior expressão dos transcritos de IDO1 e IDO2, maior consumo de TRP e síntese de KYN no sobrenadante em relação às culturas das PBMCs com mitógenos. Embora ambos os estímulos (DENV e mitógenos) induziram a diferenciação em ASCs em magnitudes similares *in vitro*, cada um parece estimular esse processo vias metabólicas distintas. Ainda, foi encontrada uma correlação inversa entre os níveis de TRP no sobrenadante das culturas com o DENV e o número de ASCs detectadas por ELISPOT nessas mesmas condições. Esta foi acompanhada de uma correlação direta entre os níveis de KYN e o número de ASCs detectadas por ELISPOT ou com a quantidade de IgG secretada (detectada por ELISA) nesse mesmo grupo de amostras (BONEZI et al., 2020).

Desta forma, ficou claro que o metabolismo do TRP é, de alguma forma, ativado durante a diferenciação de células B em ASCs na cultura de PBMCs com o DENV. Contudo, alguns pontos deste processo celular ainda precisam ser elucidados *in vivo*.

Entre eles, inclui-se o questionamento se as células B que se diferenciam em ASCs durante a infecção pelo DENV necessariamente têm o metabolismo de TRP ativado ou se este processo é desencadeado por outras células presentes no sangue periférico.

Para responder à essa demanda científica, a análise do perfil de expressão gênica (transcriptoma) de determinada amostra pode facilitar muito o esclarecimento da relevância de determinada via para um processo celular. Neste contexto, existem 21 séries de dados disponíveis de transcriptoma gerados por microarray com as palavras “*Dengue patient blood*” para humanos na plataforma GEO *Datasets* do NCBI⁴. Neste universo de dados, foram compiladas quase 13.000 amostras analisadas de sangue periférico ou PBMCs no total. Mesmo com todos estes dados, ainda fica difícil estipular se o metabolismo de TRP realmente estaria envolvido com a diferenciação celular em questão. Os perfis de expressão gênica (transcriptoma) deste tipo de amostra normalmente são bastante distintos daqueles apresentados por populações celulares específicas, como de células B estimuladas a se diferenciarem em ASCs.

⁴ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a ativação do metabolismo do TRP detectada durante a diferenciação de células B em ASCs *in vitro* também ocorre em células únicas (*single-cells*) isoladas de pacientes com Dengue por meio de dados de transcriptoma.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Observar se a diferenciação massiva de células secretoras de anticorpos é detectada em *single-cell*;
- II. Analisar as subpopulações de células B do sangue periférico em relação à expressão dos genes das vias do TRP;
- III. Avaliar o perfil transcriptômico de outras células presentes em PBMCs em relação à expressão de genes das vias do TRP, caso os resultados com ASCs forem improfticos.
- IV. Analisar o enriquecimento dos genes diferencialmente expressos (*DEGs*) das células secretoras de anticorpos dos pacientes com Dengue grave e moderada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DO *DATASET* DE TRANSCRIPTOMA

Todas as análises deste trabalho foram realizadas com a utilização de amostras derivadas do estudo E-MTAB-9467 da plataforma ArrayExpress⁵ (Tabela 1). O sequenciamento das amostras foi do tipo *scRNA-seq* (*single-cell RNA-sequencing*) que permite avaliar o transcriptoma das células individualmente. Foi preparado com a utilização do protocolo do 10x *Genomics* da plataforma *Illumina HiSeq*. As amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) eram provenientes de uma coorte de pacientes com Dengue da Tailândia, formada por dois indivíduos (homens adultos) e que foram diagnosticados como infecções secundárias de DENV-4 de sintomatologia moderada ou grave, e um indivíduo saudável como controle (mulher adulta). Foram coletadas 8 amostras de cada indivíduo infectado, sendo duas em cada período: Dia -2, Dia -1, Dia 0 (defervescência - fase crítica febril induzida pela Dengue moderada ou grave), e Dia 14 (convalescência de duas semanas). Ao todo, foram sequenciadas 39,885 células únicas de PBMCs.

Tabela 1 – Características dos indivíduos do estudo E-MTAB-9464.

	E-MTAB-9464
Tipo de amostra	PBMC
Coorte	Tailândia
Número de Indivíduos Total	3
Dengue primária	-
Dengue secundária	2 pacientes (Homens adultos)
Grupo controle	1 indivíduo (Mulher adulta)
Dengue moderada	1 paciente (8 amostras de infecção aguda e convalescente)
Dengue grave	1 paciente (8 amostras de infecção aguda e convalescente)
Sequenciamento	<i>scRNA-seq</i>
Alinhamento	10x <i>Genomics</i>
Quantidade de células totais	39.885

⁵ (<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress/studies/E-MTAB-9466>)

3.2 ANÁLISE DE *SINGLE-CELL RNA-seq*

As análises de *single-cell* foram realizadas no RStudio, com o programa R versão 4.2.0, utilizando os pacotes:

- *Seurat* - analisar os dados de *scRNA-seq* a partir de funções para as etapas de *downstream* (HAO et al., 2021);
- *Azimuth*⁶ - substitui a anotação manual dos *clusters* (etapa de anotação do *Seurat*) pela anotação automática baseada em marcadores específicos de PBMCs em humanos;
- *Harmony* - integrar células de diferentes *batches* ou amostras em um único espaço. Isso ajuda a corrigir os efeitos de lote (*batch effects*) (KORSUNSKY et al., 2019).

As análises de *Downstream* consistem em etapas de pré-processamento e de biologia computacional. É no pré-processamento que ocorrem o ajuste das matrizes de *counts*, a preparação e organização dos dados brutos, o controle de qualidade, e a normalização e redução dimensional. O controle de qualidade serve para seleção e remoção de células de baixa qualidade e de genes mitocondriais. A normalização é realizada a partir da mudança de valores dos conjuntos de dados para uso de escala comum, sem que haja distorção de diferenças nos intervalos de valores ou perda de informações. Já a redução dimensional diminui o número de variáveis de entrada em um conjunto de dados (Figura 7).

As análises de biologia computacional abrangem: a clusterização, após o pré-processamento dos dados, para agrupar os tipos celulares de perfis transcriptômicos semelhantes; a etapa de anotação ou identificação e classificação celular, que identifica os tipos de populações celulares utilizando o pacote *Azimuth*; a análise de expressão gênica, que mostra a expressão de genes, no nosso estudo, envolvidos com as vias do TRP; e a análise de *DEGs*, que identifica os genes que variam entre diferentes condições (Figura 7).

⁶ (https://satijalab.github.io/azimuth/articles/run_azimuth_tutorial.html)

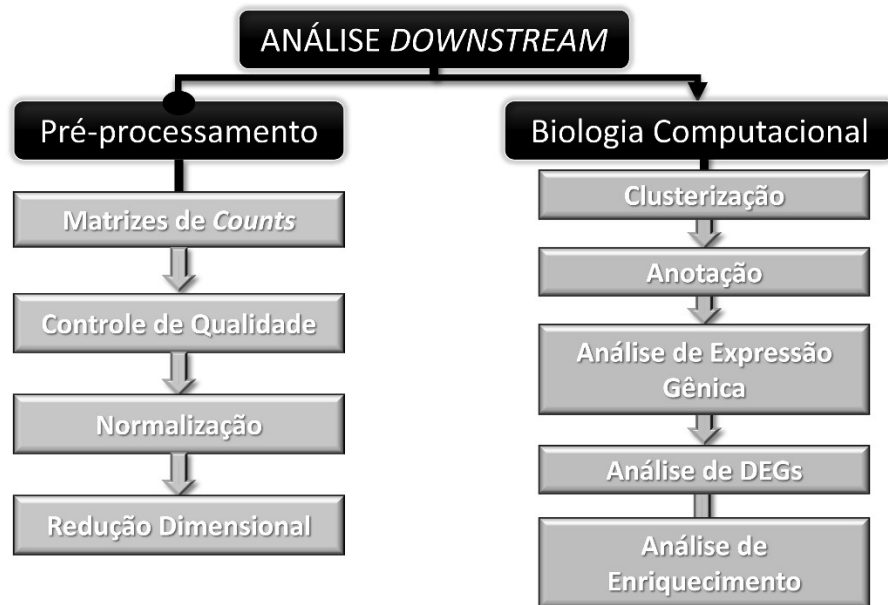


Figura 7 - Esquema de delineamento experimental.

3.2.1 Pré-processamento dos dados

A realização do pré-processamento dos dados foi feita seguindo a guia do *Seurat* v4 disponibilizada pelo grupo SatijaLab⁷ (*Seurat - Guided Clustering Tutorial*, desenvolvida por Paul Hoffman, Satija Lab e Colaboradores). Os parâmetros que foram alterados estão detalhados a seguir. Após organizado, o *dataset* passou pelo processo de Controle de Qualidade, chamado *Qc metrics* (ou *quality control metrics*) que consiste em eliminar as células únicas de baixa qualidade que podem interferir na viabilidade e confiabilidade dos resultados. Este controle é feito através de 3 parâmetros diferentes simultâneos e os seus valores são definidos de acordo com o resultado do gráfico obtido (Figura 8). O primeiro é definido pela quantidade de genes (*nFeature_RNA*), isto é, as células que possuem quantidade de genes acima de 4000 (consideradas *doublets*) ou abaixo de 200 genes (consideradas mortas ou vazias) foram excluídas da análise. O segundo representa a quantidade de *reads* por célula (*nCount_RNA*). Assim, se a célula apresentou mais de 20.000 mil *reads* ou menos de 200 *reads*, ela foi excluída da análise (possibilidade de dano no processo de captura celular). O terceiro é o *percent.mt*, utilizado para remover as células que apresentaram mais de 10% de genes mitocondriais (possibilidade de dano no processo de captura celular que culmina em estresse celular ou apoptose) (Figura 8; *Seurat - Guided*

⁷ https://satijalab.org/seurat/articles/pbmc3k_tutorial

Clustering Tutorial). Estes valores podem ser modificados para se ajustar melhor no gráfico e ao tipo de amostra que é analisada. Nesse estudo, a definição do *percent.mt* para o valor de 10% para o *dataset* E-MTAB-9467 se mostrou adequado com a literatura para amostras de *single-cell* derivadas de PBMCs (OVERHOLT et al., 2021; WAICKMAN et al., 2021) e de acordo com o gráfico gerado (Figura 8).

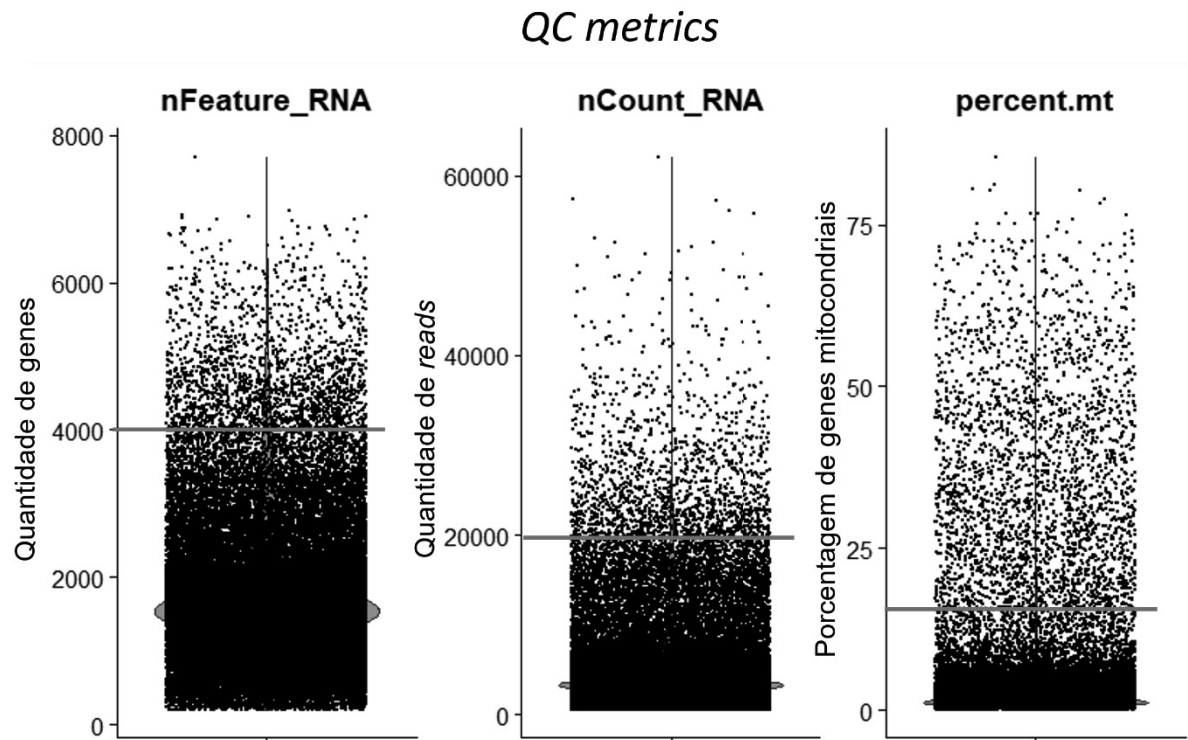


Figura 8 - *QC metrics*. Filtragem das células que apresentam I) *nFeature_RNA* acima de 4000 e abaixo de 200 II) *nCount_RNA* acima de 20.000 III) *percent.mt* acima de 10%. As linhas pontilhadas em vermelho indicam, aproximadamente, a margem de descarte das células (sendo descartadas as células acima da linha).

