# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Sinalização e metabolismo celulares durante a diferenciação de linfócitos B humanos em secretores de anticorpos na presença do vírus da Dengue *in vitro* e em pacientes com Dengue

# VIVIAN BONEZI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira

São Paulo 2019

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Sinalização e metabolismo celulares durante a diferenciação de linfócitos B humanos em secretores de anticorpos na presença do vírus da Dengue *in vitro* e em pacientes com Dengue

# VIVIAN BONEZI

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira

São Paulo 2019 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

Bonezi, Vivian B712s Sinalização e metabolismo celulares durante a diferenciação de linfócitos B humanos em secretores de anticorpos na presença do vírus da Dengue in vitro e em pacientes com Dengue / Vivian Bonezi. - São Paulo, 2019. 159 p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Silveira, Eduardo 1. Sinalização intracelular. 2. Linfócitos B. 3. Dengue. 4. Metabolismo do triptofano. 5. Células secretoras de anticorpos. I. T. II. Silveira, Eduardo, orientador.

## Vivian Bonezi

Sinalização e metabolismo celulares durante a diferenciação de linfócitos B humanos em secretores de anticorpos na presença do vírus da Dengue *in vitro* e em pacientes com Dengue

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências

> Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira Orientador/Presidente

> > 1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_\_de 2019.

A todos aqueles que, apesar das dificuldades, decidiram fazer ciência no Brasil.

Conforme Ofício Circular nº 19/2018 CPG/CGSI/DPB/CAPES, de 23/11/18, referente a Portaria CAPES nº 206, de 4 de setembro de 2018 :

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

#### AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me ajudaram durante esse doutorado. Muitas mesmo. Seja contribuindo diretamente com o andamento da pesquisa ou simplesmente me apoiando emocionalmente. Não vou conseguir citar todo mundo aqui, por isso, me desculpo de antemão, mas digo: nem por isso foram menos importantes.

#### Agradeço,

Ao meu orientador Professor Eduardo Silveira. Por ter me aceito como aluna em um momento onde muitos teriam fechado portas. E por desde o primeiro momento ter acreditado no meu potencial. Por sempre ter me auxiliado a ir cada vez mais longe por todo o extenso conhecimento partilhado. Se hoje posso dizer que sei algo sobre imunologia de linfócitos B, é graças aos seus ensinamentos. Por toda a paciência, dedicação e apoio nesses anos em que trabalhamos juntos. O meu mais sincero obrigada.

Aos demais alunos do meu laboratório, Mariana Dominguez e André Nunes, pela companhia e auxílio.

Ao Professor Helder Nakaya, do Laboratório de Biologia de Sistemas Computacional (FCF/USP), cujo apoio intelectual e colaboração foram essenciais em todos os momentos. Agradeço também aos seus alunos Patrícia Gonzales e Diógenes Lima, por toda ajuda com bioinformática e pela amizade.

A todos do Laboratório de Virologia Molecular (Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR). Me faltam até palavras para descrever a importância que a ida para o Instituto teve no meu doutorado e na minha vida pessoal. Vocês me ensinaram demais e fizeram de Curitiba uma segunda casa para mim. Em especial, gostaria de agradecer algumas pessoas: a Dra. Claudia dos Santos, por ter aberto as portas do ICC para mim e concedido o uso das cepas virais bem como de toda a instalação. A Pesquisadora Pryscilla Wowk, que hoje é de longe uma das mulheres e pesquisadoras que eu mais admiro e que foi como uma fada madrinha na minha vida. Ganhei muito mais do que orientação e apoio, ganhei uma grande amiga. Aos Pesquisadores Juliano Bordignon e Ana Luiza Pamplona, pelo carinho que me receberam e por todos os ensinamentos compartilhados. E ao aluno Allan Cataneo, por todo o auxílio na realização dos experimentos e, principalmente, pela amizade. Somos um time!