Com a obtenção dos valores dos parâmetros *nFeature_RNA*, *nCount_RNA* e *percent.mt*, foi calculada a Correlação de Pearson (Figura 9) que indica se o sequenciamento das amostras possui uma boa qualidade. Para isso, a correlação entre *percent.mt* e *nCount_RNA* tem que apresentar valores negativos ou próximo de zero, enquanto a correlação entre *nFeature_RNA* e *nCount_RNA* tem que estar entre 0.8 e 0.9, indicando uma correlação positiva. Nossa análise apontou que a Correlação de Pearson das células selecionadas apresentaram indicativo de boa qualidade da sua filtragem (Figura 9).

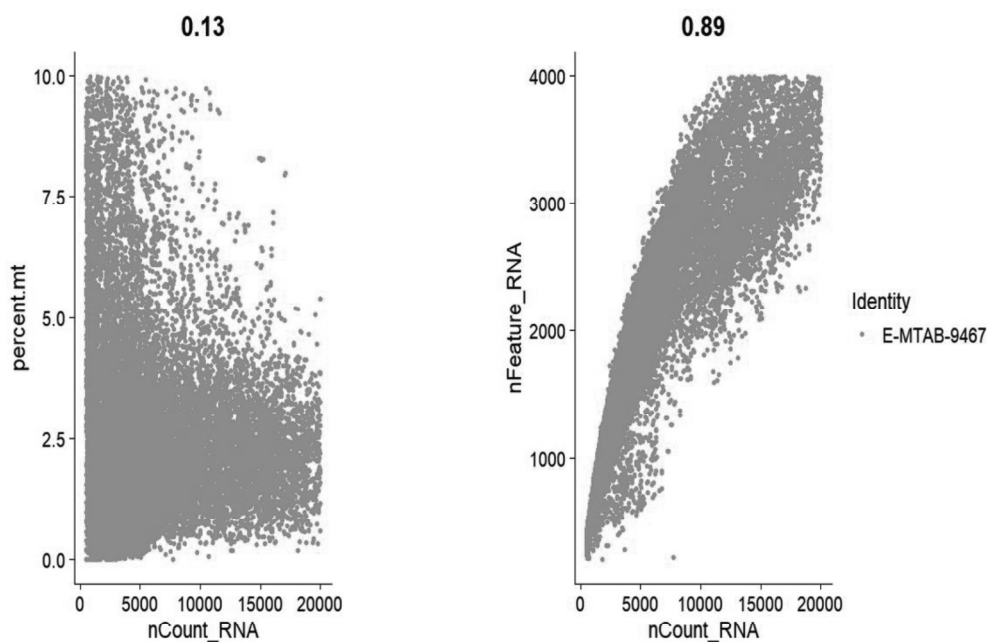


Figura 9 - Correlação de Pearson. O *dataset* apresentou correlação entre *percent.mt* e *nCount_RNA* ligeiramente positivo, mas ainda de valor próximo de zero (esquerda), e *nFeature_RNA* e *nCount_RNA* dentro do valor ideal (direita), demonstrando a boa qualidade do sequenciamento.

A normalização foi feita com o uso da função *scTransform()* do pacote *Seurat* que utiliza regressão binomial negativa, estabilizando as variações dos dados para facilitar sua medição para as próximas etapas (HAFEMEISTER; SATIJA, 2019).

3.2.2 Clusterização, anotação e integração dos dados

A geração do UMAP Total (todas as populações celulares contidas nas PBMCs) e sua anotação foi feita de forma automática com o pacote *Azimuth*. Em seguida, usando a função *subset()*, separamos as subpopulações de células B que foram novamente clusterizadas pelo pacote *Azimuth* e integradas com o pacote *Harmony*.

Os marcadores visualizados nos UMAPs de células B e suas subpopulações, foram encontrados na literatura e no site do *Azimuth* e os UMAPs foram plotados com o pacote *Nebulosa*, disponibilizado pelo pacote *Bioconductor* (ALQUICIRA-HERN; EZ, 2023).

3.2.3 Análise de expressão dos genes do metabolismo do TRP

Genes relacionados ao metabolismo do TRP foram identificados com o auxílio da plataforma MetaCyc. Duas vias metabólicas foram selecionadas: Degradação do L-Triptofano III e Degradação do L-Triptofano XI. O critério de seleção das vias foi: pertencer aos eucariotos (Degradação do L-Triptofano III) e aos mamíferos, principalmente pela via das KYN (Degradação do L-Triptofano XI) como visto na Tabela 2. Os genes foram plotados em formato *DotPlot* para as condições de severidade da doença e dias que foram coletadas as amostras.

Tabela 2 - Genes das vias do TRP.

Degradação de L-Triptofano III (eucarioto)	Degradação de L-Triptofano XI (mamífero, via quinurenina)
TDO2 (TPH2)	TDO2 (TPH2)
IDO1	IDO1
KYNU	KYNU
KMO	KMO
HAAO	HAAO
ACMSD	ACMSD
ALDH8A1	ALDH8A1
DHTKD1	DHTKD1
EHHADH	-
ECHS1	-
HADHA	-
HSD17B10	-
HADH	-
ACAT1	-
ACAT2	-
-	AADAT
-	GOT2
-	KYAT1 (CCBL1)
-	KYAT2 (CCBL2)

3.2.4 Análise de *DEGs*

Com apenas as duas populações de plasmablastos e de plasmócitos selecionadas (clusterizadas pelo pacote *Azimuth*), separamos as células de infecção aguda do Dia -2, Dia -1 e Dia 0 para encontrar os *DEGs* dos grupos de Dengue grave, comparado-os com aqueles de Dengue moderada. Os *DEGs* foram encontradas utilizando a função *Findmarkers()* do pacote *Seurat* e filtrados pelos valores do Log_2 de *fold-change* maior que 0,25 e de valor de p-ajustado menor que 0,05.

3.2.5 Análise de enriquecimento

A análise de enriquecimento foi realizada utilizando a função *enrichGO()* do pacote *clusterProfiler* (WU et al., 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REDEFINIÇÃO DO DATASET

Inicialmente, pesquisamos por estudos de *single-cell* de PBMCs de pacientes infectados com Dengue no banco de dados GEO da plataforma NCBI. É vantajoso usar *single-cell RNA-sequencing*, pois essa tecnologia possui as vantagens de identificar o transcriptoma individual de cada célula, possibilitando a caracterização celular e molecular de um grande número de células ao mesmo tempo. Sendo assim, a princípio encontramos o *dataset* GSE116672 (ZANINI et al., 2018), o qual possui um sequenciamento diferenciado do tipo *viscRNA-Seq*, tipo de *RNA-sequencing* com vírus incluso (do inglês *virus-inclusive single-cell RNA-seq*). No entanto, as análises iniciais realizadas com este *dataset* apontaram para a baixa qualidade das células, com a Correlação de Pearson (*nFeature_RNA* e *nCount_RNA*) igual a 0.35, muito abaixo do esperado, indicando uma má qualidade das amostras. O problema derivado desta má qualidade é que na tentativa de retirar as células de baixa qualidade, diminuimos drasticamente o número de células, ao ponto de não restarem células o suficiente para seguirmos com as análises. Logo, decidimos retirar o estudo GSE116672 e substituí-lo pelo estudo E-MTAB-9467.

4.2 ANOTAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS B

As populações celulares de PBMCs foram clusterizadas e anotadas com a utilização do pacote *Azimuth* (Figura 10A). Para confirmar a identificação das populações de células B, pesquisamos quais os marcadores celulares serviriam para identificar uma determinada população de leucócitos e avaliamos quais marcadores estavam mais expressos em cada população. Os principais marcadores de células B foram plotados em UMAPs (Figura 10B). Os marcadores CD79A, RALGPS2, CD79B e MEF2C são altamente expressos em células B e com baixa expressão significativa para os outros grupos, corroborando, assim, que os clusters ressaltados eram provenientes de subpopulações de células B.

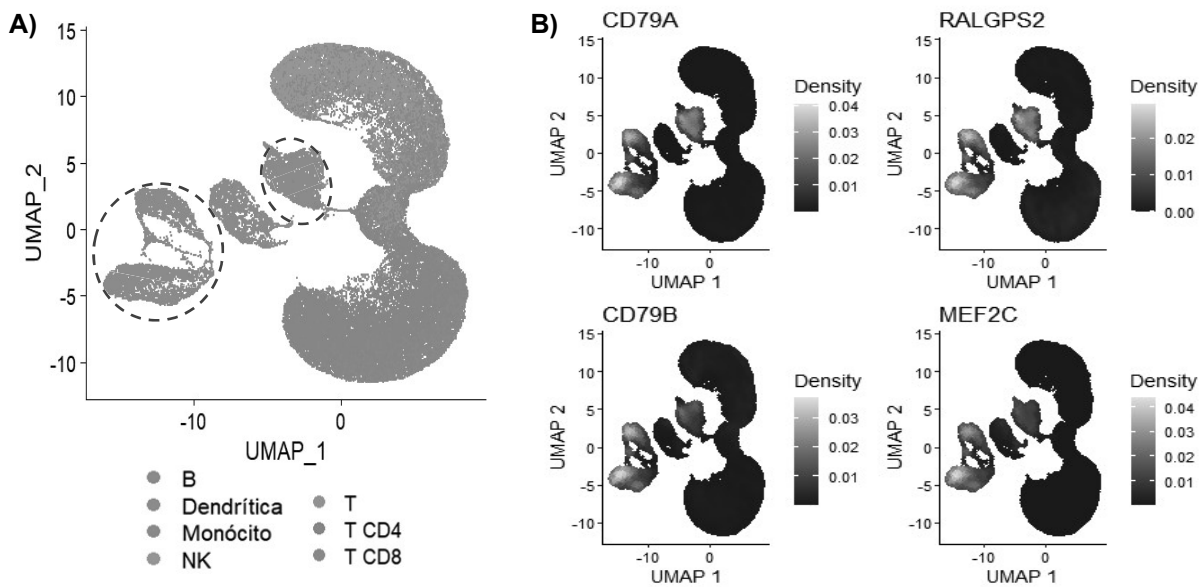


Figura 10 – Anotação do UMAP Total. A) Após a filtragem de todos os dados, o UMAP Total do *dataset* E-MTAB-9467 continha 25.410 células de indivíduos infectados e saudáveis. B) UMAPs referente a Figura 10A, representando a expressão dos marcadores de células B para cada subpopulação. Quanto mais clara (mais próximo da cor amarela) for a região no UMAP, maior a expressão do gene. Quanto mais escura (mais próximo da cor azul) for a região no UMAP, menor a expressão do gene.

Considerando que o objetivo principal deste trabalho visava analisar principalmente as células B dos pacientes com Dengue moderada ou grave, foi feito um UMAP separado para avaliar as subpopulações de células B (Figura 11A). Para isto, primeiro foi realizado um *subset* das células B, seguido pela reclusterização, e integração destas células, a fim de eliminar os efeitos de lote entre as amostras. Os marcadores que identificam cada subpopulação de células B foram plotados em seguida, corroborando com a identificação gerada pelo *Azimuth* (Figura 11B - F).

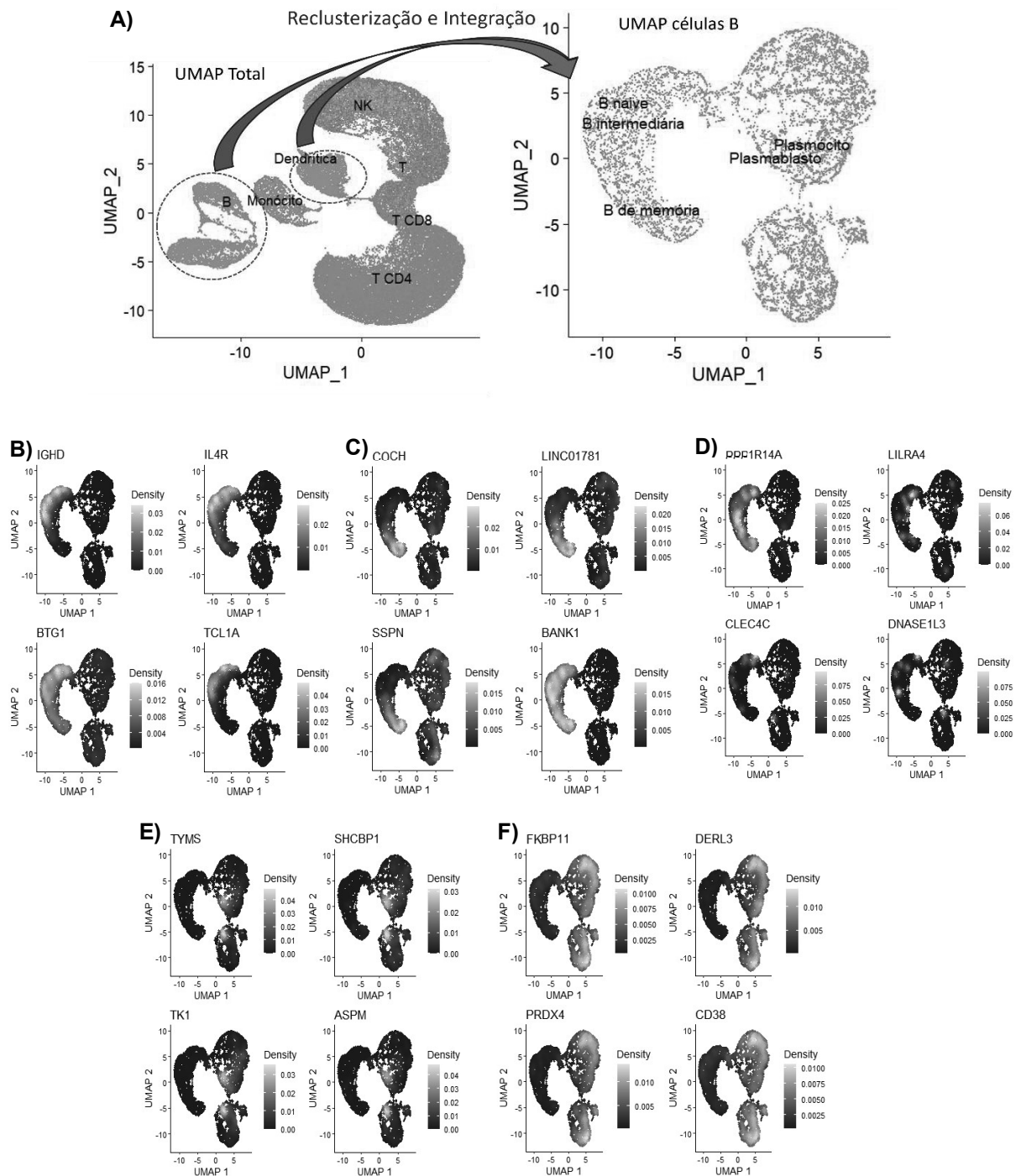


Figura 11 - UMAP de subpopulações de células B. A) A anotação automática do *Azimuth* dividiu as células B em 5 subpopulações (células B intermediária, B naiva, B de memória, plasmablastos e plasmócitos), resultando em 9440 células B de indivíduos infectados e saudável. Selecionamos alguns marcadores das subpopulações de células B para corroborar com a Clusterização automática feita através do pacote *Azimuth*. B) Marcadores de células B naiva. C) Marcadores de células B de memória. D) Marcadores de células B intermediárias. E) Marcadores de Plasmablastos. F) Marcadores de plasmócitos.

4.3 PROPORÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS B

Após a Clusterização, foi possível separar as subpopulações de células B por grupos de pacientes com Dengue grave, moderada, convalescente e controle (Figura 12A). Observou-se que o número de ASCs detectado nos grupos com Dengue grave e moderada é extremamente alto se comparado aos demais grupos. Já a quantidade de células B naive, de memória e intermediária era menor que as de ASCs, mas aumentou com o estabelecimento da convalescência (Figuras 12).

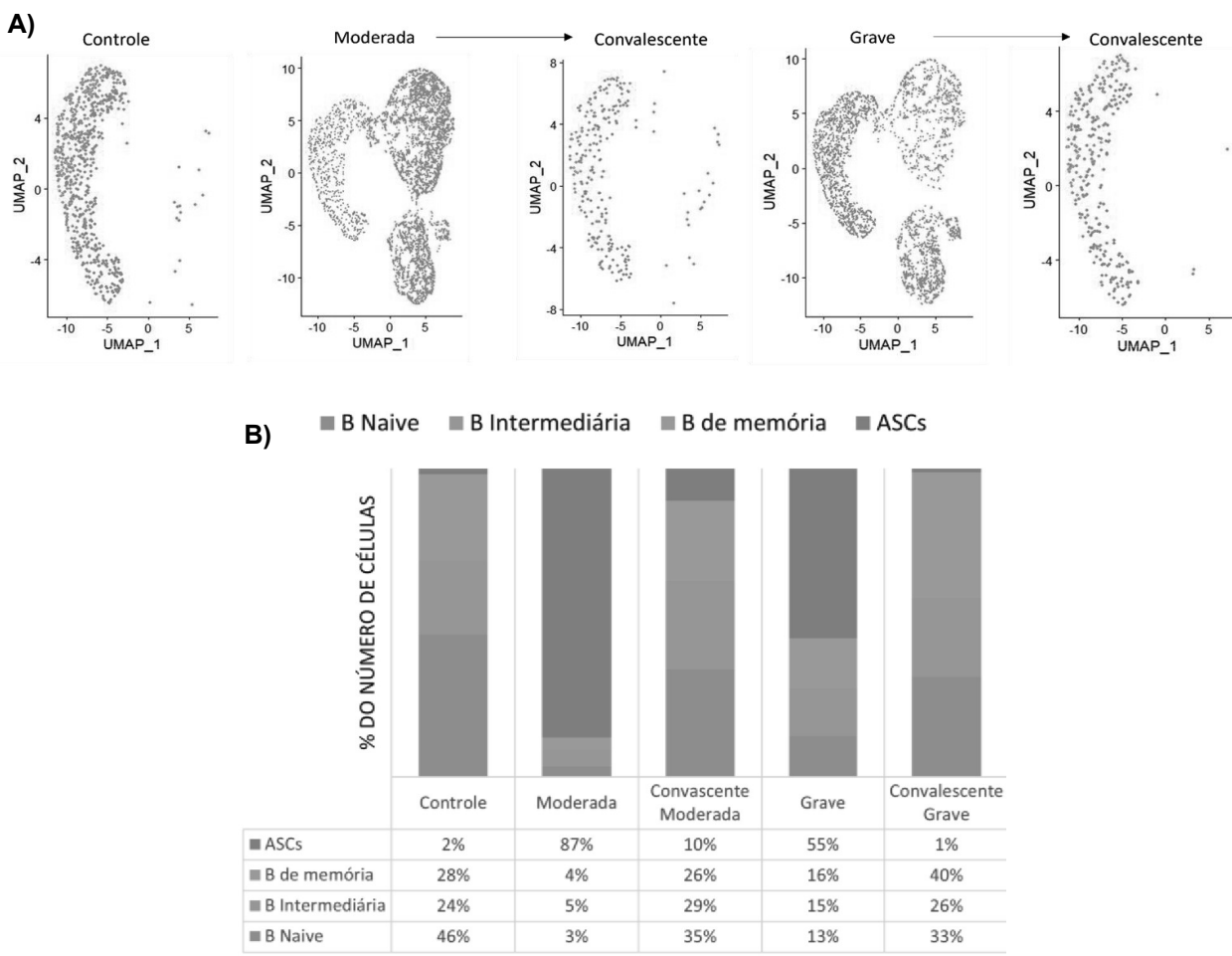


Figura 12 - UMAP Severidade. A) UMAPs das subpopulações de células B separadas com base na severidade da doença do paciente e de indivíduos controle. B) Tabela de frequência relativa quantificando a porcentagem do número de células das subpopulações para os diferentes grupos.

Em seguida, avaliamos a cinética das subpopulações de células B separando-as pelos dias que foram coletadas (Figura 13). Neste caso, temos os últimos dois dias de febre (Dia -2 e Dia -1), sintomáticos, seguido pelo Dia 0 de defervescência e o Dia 14 (convalescente), já sem sintomas (Figura 13). Foi visto que as ASCs apresentaram um pico no Dia -1 tanto para Dengue grave quanto para moderada, decrescendo no Dia 0 e chegando ao nível do controle no Dia 14 (Figura 13).

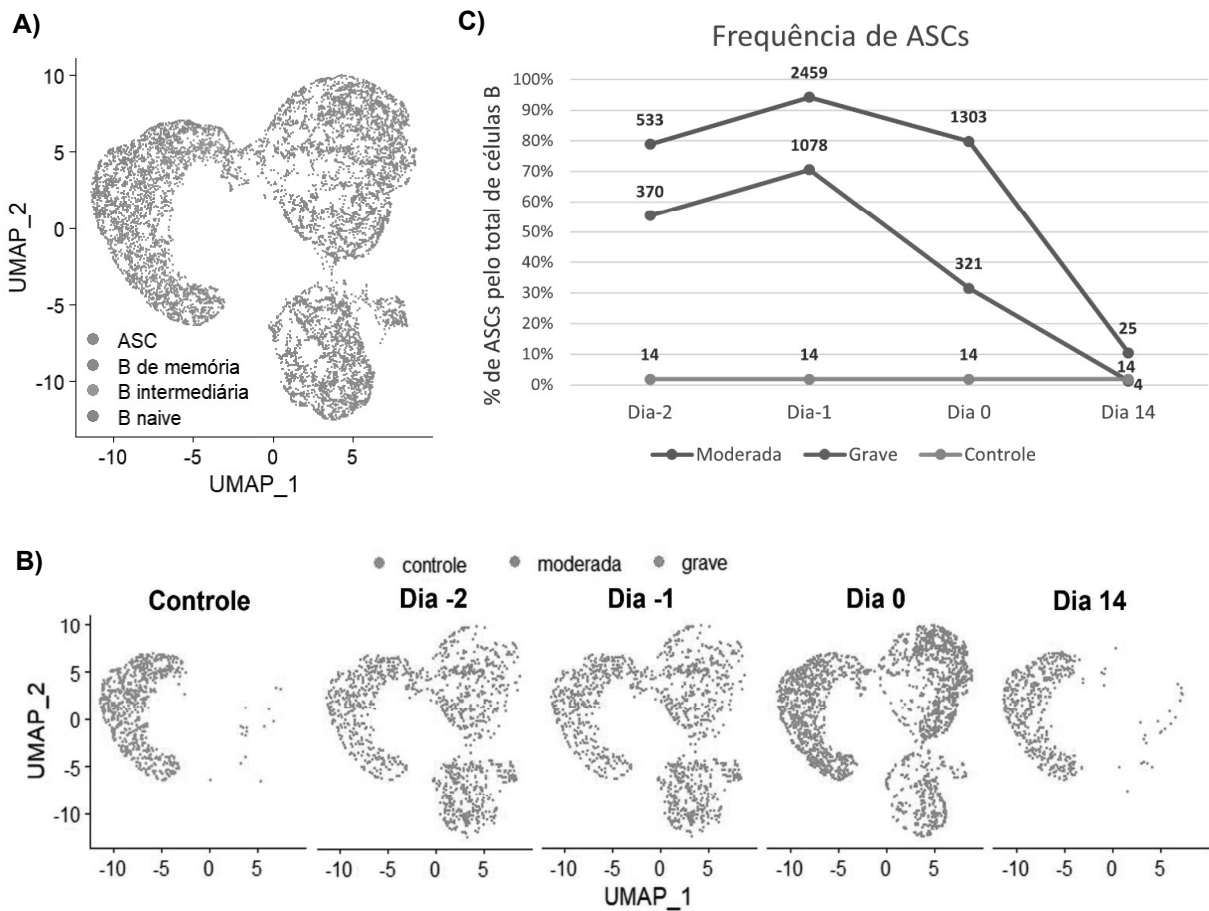


Figura 13 – Frequência celular em relação aos dias de infecção. A) UMAP de células B de indivíduos com Dengue e controle. B) UMAPs das subpopulações de células B separados pelos dias de coleta das amostras e pela severidade da Dengue: vermelho, referente ao grupo controle; azul, Dengue moderada; e verde, Dengue grave. C) Gráfico de linhas da frequência das ASCs separadas pelos dias de coleta e gravidade da doença.