A todos do Laboratório de Parasitologia Clínica (FCF/USP), em especial a Professora Irene Soares, que sempre fez do seu laboratório uma extensão do meu e contribuiu diversas vezes na execução dessa pesquisa.

À Professora Ana Campa, do Laboratório de Bioquímica Clínica (FCF/USP). Primeiramente por toda a empatia demonstrada no meu processo de troca de orientador e em meu exame de qualificação. E, posteriormente, por toda colaboração científica e suporte com as análises do metabolismo do triptofano. Agradeço também às suas alunas Maryana Branquinho e Maysa Braga pelo auxílio na execução dos experimentos.

À Professora Silvya Stuchi e a todos do Laboratório de Peles (FCF/USP), pelo auxílio com os experimentos de Western Blot.

À Professora Sandra Farsky, do Laboratório. Toxicologia Celular e Molecular (FCF/USP), pela contribuição intelectual e por ter cedido alguns reagentes.

Ao Professor Luis Carlos de Souza Ferreira, do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (ICB/USP), e aos seus alunos Lennon Pereira e Samuel Pereira, pelas contribuições nos experimentos de co-cultura utilizando DENV2 e ELISA anti-NS1 respectivamente.

Ao Professor Alexandre Bruni-Cardoso, do Laboratório de Sinalização da Matriz Extracelular (IQ/USP), e aos seus alunos Ana Paula Zen e Antônio Manucci, pelos auxílios nas quantificações proteicas bem como pela doação de alíquotas de alguns dos *primers* utilizados neste trabalho.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico (FCF/USP). Em particular, à Professora Rosario Hirata pela orientação na etapa inicial do meu doutorado, e à técnica Cristina Fajardo pelo constante suporte e por todas as coletas de sangue.

Aos meus pais, por sempre terem investido muito na minha educação e por terem me apoiado, ainda que contrariados, na minha escolha de carreira. Sei que essa jornada não foi fácil para vocês também e, por isso, sou imensamente grata. Amo vocês.

Ao meu irmão, por todas as vezes em que, depois de um dia difícil na USP, me fez companhia no jantar e me arrancou boas risadas. O seu companheirismo e apoio sempre foi e sempre será muito importante para mim. Te amo.

Ao Matheus Garcia Pires, por ter sido o melhor amigo e parceiro que eu poderia ter tido durante essa etapa. A sua compreensão, paciência, torcida e apoio foram fundamentais. Amo você.

A todos os amigos que eu vou levar da USP para a vida. Em especial o Gustavo Tripodi, que merecia uma tese inteira de agradecimento, mas não vai ter para não ficar convencido. E também à Lígia Akemi, Bruna Los, Juliana Germano, Jacqueline Cavalcante, Marcela Frota, Jackeline Beltran, Viviane Schuch, Alysson Urbanski, Maria Carmem e a outros nomes que já foram citados aqui e tantos outros que não foram. Faria todas as minhas escolhas novamente se preciso, só para ter o prazer da companhia de vocês.

A todos os meus amigos de fora da USP, em especial a todos do Núcleo 7 Esferas do Tao. Através de vocês, o Kung Fu fui um importante pilar da minha vida pessoal que indiretamente sustentou muito a minha vida acadêmica.

E à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq, por terem possibilitado a minha formação e a realização deste projeto.

#### Sem a ajuda de todos vocês, eu simplesmente não teria conseguido. Muito obrigada.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. " Arthur Schopenhauer BONEZI, Vivian. Sinalização e metabolismo celulares durante a diferenciação de linfócitos B humanos em secretores de anticorpos na presença do vírus da Dengue *in vitro* e em pacientes com Dengue. 159 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