Os dados de células B e o aumento expressivo das ASCs, observado na análise das células dos pacientes com Dengue moderada ou grave (Figuras 12 e 13), apontam para uma relação direta da expansão celular com a presença do DENV ou de seus sintomas e corroboram com os achados da literatura (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012). É importante destacar que a grande maioria das ASCs

encontradas até o dia 7 do surgimento dos sintomas em pacientes com Dengue têm seus BCRs específicos a epítopos do envelope viral (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012). Dentre as células B do paciente com Dengue moderada, observamos uma tendência de maior frequência de ASCs em relação às apresentadas pelo paciente com Dengue grave (Figura 12 e 13), não coincidindo com a ideia de que o aumento da diferenciação celular está diretamente relacionado com a gravidade da doença. Entretanto, é possível que o estado fisiológico de cada paciente não seja o fator decisivo para explicar a maior frequência de células no grupo moderado em relação ao grave, pois é necessário considerar as particularidades associadas ao sequenciamento do transcriptoma de *single-cells*. Além disso, tanto o tamanho amostral coletado, como a variabilidade biológica dos indivíduos, podem ser responsáveis por esta falta de diferença significativa entre as quantidades de células observadas.

Se essa resposta massiva das ASCs tem uma relação de patogenicidade com a Dengue, incluindo aumentada carga viral, como já foi mostrada a influência negativa dessas células para o aumento de parasitemia em casos de malária (VIJAY et al., 2020), isso ainda precisa ser analisado em detalhes.

Sobre essa perspectiva do aumento das ASCs, um estudo recente mostrou que doenças que induzem hemólise, e a consequente exposição de moléculas de fosfatidilserina derivadas de hemácia, como na malária, induzem grande expansão de plasmablastos. Hemólise é detectada em casos principalmente de Dengue grave (AYE et al., 2016). O receptor Axl que reconhece essas moléculas se mostrou fundamental para esse processo (VIJAY et al., 2021). A exposição de fosfatidilserina também ocorre durante a sinapse imunológica de linfócitos citotóxicos T CD8+ (FISCHER et al., 2006). Mais especificamente, células T CD8+ específicas ao DENV são ativadas com a infecção, proliferam na fase aguda da Dengue, adquirem a expressão positiva de marcadores similares aos de ASCs, como HLA-DR e CD38, e são detectadas no sangue, mas principalmente na pele (RIVINO et al., 2015). Se este processo de rompimento das hemácias nos pacientes com Dengue é o principal fator desencadeador da geração de ASCs ou se isso tem relação direta com a ativação de células T CD8+ específicas ao DENV, via apresentação por plasmablastos e plasmócitos, ainda necessita-se de maiores avaliações.

As células B naive são precursoras das ASCs e das células B de memória, se diferenciando após devido estímulo e sinalização do sistema imune, sendo esperado

que houvesse uma diminuição de sua frequência nos grupos Dengue moderada e Dengue grave em relação às células do indivíduo controle (CARSETTI et al., 2022).

4.4 SELEÇÃO DOS GENES DO TRIPTOFANO

Para avaliar se a via do TRP está envolvida no processo de diferenciação massiva de ASCs nos pacientes com Dengue moderada e grave, analisamos o perfil transcriptômico de suas células B. Genes relacionados com o metabolismo desse aminoácido foram identificados com o auxílio da plataforma MetaCyc⁸. Duas vias principais foram selecionadas: Degradação do L-Triptofano III e Degradação do L-Triptofano XI. O critério de seleção das vias foi: pertencer aos eucariotos (Degradação do L-Triptofano III) e aos mamíferos, principalmente pela via das KYN (Degradação do L-Triptofano XI) como visto na Tabela 2.

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DO TRIPTOFANO

Os genes da Tabela 2 foram plotados em formato *DotPlot* para as diferentes condições de severidade da Dengue (moderada e grave), assim como para os dias que foram coletadas as amostras para análise das subpopulações de células B (Figura 14). É importante destacar que, como os plasmablastos dos pacientes com Dengue no Dia 14 tinham sua frequência reduzida para valores similares aos dos indivíduos controles (Figuras 12 e 13), a análise dos genes deste metabolismo desconsiderou os dados do Dia 14 para esta subpopulação celular (Figura 14D). Observou-se que nenhuma das subpopulações das células B em análise (naive, intermediária, memória, plasmablasto e plasmócito) apresentou expressão positiva dos genes codificadores das enzimas IDO1, IDO2 e TPH2 (TDO) (Figuras 14A-E), principais genes da via das KYN e responsáveis pela catalização e oxidação do TRP em KYN. Logo, isso sugeriria que o metabolismo do TRP não seria ativado nas células B. Consequentemente, não teria qualquer influência na geração das ASCs derivadas do estabelecimento da Dengue (MIGLIORINI, 2010).

⁸ <https://metacyc.org/META/substring-search?type=NIL&object=Tryptophan>

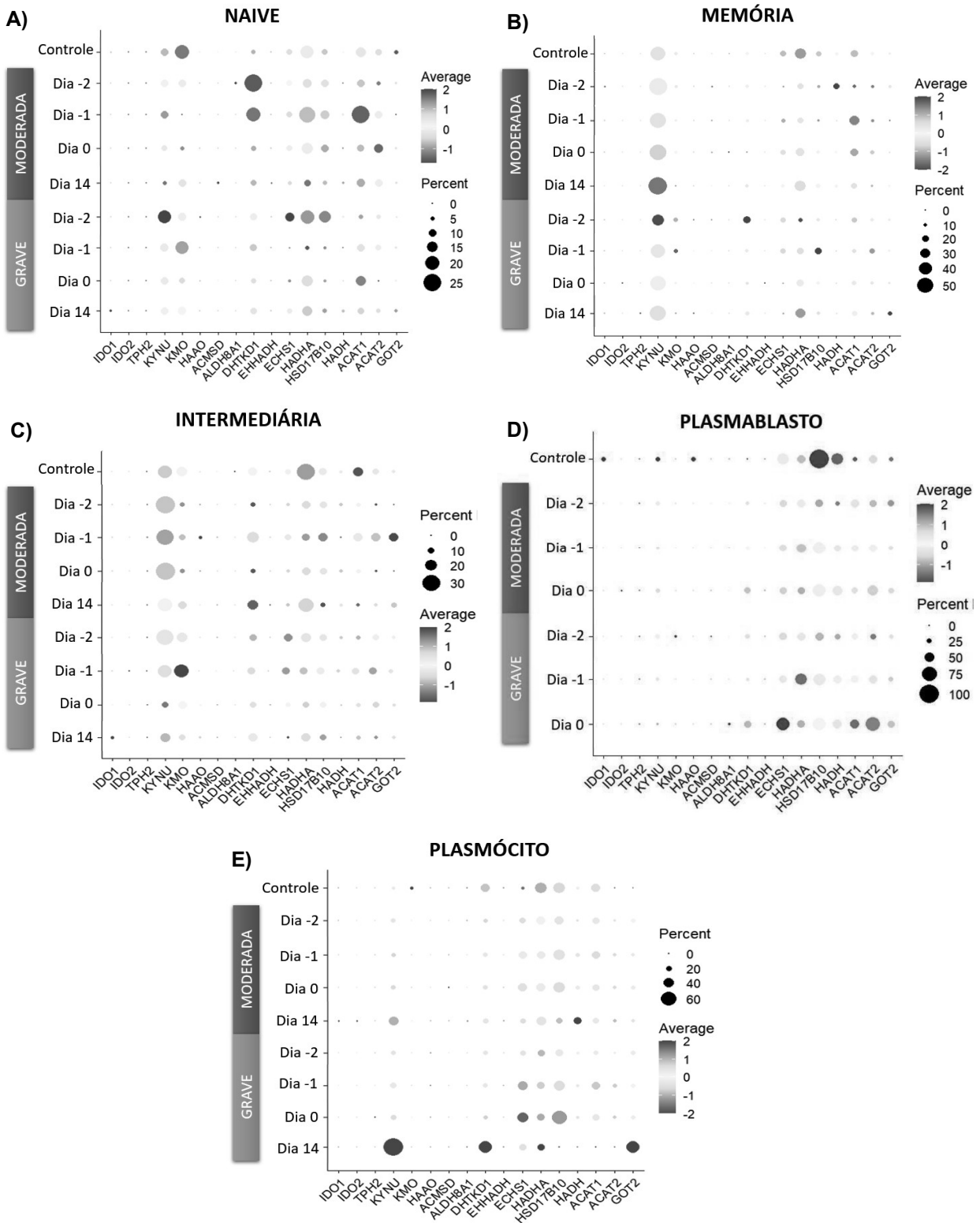


Figura 14 - Expressão dos genes das vias do TRP em diferentes subpopulações de células B no decorrer dos dias do estabelecimento da Dengue e pós sintomatologia. Cada *DotPlot* representa uma subpopulação de células B, e suas amostras foram divididas pelos dias de infecção dos grupos infectados com Dengue moderada e grave e grupo controle. A média de expressão (*Average*) desses genes é representada pela cor da bolinha (vermelho - mais alta; azul - mais baixa) nesses *DotPlots*. Já a porcentagem de células que expressam cada um desses genes (*Percent*) é representada pelo tamanho da bolinha.

Em relação às ASCs e ao restante dos genes do metabolismo do TRP, chamou nossa atenção o perfil de expressão de HSD17B10 (Figuras 14D-E). O gene HSD17B10 (*17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 10*) tem papel importante nas mitocôndrias, atuando no metabolismo de ácidos graxos e na maturação de RNA transportador (tRNA) e mostrou média de expressão maior nos plasmablastos do grupo controle em relação aos dos dias de sintomatologia detectados nessa infecção aguda (Dia -2, Dia -1 e Dia 0), e esse padrão foi semelhante tanto para Dengue moderada quanto para a Dengue grave (Figura 15A). Como o HSD17B10 é um alvo da enzima desacetilase dependente de NAD chamada Sirtuína 3 (SIRT3), aumentaria-se a atividade enzimática e a formação de Ribonuclease P mitocondrial (RNase P), resultando no aumento do crescimento celular e na capacidade das células de resistir a situações de estresse (LIU et al., 2020). Outro estudo sugere que a SIRT3 está diretamente relacionada com a proliferação celular, visto que a falta de SIRT3 foi capaz de atenuar a linfomagênese de células B em camundongos, sem afetar o centro germinativo (LI et al., 2019). Dessa forma, analisamos a expressão de SIRT3 nessas diferentes subpopulações de células B e observamos que somente uma pequena porcentagem de plasmablastos expressava positivamente esse gene no grupo de Dengue grave nos Dia -1 e Dia 0 (Figura 15B). Contudo, essa baixa expressão não aparentou ser significativa para aferirmos que este gene estaria atuando na hipoacetilação de HSD17B10. Considerando que pacientes com Dengue grave têm maior número de ASCs que indivíduos saudáveis (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012) durante o período sintomatológico, parece improvável que o baixo número de plasmablastos que expressam SIRT3 fossem os únicos que seriam expandidos na doença.

Outro gene do metabolismo de TRP que pareceu ser distintamente expresso em ASCs nos pacientes com Dengue foi o ECHS1 (Figuras 14D-E). Esse gene codifica, na mitocôndria, a Enoil Coenzima A hidratase que está envolvida nos processos de degradação e alongamento de ácidos graxos como parte do metabolismo lipídico (WANG et al., 2020). Observa-se que sua expressão nos plasmablastos é atenuada nos grupos de Dengue moderada e grave, e aumentada no grupo controle e no Dia 0 do grupo Dengue grave (Figura 15C). Um estudo mostrou que o ECHS1 promove a ativação de mTOR e resistência a apoptose, sendo que sua superexpressão suprime a proliferação e migração celular, através da inibição de mTOR (WANG et al., 2020). Outro estudo apontou que a supressão constitutiva do

gene ECHS1 em células HCT-8 humanas inibia significativamente a proliferação e migração celular (ZHAO et al., 2012). Avaliamos também a expressão do gene mTOR nas células das subpopulações de células B em questão, mas não detectamos positividade em nenhuma delas (Dados não mostrados). Importante destacar que a expressão do ECHS1 também é mediada pela acetilação de SIRT3, sugerindo que o aumento de ácidos graxos e aminoácidos regulam negativamente SIRT3, induzindo a hiperacetilação de ECHS1 (ZHANG et al., 2017). Logo, os genes ECHS1, SIRT3 e mTOR precisam ser melhor investigados no contexto da diferenciação de ASCs para elucidação do papel de cada um nesse contexto.

Quanto a expressão de genes do metabolismo do TRP em outras subpopulações de células B, vimos que o gene DHTKD1 teve um aumento considerável de média de expressão e em maior porcentagem de células B naive durante o período de sintomas, mas somente visível no grupo de Dengue moderada. O mesmo não foi observado em células do paciente com Dengue grave (Figura 14A). DHTKD1 é um gene mitocondrial, que desempenha um papel crítico na produção de energia e a sua supressão leva ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando assim no retardo do crescimento celular e no aumento da apoptose celular (XU et al., 2013). Possivelmente, o aumento da expressão deste gene em células B naive seja relacionado à alta demanda energética que a célula necessita para se proliferar e diferenciar.

Tanto as células B intermediárias, como as B de memória, mostraram um aumento considerável da média de expressão de KYNU e em maior porcentagem de células durante o período de sintomas, mas somente no grupo de Dengue moderada. O mesmo não foi observado em células do paciente com Dengue grave (Figuras 14B-C). A expressão aumentada de KYNU já foi associada com inflamação e agravamento de psoríase e dermatite atópica atuando inversamente proporcional aoIDO (HARDEN et al., 2016). Juntamente com metabólitos da via do TRP, KYNU aumentava a expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias (HARDEN et al., 2016). Esses dados sugerem que este gene e as células B podem estar relacionadas com quadros inflamatórios observados na Dengue moderada.

Por outro lado, a expressão média de HADHA foi bastante reduzida até a defervescência (Dia -2 até o Dia 0), assim como em porcentagem de células B de memória e Intermediárias nos grupos Dengue moderada e grave em relação ao grupo controle (Figuras 14B-C). HADHA é também um gene mitocondrial e estudos com

camundongos mostraram que ele participa do metabolismo de lipídeos. Quando superexpresso, HADHA inibe significativamente o crescimento celular, induz a apoptose celular e reduz a formação de gotículas lipídicas citoplasmáticas (LDs) (LIU et al., 2019); além disso, também inibiu o crescimento de tumor e reduziu a formação de LDs em camundongos xenotransplantados (LIU et al., 2019). Desta forma, é provável que a expressão deste gene esteja reduzida no contexto da Dengue devido ao aumento e proliferação de ASCs que ocorre nos períodos de sintomatologia, mesmo de detecção de viremia.

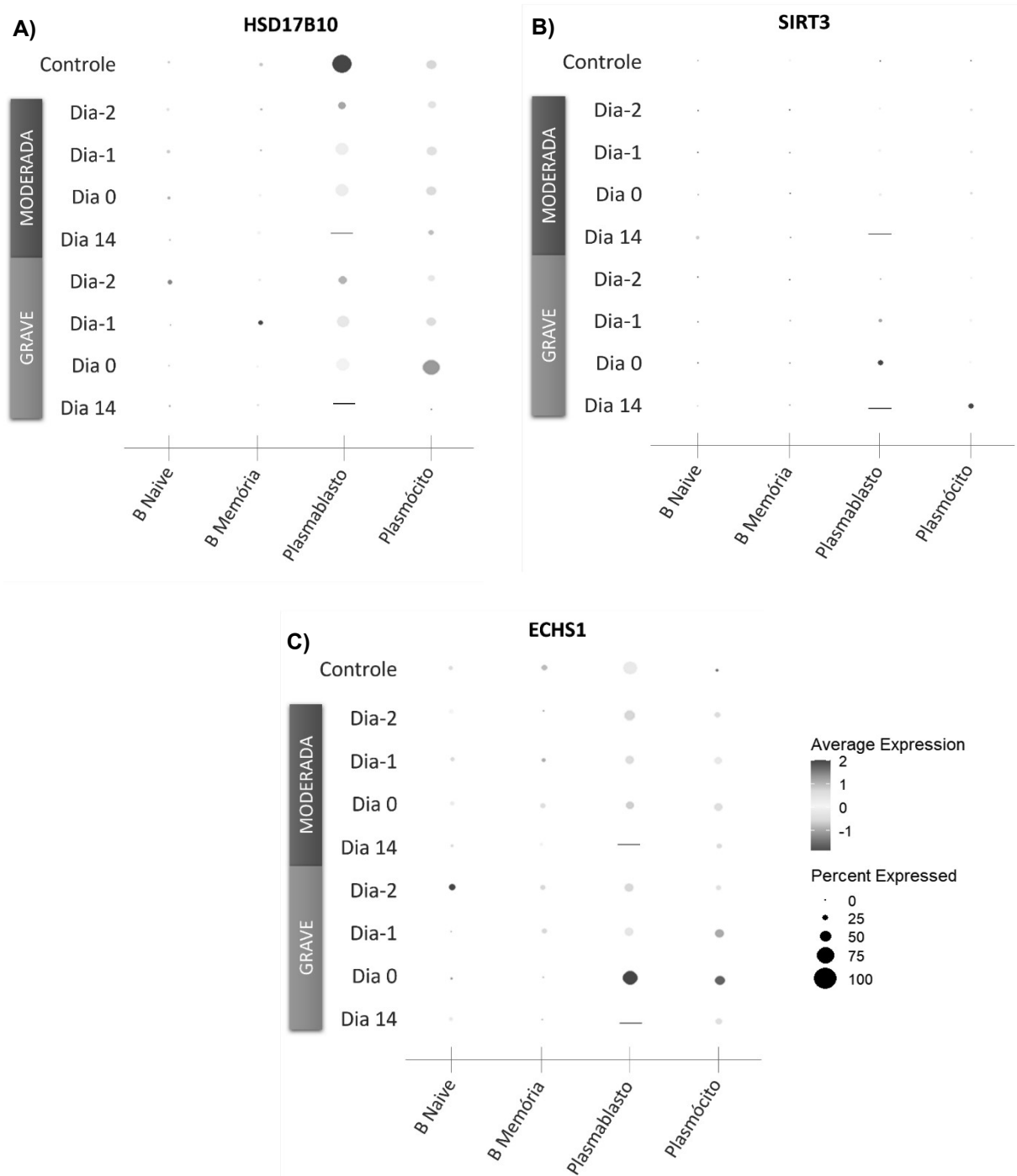


Figura 15 – Expressão dos genes alterados para melhor visualização. Cada *DotPlot* apresenta a expressão de um único gene, facilitando a comparação entre as subpopulações. A média de expressão (*Average Expression*) desses genes é representada pela cor da bolinha (vermelho - mais alta; azul - mais baixa) nesses *DotPlots*. Já a porcentagem de células que expressam cada um desses genes (*Percent Expressed*) é representada pelo tamanho da bolinha. A população de plasmablastos não possui Dia 14 devido à baixa quantidade de células para a análise.

Destacamos que alguns genes mostraram expressão positiva em determinadas subpopulações de células B anteriormente, mas não nesta Figura acima. Isso se deu porque o número de diferentes tipos celulares usados na Figura 16 foram bem maiores que nas comparações realizadas antes.

A análise do transcriptoma de *single-cell* fornece *insights* detalhados sobre a heterogeneidade celular em nível de célula individual. No entanto, como qualquer técnica, ela também apresenta algumas limitações. Aqui estão dois fatores limitantes da análise de célula única que enfrentamos no decorrer do projeto: o tamanho das amostras, para obter resultados confiáveis é necessário um número mínimo de células em uma amostra, como visto nas Figuras 14 e 15, o baixo número de plasmablastos no Dia 14 impossibilitou a visualização da expressão dos genes para aquele dia; a limitações na captura de RNAs, visto que nem sempre todo o RNA presente em uma célula é capturado. Isso pode levar à subestimação da expressão de genes ou à perda de informações.

O papel conjunto das outras populações de células e a interação com as células B precisam ser elucidados e investigados. Para avaliar o que está causando a expansão das ASCs na infecção por DENV é necessário avaliar a interação, não necessariamente física ou de contato, entre as células B, principalmente suas precursoras, as B naive e B de memória, com as células dendríticas e monócitos. Para isso e para averiguar se as células B estão sendo infectadas pelo DENV, outras formas de análises mais adequadas podem ser necessárias, não só no âmbito de *single-cell*, mas também de forma experimental.

4.6 ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Após a análise dos genes do TRP, foi indagado se os genes diferencialmente expressos em plasmablastos e plasmócitos podem estar relacionados com a expansão celular e quais seriam as diferenças entre essas populações de ASCs. Para tentar responder a estas perguntas, inicialmente, foram separadas do *dataset* apenas os plasmablastos e plasmócitos coletados durante a Dengue moderada ou grave (Dia -2, Dia -1 e Dia 0) dos. Um UMAP foi gerado para visualizar a densidade dessas células nas duas condições da Dengue (Figura 17A). Constatamos que havia uma maior quantidade de plasmócitos em ambos os grupos se comparado aos plasmablastos, sendo que essa quantidade foi maior em Dengue moderada (Figura

17B). Por se tratar de uma infecção secundária para ambos os indivíduos (um com Dengue moderada e o outro com grave), supõe-se que a maior quantidade de plasmócitos, células de longa vida produtoras de anticorpos que, neste caso, seriam majoritariamente específicas ao DENV, sejam derivadas da ativação de células B de memória conforme descrito anteriormente (PRIYAMVADA et al., 2016; APPANNA et al., 2016), fazendo com que a resposta humoral ocorra mais rapidamente.

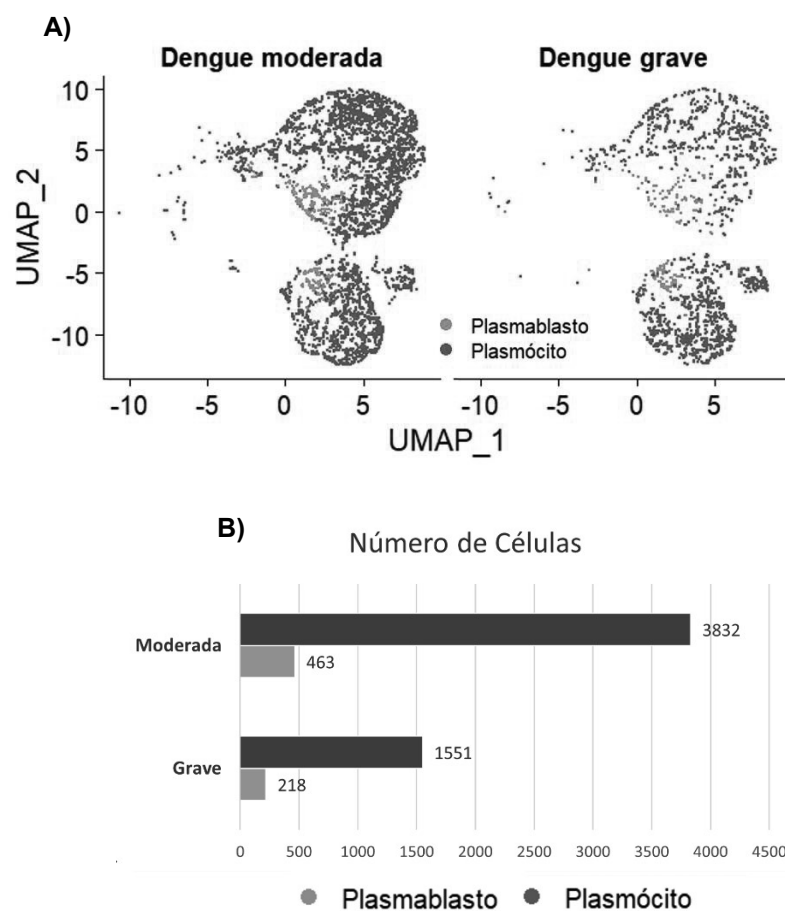


Figura 17 - Diferença quantitativa de plasmablastos comparados aos plasmócitos durante o período sintomatológico. A) UMAPs dos plasmablastos e plasmócitos separados por grupo com Dengue moderada e grave. B) Gráfico de barras para visualizar o número de células dos grupos.