#### RESUMO

A Dengue é uma doença viral sistêmica, transmitida por mosquitos, que afeta anualmente cerca de 100 milhões de pessoas em todo o mundo. Causada por guatro sorotipos do vírus da Dengue (DENV), suas manifestações clínicas podem variar de assintomáticas à formas que podem levar a óbito. Curiosamente, os pacientes com Dengue apresentam uma resposta exacerbada das células secretoras de anticorpos (ASCs) no sangue cerca de sete dias após o início dos sintomas. A frequência dessas ASCs induzidas pelo DENV representa mais de 50% de todas as células B circulantes no sangue. Essa quantificação é maior que aquelas encontradas em outras infecções virais, contextos de imunização e até mesmo em pacientes com neoplasias de ASCs. Além disso, a magnitude dessa resposta transitória se correlaciona com a gravidade da doença. Então, como a infecção pelo DENV induz essa resposta enorme? Para responder à essa pergunta, combinamos abordagens in vitro e in silico. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de indivíduos saudáveis foram cultivadas in vitro durante sete dias na presença do DENV ou mitógenos. Após a estimulação pelo DENV, as células B presentes nas PBMCs foram capazes de se diferenciarem em ASCs, tanto fenotipicamente guanto funcionalmente, em magnitude similar àquelas estimuladas com mitógenos. Essa diferenciação demonstrou ser dependente da presenca de outras células contidas nas PBMCs, assim como do contato célula-célula. Embora ambos os estímulos tenham sido capazes de induzir a diferenciação de ASCs, eles diferiram metabolicamente e transcricionalmente. PBMCs estimuladas pelo DENV apresentaram um maior consumo de triptofano, associado à maior expressão de IDO1 e IDO2 e maior síntese de guinurenina, bem como maiores expressões de IL-10, BAFF e SYK. Ainda, as concentrações de quinurenina foram positivamente correlacionadas com a enumeração de ASCs nessas culturas. Dados de transcriptoma públicos de pacientes com Dengue também suportam esses achados. Outros flavivírus, como o vírus Zika e a cepa vacinal da Febre Amarela não foram capazes de induzir a mesma magnitude de diferenciação das células B em ASCs in vitro. Tão pouco apresentaram correlação entre a enumeração de ASCs e a síntese de quinurenina. Por fim, através da construção de uma hipotética via de diferenciação de células B em ASCs durante infecção pelo DENV, através da combinação de dados da literatura e transcriptomas públicos, demonstramos que moléculas relacionadas à via do STAT3 (IL-10, IL-6, IRF4 e BLIMP1) estão mais expressas nos pacientes infectados e moléculas que respondem aos sinais de cálcio (Calcineurina, NFATC1, DOK3 e GRB2) estão menos expressas nos pacientes infectados. Esses dados proporcionam um melhor entendimento da resposta de células B durante a infeção pelo DENV, particularmente sobre como o metabolismo e a sinalização das células B estão conectados nesse processo.

**Palavras-chave:** célula B, Dengue, células secretoras de anticorpos, plasmablastos, diferenciação de células B, metabolismo do triptofano, quinurenina, sinalização de células B

BONEZI, Vivian. **B cell signaling and metabolism during antibody-secreting cell differentiation in the presence of Dengue virus** *in vitro* and in Dengue patients. 159 pages. Thesis (Ph.D.) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