Em seguida, realizamos a análise dos genes diferencialmente expressos (*DEGs*) dos plasmablastos com Dengue grave comparados aos plasmablastos com Dengue moderada, da mesma forma como foi feito para os plasmócitos – plasmócitos com Dengue grave comparados aos com moderada. Separamos apenas os genes

regulados positivamente (Log_2 de *fold-change* maior que 0,25), para em seguida realizar a análise de enriquecimento. A quantidade de *DEGs* foi plotada no Diagrama de *Venn* (Figura 18). Vimos uma quantidade próxima de *DEGs* específicas dos plasmablastos (39) em comparação aos plasmócitos (36), e 51 genes em comum (Figura 18).

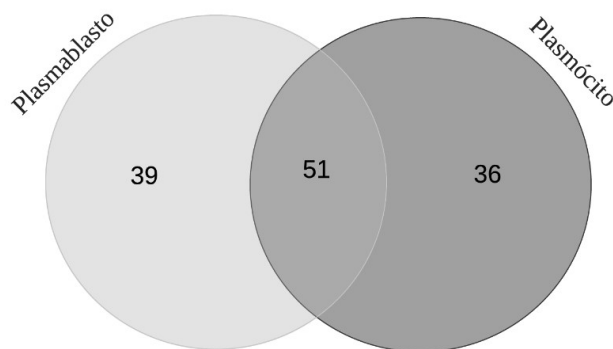


Figura 18 – Diagrama de *Venn* dos genes diferencialmente expressos.

Tabela 3 - Genes diferencialmente expressos regulados positivamente.

Plasmablastos		Plasmócitos		Intersecção		
AC068279.2	IGKV3-20	BTG1	MT-CYB	ARID4B	IFI30	PRDX4
AC253572.2	IGLC1	CCNL1	MT-ND4	BST2	GHG4	PSAP
AL355075.4	IGLV8-61	CD69	NFKB1	CD74	IGLC3	RAB11A
BAZ1A	LINC02506	CD70	NFKBIZ	CD79A	IGLV1-40	RASSF6
CCND2	LMAN1	CNP	NUCB2	CENPC	ITGB7	RPN2
CD164	MIS18BP1	DENND4A	OSTC	CTSH	JSRP1	SCARB2
CHST11	MT-ATP8	DUSP1	P4HB	CTSS	LYN	SELL
CTBS	MYCBP2	EIF2AK3	PSME2	ELL2	MT-CO2	TEX14
CYBA	OR11G2	EPB41	RASGRP3	ERP29	MT-ND2	TMBIM6
EIF2AK2	POU2AF1	FAM30A	RHOH	GPX7	MT-ND3	TRA2B
ERP44	PPIB	FCHSD2	SPATS2	HLA-A	MT-ND4L	UBC
FKBP11	RPRD2	HLA-DRB1	ST6GAL1	HLA-B	MT-ND5	
HELB	RRBP1	IGHG1	STAP1	HLA-C	MX1	
HIST1H2BM	SLC12A6	IGHM	TXNIP	HLA-DQB1	MZB1	
HIST2H2BE	TMF1	IGLC2	UBE2H	HLA-DRA	NCF1	
HLA-DMA	TOP1	IKZF3	USP3	HLA-DRB5	NFKBIA	
HLA-DQA1	TPR	JUN		HLA-E	NUCB1	
HNRNPU	UBAP1	MSI2		HNRNPA2B1	PDIA3	
ICAM1	UBB	MT-ATP6		HSP90B1	PDIA4	
IFI35		MT-CO3		HSPA5	PDIA6	

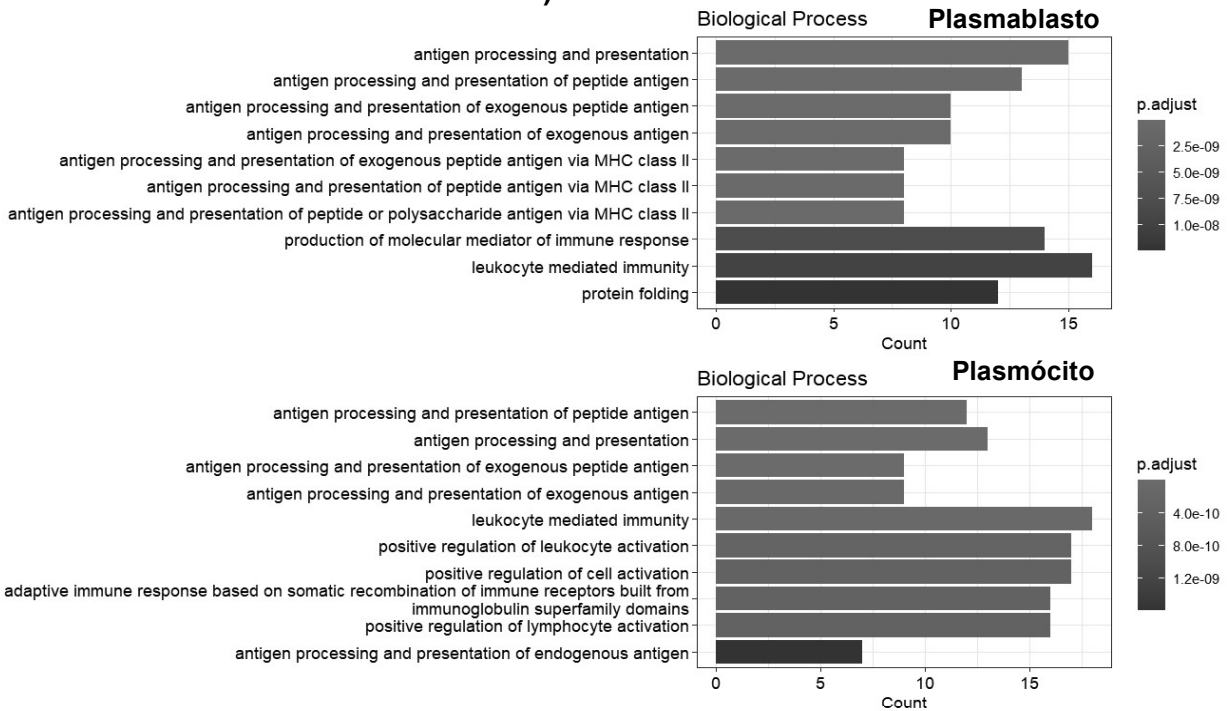
4.7 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO

Com a lista de *DEGs* definida (Tabela 3), fizemos a análise de enriquecimento, com a qual observamos os Processos Biológicos (*Biological Process*), os Componentes Celulares (*Cellular Component*) e as Funções Moleculares (*Molecular Function*) reguladas positivamente nos plasmablastos e plasmócitos do grupo Dengue grave em relação ao grupo Dengue moderada. Comparando as vias que estão reguladas positivamente entre os plasmablastos e os plasmócitos, observamos que a maioria dos Processos Biológicos estão relacionados ao processamento e apresentação de antígenos (Figura 19A). Já é conhecido que ASCs expressam positivamente algumas moléculas de HLA quando fenotipadas devido a seu estado ativado. Agora, um eventual papel delas como células apresentadoras de antígenos foi definido em poucas situações, como no desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 1 (LING et al., 2022). Enquanto para os plasmablastos fica claro que a apresentação está ocorrendo através do complexo de MHC II (Figura 19A), para os plasmócitos a referência a forma de apresentação de antígenos pelo complexo MHC II aparece apenas na Figura 19C, relacionada à função molecular. Plasmablastos, quando imaturos, mantêm a capacidade de APCs até amadurecerem (RASTOGI et al., 2022). Entretanto, como vemos uma massiva expansão das ASCs em infecções com DENV, supomos que se trata de plasmócitos recém-formados e que ainda possuem a função de APCs pelo MHC II.

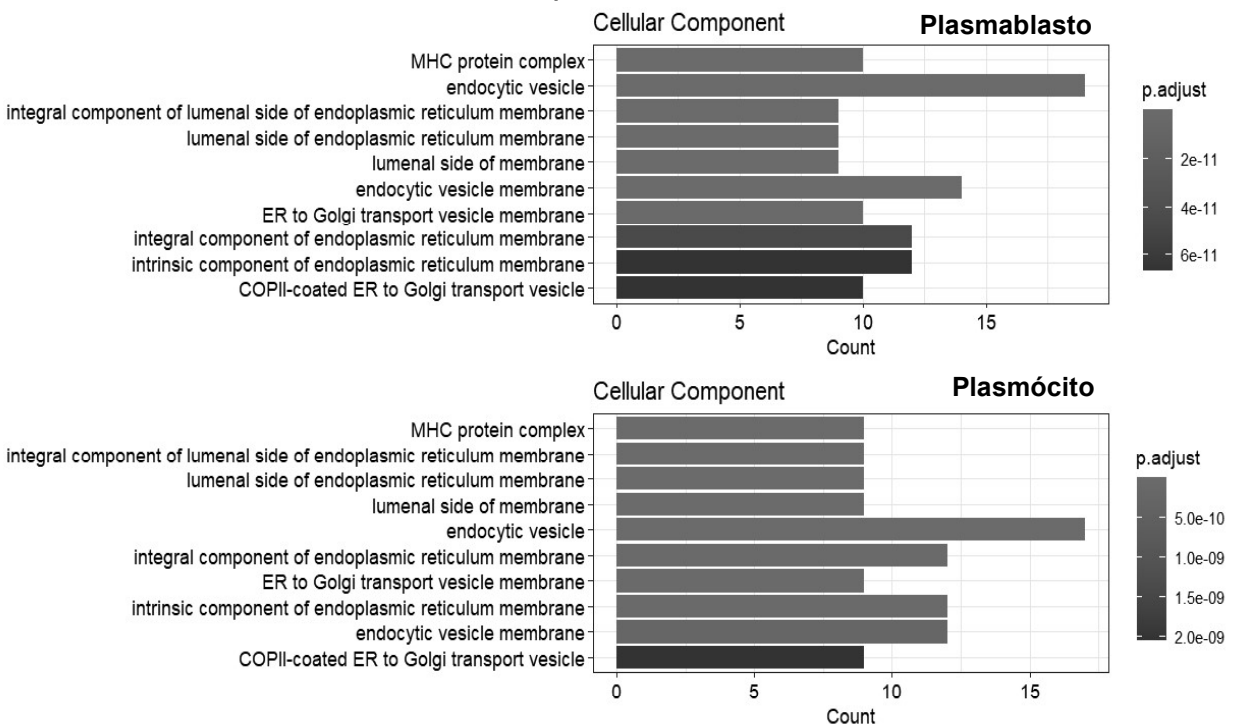
Os componentes celulares de maior expressão em ambas as populações são semelhantes (Figura 19B), e tais componentes como o transporte de vesículas do retículo endoplasmático (RE) para o Complexo de Golgi, as vesículas endocíticas, e os demais processos envolvendo o retículo endoplasmático demonstram que as células estão produzindo e liberando anticorpos (Figura 19B). A função molecular de ambas as células também seguem um padrão parecido entre si, reiterando seu papel como APCs, inclusive para os plasmócitos que apresentam receptores de células T (TCRs - Figura 19C), que se ligam às moléculas de MHC II. Essa interação é fundamental para a ativação da célula T CD4⁺ e para a coordenação da resposta imune, uma vez que as células T CD4⁺ desempenham um papel crucial na ajuda à resposta imune adaptativa, incluindo a ativação de células B. Já no caso dos plasmócitos apresentarem TCRs, falta o esclarecimento se isso é derivado de trogocitose. Esse processo ocorre durante a sinapse imunológica entre uma célula T

e, por exemplo, um eventual plasmócito, onde proteínas da superfície celular da primeira célula poderiam ser transferidas para a superfície da segunda. Se esse processo traz algum benefício funcional para a célula que recebeu proteínas de superfície da célula T, isso necessita de maiores esclarecimentos (JOLY; HUDRISIER, 2003).

A)



B)



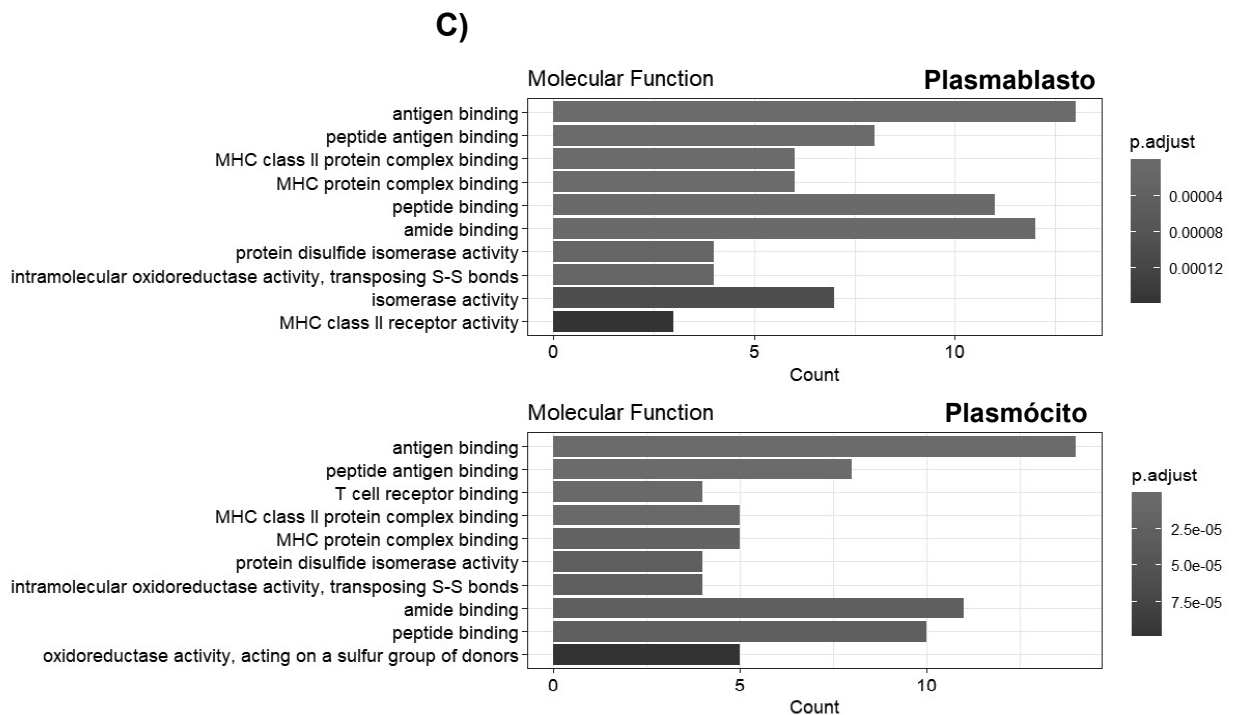


Figura 19 - Análise de Enriquecimento. Todas as vias estão reguladas positivamente. A) Processos Biológicos. B) Componentes Celulares. C) Funções Moleculares. *Counts* é o número de genes relacionados as vias.

Apesar dos plasmócitos e plasmablastos apresentarem genes associados à apresentação de antígenos via a expressão de moléculas de MHC II, elas não apresentam, nas 10 principais vias de enriquecimento, o complexo MHC I que apresenta peptídeos de proteínas intracelulares, incluindo proteínas virais que indicariam que a célula foi infectada pelo vírus (HEWITT, 2003). Desta forma, precisa ser investigado se as ASCs geradas durante a infecção foram anteriormente infectadas pelo DENV. Quanto às demais células B, já é conhecido que elas podem ser infectadas pelo DENV (SILVEIRA et al., 2018).

4.8 ANÁLISE FUNCIONAL DE PLASMABLASTOS E PLASMÓCITOS DE PACIENTES COM DENGUE MODERADA OU GRAVE

Considerando a possibilidade dessas ASCs provenientes de pacientes com Dengue conseguirem apresentar antígenos via MHC classe II a células T, investigamos se essa interação poderia ser funcional ou não. Recentemente, foi demonstrada a existência de plasmablastos ENTDP1+ com características de células supressoras em pacientes com Sepse (NASCIMENTO et al., 2021). Assim, avaliamos

a expressão de ENTPD1 (CD39) nas ASCs e verificamos que, durante o período em que essas células têm seu pico (antes da defervescência - Dia -2 e Dia -1), esse gene tem expressão aumentada em média e em porcentagem de células em relação ao grupo controle (Figura 20). Desta forma, nossos dados indicam que tanto os plasmablastos quanto os plasmócitos apresentam perfil de células apresentadoras de antígenos que induzem uma resposta supressora de células T na infecção por DENV.

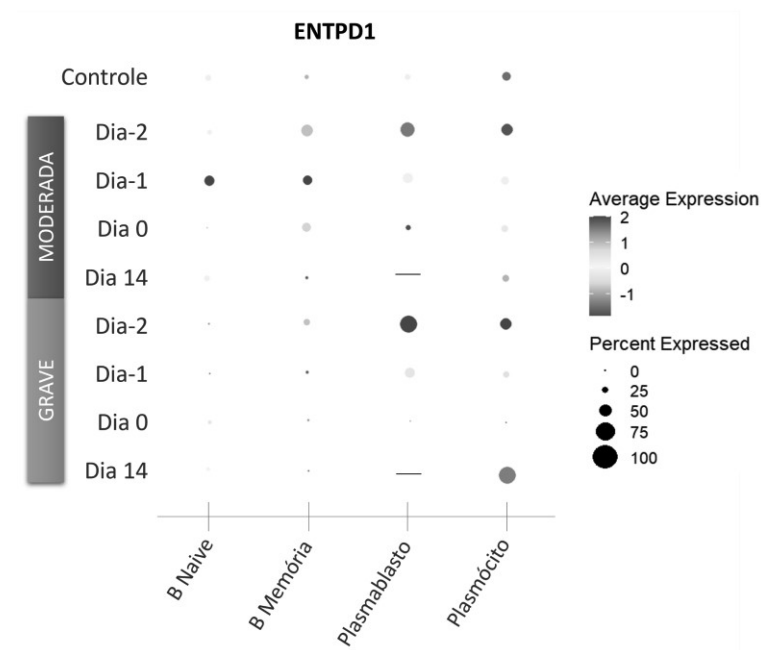


Figura 20 – Plasmablastos e plasmócitos derivados da Dengue moderada e grave apresentam perfil supressores. Cada *DotPlot* apresenta a expressão de ENTPD1 durante a sintomatologia e convalescência da Dengue.

5 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que os parâmetros de seleção de células escolhidos durante a etapa de pré-processamento dos dados (controle de qualidade) foram adequados. Com isso, conseguimos caracterizar fenotipicamente as subpopulações de células B Naive, Intermediária, Memória, Plasmablasto e Plasmócito. Da mesma forma que já foi apresentado pela literatura, células secretoras de anticorpos tem um aumento importante em sua frequência durante o surgimento de sintomas relacionados à Dengue moderada ou grave. No período de convalescência, esses pacientes voltam a apresentar uma distribuição de subpopulações de células B similar à observada em indivíduos saudáveis (controle). Os genes codificadores das enzimas primordiais ao metabolismo do triptofano, IDO1 e IDO2, não são expressos por células B, mas por células derivadas da linhagem monocítica. Mesmo assim, observamos que, com o desenvolvimento da sintomatologia da Dengue, principalmente plasmablastos e plasmócitos alterar o perfil de expressão de outros genes associados à via desse mesmo aminoácido, como HSD17B10, ECHS1 e SIRT3. Com a convalescência, a expressão desses genes retorna ao mesmo padrão observado nos indivíduos controle. A análise de ontologia gênica dessas células secretoras de anticorpos dos pacientes com Dengue moderada e grave aponta para uma eventual atuação também como células apresentadoras de antígenos via moléculas de MHC de classe II. No entanto, por apresentarem uma expressão positiva de ENTPD1 (CD39), nossos dados sugerem que essas células secretoras de anticorpos teriam um perfil supressor, como já observado em pacientes com Sepsis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A.; CUELLAR, S.; WANG, T. Memory B cell and antibody responses to flavivirus infection and vaccination. **Faculty Reviews**, v. 10, 25 jan. 2021.

ALQUICIRA-HERN, J.; EZ. **Nebulosa: Single-Cell Data Visualisation Using Kernel Gene-Weighted Density Estimation**. Disponível em: <<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/Nebulosa.html>>. Acesso em: 21 set. 2023.

ANGELIN, M. et al. Qdenga® - A promising Dengue fever vaccine; can it be recommended to non-immune travelers? p. 102598–102598, 1 jun. 2023.

AMARAL, R. J. V.; PETRETSKI, M. D. Interação Patógeno-Vetor: Dengue. Tópicos Avançados Em Entomologia Molecular. 2012. p. 10, [s.d.].

Anvisa aprova nova vacina para a Dengue. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-Dengue>>.

ARUNACHALAM, P. S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. **Science**, v. 369, n. 6508, p. 1210–1220, 4 set. 2020.

APPANNA, R. et al. Plasmablasts During Acute Dengue Infection Represent a Small Subset of a Broader Virus-specific Memory B Cell Pool. **EBioMedicine**, v. 12, p. 178–188, 1 out. 2016.

AYE, M.; CABOT, J.; WILLIAM, L. Severe Dengue Fever with Haemolytic Anaemia—A Case Study. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 1, n. 1, p. 6, 8 out. 2016.

AZIMUTH. Disponível em: <<https://azimuth.hubmapconsortium.org/references/>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

BACHAL, R. et al. Higher levels of Dengue-virus-specific IgG and IgA during pre-defervescence associated with primary Dengue hemorrhagic fever. **Archives of Virology**, v. 160, n. 10, p. 2435–2443, out. 2015.

BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, p. 10.3402/ieev3i0.19839, 30 ago. 2013.

BECERRA, A. et al. Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected Dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 4, p. 810–817, 1 abr. 2009.

BEGUM, F. et al. Hijacking the Host Immune Cells by Dengue Virus: Molecular Interplay of Receptors and Dengue Virus Envelope. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 323, 6 set. 2019.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of Dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 25 2013.

BONEZI, V. et al. Flavivirus-Mediating B Cell Differentiation Into Antibody-Secreting Cells in Humans Is Associated With the Activation of the Tryptophan Metabolism. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 20, 11 fev. 2020.

BONEZI, V. et al. In Vitro Generation of Human Antibody-Secreting Cells Through the Stimulation of PBMCs with Dengue Virus Particles. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2409, p. 235–244, 1 jan. 2022.

BÜRGER, M. C. **Análise transcricional de RNAs não codificadores longos em pacientes com Dengue**. Mestrado em Bioinformática—São Paulo: Universidade de São Paulo, 20 mar. 2018.

CARMO, R. L. D. et al. Dengue e chikungunya: estudos da relação entre população, ambiente e saúde. p. 79, [s.d.].

CARSETTI, R. et al. Comprehensive phenotyping of human peripheral blood B lymphocytes in healthy conditions. **Cytometry Part A**, v. 101, n. 2, p. 131–139, 18 out. 2021.

CORREA, A. R. V. et al. Dengue Virus Directly Stimulates Polyclonal B Cell Activation. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143391, 10 dez. 2015.

CORREA, A. R. V. et al. Dengue Virus Directly Stimulates Polyclonal B Cell Activation. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143391, 10 dez. 2015.

DAGENAIS-LUSSIER, X. et al. Latest developments in tryptophan metabolism: Understanding its role in B cell immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 59, p. 111–117, 1 jun. 2021.

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.

FISCHER, K. et al. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 4094–4101, 15 dez. 2006.

GARCIA-BATES, T. M. et al. Association between Magnitude of the Virus-Specific Plasmablast Response and Disease Severity in Dengue Patients. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 80–87, 1 jan. 2013.

GARIMILLA, S. et al. Differential transcriptome and development of human peripheral plasma cell subsets. **JCI Insight**, v. 4, n. 9, 2 maio 2019.

GAWOSKI, J. M.; OOI, W. W. Dengue Fever Mimicking Plasma Cell Leukemia. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, n. 8, p. 1026–1027, 1 ago. 2003.

GOMES, A. V. et al. Demethylation profile of the TNF-alpha promoter gene is associated with high expression of this cytokine in Dengue virus patients. **J Med Virol**, v. 88, n. 8, p. 1297-302, Aug 2016.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-65, Jan 31 2015.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. 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**, v. 158, n. 7, p. 1445–1459, jul. 2013.

HAFEMEISTER, C.; SATIJA, R. Normalization and variance stabilization of *single-cell* RNA-seq data using regularized negative binomial regression. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, dez. 2019.

HAO, Y. et al. Integrated analysis of multimodal *single-cell* data. **Cell**, v. 184, n. 13, maio 2021.

HAPUGASWATTA, H. et al. Differential expression of microRNA, miR-150 and enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in peripheral blood cells as early prognostic markers of severe forms of Dengue. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 25, dez. 2020.

HARDEN, J. L. et al. The tryptophan metabolism enzyme L-kynureninase is a novel inflammatory factor in psoriasis and other inflammatory diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 6, p. 1830–1840, jun. 2016.

HEPOJOKI, J. et al. Hantavirus infection-induced B cell activation elevates free light chains levels in circulation. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 8, p. e1009843, 11 ago. 2021.

HEWITT, E. W. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. **Immunology**, v. 110, n. 2, p. 163–169, out. 2003.

HIDARI, K. I. P. J.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 37–43, dez. 2011.

HOLLA, P. et al. Shared transcriptional profiles of atypical B cells suggest common drivers of expansion and function in malaria, HIV, and autoimmunity. **Science Advances**, v. 7, n. 22, p. eabg8384, maio 2021.

JOLY, E.; HUDRISIER, D. What is trogocytosis and what is its purpose? **Nature Immunology**, v. 4, n. 9, p. 815–815, set. 2003.

JORDAN, T. X.; RANDALL, G. Flavivirus modulation of cellular metabolism. **Current Opinion in Virology**, v. 19, p. 7–10, ago. 2016.

KATO, F.; HISHIKI, T. Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral Drug Discovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms. **Viruses**, v. 8, n. 5, p. 122, maio 2016.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–14, 2016.

KORAKA, P. et al. Kinetics of Dengue Virus-Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical Outcome of Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4332–4338, dez. 2001.

KORSUNSKY, I. et al. Fast, sensitive and accurate integration of *single-cell* data with Harmony. **Nature Methods**, v. 16, n. 12, p. 1289–1296, 18 nov. 2019.

KOSMO, M. A.; GALE, R. P. Plasma cell leukemia. **Semin Hematol**, v. 24, n. 3, p. 202-8, Jul 1987.

LI, M. et al. Non-oncogene Addiction to SIRT3 Plays a Critical Role in Lymphomagenesis. **Cancer Cell**, v. 35, n. 6, p. 916-931.e9, jun. 2019.

LING, Q. et al. Increased plasmablasts enhance T cell-mediated beta cell destruction and promote the development of type 1 diabetes. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 28, n. 1, p. 18, 5 fev. 2022.

- LIU, L. et al. Deacetylation of HSD17B10 by SIRT3 regulates cell growth and cell resistance under oxidative and starvation stresses. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 7, 23 jul. 2020.
- LIU, S. et al. HADHA overexpression disrupts lipid metabolism and inhibits tumor growth in clear cell renal cell carcinoma. **Experimental Cell Research**, v. 384, n. 1, p. 111558, 1 nov. 2019.
- LOKE, P. et al. Gene Expression Patterns of Dengue Virus-Infected Children from Nicaragua Reveal a Distinct Signature of Increased Metabolism. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e710, 15 jun. 2010.
- MADY, B. J. et al. Antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection mediated by bispecific antibodies against cell surface molecules other than Fc gamma receptors. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 147, n. 9, p. 3139–3144, 1 nov. 1991.
- MENDONÇA, F. DE A.; SOUZA, A. V. E; DUTRA, D. DE A. Saúde pública, urbanização e Dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, v. 21, p. 257–269, dez. 2009.
- MEYER-HERMANN, M. et al. A theory of germinal center B cell selection, division, and exit. *Cell reports*, v. 2, n. 1, p. 162–74, 2012.
- MIGLIORINI, S. **Metabolismo de triptofano na vigência de choque endotóxico induzido por LPS e hipertriptofanemia**. Mestrado em Análises Clínicas-São Paulo: Universidade de São Paulo, 19 ago. 2011.
- MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (Dengue, Chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 7, 2022 [recurso eletrônico]. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis 2022.
- MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. São Paulo registrou 201 mil casos prováveis de Dengue em 2023, entre janeiro e abril [recurso eletrônico]. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis 2023.
- MURUGESAN, A.; MANOHARAN, M. Dengue Virus. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*, p. 281–359, 2020.
- NASCIMENTO, D. C. et al. Sepsis expands a CD39+ plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. **Immunity**, v. 54, n. 9, p. 2024-2041.e8, 14 set. 2021.
- NEWMAN, A. C. et al. Immune-regulated IDO1-dependent tryptophan metabolism is source of one-carbon units for pancreatic cancer and stellate cells. **Molecular Cell**, v. 81, n. 11, p. 2290- 2302.e7, jun. 2021.
- NGO GENOMICS UA. SSC 5 – Single-cell RNA-seq analysis with *Seurat*. Training course in *single-cell* biology, 2021. 1 vídeo (34 min). Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=DnWwm5_Aynw. Acesso em: dez 2021.
- OPITZ, C. A. et al. The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 1, p. 30–44, jan. 2020.

OVERHOLT, K. J. et al. Dissecting the common and compartment-specific features of COVID-19 severity in the lung and periphery with *single-cell* resolution. **iScience**, v. 24, n. 7, p. 102738, 23 jul. 2021.

PAZ-BAILEY, G. Dengue Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2021. **MMWR. Recommendations and Reports**, v. 70, 2021.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 4 maio 2020.

POPPER, S. J. et al. Temporal dynamics of the transcriptional response to Dengue virus infection in Nicaraguan children. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 12, p. e1966, 2012.

PRIYAMVADA, L. et al. B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are Dominated by Highly Cross-Reactive, Memory-Derived Plasmablasts. **Journal of Virology**, v. 90, n. 12, p. 5574–5585, 15 jun. 2016.

PUIG-BASAGOITI, F. et al. Triaryl Pyrazoline Compound Inhibits Flavivirus RNA Replication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1320–1329, abr. 2006.

RASTOGI, I. et al. Role of B cells as antigen presenting cells. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 954936, 8 set. 2022.

RIVINO, L. et al. Virus-specific T lymphocytes home to the skin during natural Dengue infection. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 278, p. 278ra35, 11 mar. 2015.

ROBINSON, L. N. et al. Structure-Guided Design of an Anti-Dengue Antibody Directed to a Non-immunodominant Epitope. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 493-504, Jul 2015.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, 6 abr. 2010.

ROGHANIAN, A.; NEWMAN, R. **B Cells | British Society for Immunology**. Disponível em: <<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/b-cells>>.

ROTHMAN, A. L. Immunity to Dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 532-43, Jul 15 2011.

ROY, S. K.; BHATTACHARJEE, S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 687–702, out. 2021.

RUSSELL, K. L. et al. A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the safety, tolerability, and immunogenicity of a live-attenuated quadrivalent Dengue vaccine in flavivirus-naïve and flavivirus-experienced healthy adults. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 15 mar. 2022.

SANZ, I. et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 25 nov. 2015.

SEURAT - Guided Clustering Tutorial. Disponível em:

<https://satijalab.org/seurat/articles/pbmc3k_tutorial.html>. Acesso em: 4 abr. 2022.

SILVEIRA, G. F. et al. Human T Lymphocytes Are Permissive for Dengue Virus Replication. **Journal of Virology**, v. 92, n. 10, p. e02181-17, 15 maio 2018.

SORGDRAGER, F. J. H. et al. Tryptophan Metabolism in Inflammaging: From Biomarker to Therapeutic Target. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2565, 30 out. 2019.

ST. JOHN, A. L.; RATHORE, A. P. S. Adaptive immune responses to primary and secondary Dengue virus infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 4, p. 218–230, abr. 2019.

TAKAHASHI, H.; SUZUKI, Y. Cellular Control of Dengue Virus Replication: Role of Interferon-Inducible Genes. Em: SPERANÇA, M. A. (Ed.). . **Dengue - Immunopathology and Control Strategies**. [s.l.] InTech, 2017.

THAI, K. T. et al. High incidence of peripheral blood plasmacytosis in patients with Dengue virus infection. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 12, p. 1823-8, Dec 2011.

UNO, N.; ROSS, T. M. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2018.

VARNAITĚ, R. et al. Expansion of SARS-CoV-2–Specific Antibody-Secreting Cells and Generation of Neutralizing Antibodies in Hospitalized COVID-19 Patients. **The Journal of Immunology Author Choice**, v. 205, n. 9, p. 2437–2446, 1 nov. 2020.

VAZQUEZ, S. et al. Dengue specific immunoglobulins M, A, and E in primary and secondary Dengue 4 infected salvadorian children: Dengue Specific Immunoglobulins M, A, and E. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 9, p. 1576–1583, set. 2014.

VIJAY, R. et al. Infection-induced plasmablasts are a nutrient sink that impairs humoral immunity to malaria. **Nature Immunology**, v. 21, n. 7, p. 790–801, 18 maio 2020.

VIJAY, R. et al. Hemolysis-associated phosphatidylserine exposure promotes polyclonal plasmablast differentiation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 6, p. e20202359, 7 jun. 2021.

VICTORA, G. D.; NUSSENZWEIG, M. C. Germinal centers. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 429–457, 2012.

VICTORA, G. D.; MESIN, L. Clonal and cellular dynamics in germinal centers. **Current Opinion in Immunology**, v. 28, p. 90–96, jun. 2014.

VIEIRA, D. S. et al. Epidemiological profile of Zika, Dengue and Chikungunya virus infections identified by medical and molecular evaluations in Rondonia, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.

XU, W. et al. DHTKD1 is essential for mitochondrial biogenesis and function maintenance. **FEBS letters**, v. 587, n. 21, p. 3587–3592, 1 nov. 2013.

WAICKMAN, A. T. et al. Transcriptional and clonal characterization of B cell plasmablast diversity following primary and secondary natural DENV infection. **EBioMedicine**, v. 54, p. 102733, abr. 2020.

WAICKMAN, A. T. et al. Temporally integrated *single-cell* RNA sequencing analysis of PBMC from experimental and natural primary human DENV-1 infections. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1009240, 29 jan. 2021.

WAHALA, W. M.; SILVA, A. M. The human antibody response to Dengue virus infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374-95, Dec 2011.

WANG, L. et al. ECHS1 suppresses renal cell carcinoma development through inhibiting mTOR signaling activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 123, p. 109750–109750, 1 mar. 2020.

WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition Geneva PP - Geneva World Health Organization, 2009.

WRAMMERT, J. et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute Dengue virus infection in humans. **J Virol**, v. 86, n. 6, p. 2911-8, Mar 2012.

WU, T. et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. **The Innovation**, v. 2, n. 3, p. 100141, ago. 2021.

WU, H.; GONG, J.; LIU, Y. Indoleamine 2, 3-dioxygenase regulation of immune response (Review). **Molecular Medicine Reports**, 1 fev. 2018.

YAM-PUC, J. C. et al. Germinal center reaction following cutaneous Dengue virus infection in immune-competent mice. **Front Immunol**, v. 6, p. 188, 2015.

YAM-PUC, J. C. et al. Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation. **F1000Research**, v. 7, p. 429, 6 abr. 2018.

YAO, C. et al. Sample processing and *single-cell* RNA-sequencing of peripheral blood immune cells from COVID-19 patients. **STAR Protocols**, v. 2, n. 2, p. 100582, 18 jun. 2021.

ZANINI, F. et al. Virus-inclusive *single-cell* RNA sequencing reveals the molecular signature of progression to severe Dengue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 52, 26 dez. 2018.

ZHAI, L. et al. Quantification of IDO1 enzyme activity in normal and malignant tissues. **Methods in Enzymology**, v. 629, p. 235–256, 2019.

ZHANG, Y.-K. et al. Enoyl-CoA hydratase-1 regulates mTOR signaling and apoptosis by sensing nutrients. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 6 set. 2017.

ZHAO, H. et al. Dengue Specific Immunoglobulin A Antibody is Present in Urine and Associated with Disease Severity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27298, jun. 2016.

ZHAO, Q. et al. Attenuation of enoyl coenzyme A hydratase 1 expression in colorectal cancer cells using small interfering RNA inhibits cell proliferation and migration. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 470–474, 4 mar. 2012.