#### ABSTRACT

Dengue is a mosquito-borne viral disease that affects annually about 100 million people worldwide. Caused by four Dengue virus (DENV) serotypes, it ranges from asymptomatic to life threatening forms. Curiously, Dengue patients present an exacerbated blood antibody-secreting cell (ASCs) response around seven days after the symptoms onset. The frequency of those DENV-induced ASCs represents more than 50% of all circulating blood B cells. This is greater than found in others viral infections, immunization contexts and even in ASCs related-leukemia patients. Moreover, the magnitude of that transitory response correlates with the disease severity. So, how does the DENV infection induce this enormous response? In order to answer this question we have combined in vitro and in silico approaches. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from healthy individuals were cultured in vitro during seven days in the presence of DENV or mitogens. Upon the DENV stimulation, PBMC-contained B cells were able to differentiate phenotypically and functionally into ASCs, both phenotypically and functionally, in a similar magnitude than mitogen-stimulated cells. This differentiation was demonstrated to be dependent of the presence of the remaining PBMCs, as well as of the cell-cell contact. Although both stimuli were able to induce the ASCs differentiation, they differed metabolically and transcriptionally. DENV-stimulated PBMCs showed higher tryptophan consumption, associated with higher IDO1 and IDO2 expression and higher kynurenine synthesis, as well as higher IL-10, BAFF and SYK expressions compared to mitogen-exposed counterparts. Additionally, the kynurenine concentrations were positively correlated with the ASCs-enumeration in those cultures. Public transcriptome data supports these findings as well. Other flaviviruses, such as Zika virus and the attenuated vaccine Yellow Fever were not able to induce the same magnitude of ASCs differentiation in vitro. Hence, they did not present a correlation between the number of generated ASCs and the supernatant kynurenine levels. Based on the combination of the literature and public transcriptome data, we have constructed a hypothetical B cell differentiation pathway that might be occurring during DENV infection. It displays that STAT3 pathway-related molecules (IL-10, IL-6, IRF4 and BLIMP1) are more expressed in Dengue patients and molecules that respond to calcium signals (Calcineurin, NFATC1, DOK3 and GRB2) are less expressed in Dengue patients than in control. These data provide a better understanding of the B cell response elicited by DENV infection, particularly about how the B cell metabolism and signaling can be connected into this process.

**Keywords:** B cell, Dengue, antibody-secreting cells, plasmablast, B cell differentiation, tryptophan metabolism, kynurenine, B cell signaling

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição global do risco de infecção pelo vírus da Dengue no período de
Figura 2 – Sárie histórica da incidência de Dengue no Brasil
Figura 3 – Representação esquemática e estrutural da partícula do vírus da Dengue
madura e imatura
Figura 4 – Representação do genoma do vírus da Dengue e de sua organização 7
<b>Figura 5</b> – Ciclo de vida do vírus da Dengue
Figura 6 – Carga viral e resposta humoral detectadas após infecção com o vírus da Dengue
Figura 7 – Indução da diferenciação de células B em células secretoras de anticorpos.
Figura 8 – Rede de fatores de transcrição em células B e em células secretoras de
Figure 9 Delineamentes experimentais utilizados peste preioto
Figura 9 – Delineamentos experimentais utilizados neste projeto
Watson for <i>Drug Discovery</i>
Figura 11 – Diagrama de Venn detalhando as intersecções das 10 palavras mais
frequentes nos perfis de busca listados na Tabela 4
<b>Figura 12</b> – Análise da distribuição das amostras selecionadas na plataforma de dados
públicos de transcriptoma, NCBI-GEO, no estudo GEO-Ref: GSE5180842
Figura 13 - Ontologia dos 10 genes mais diferentemente expressos, positiva ou
negativamente, segundo as tabelas 5 e 6 45
Figura 14 – Heatmap representativo da expressão de genes relacionados à ativação de
linfócitos B em sangue total de pacientes sadios (controle), com Dengue moderada (DF)
e com Dengue hemorrágica (DHF)47
Figura 15 - Classificação ontológica baseada na função molecular, dos genes
agrupados em A, B ou C da Figura 14 49
Figura 16 – Via hipotética de moléculas envolvidas na diferenciação de células B em
plasmablastos durante infecção pelo vírus da Dengue
Figura 17 - Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante co-cultura de
linfócitos B e monócitos humanos infectados com DENV2 NGC53
Figura 18 - Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante co-cultura de
linfócitos B e monócitos humanos infectados com DENV4 TVP/360 em diferentes
multiplicidades de infecção (MOIs)54
Figura 19 - Avaliação da capacidade de aquisição do fenótipo duplo positivo
(CD14/CD16) por monócitos mantidos em cultura durante 72h com ou sem a presença
de DENV
Figura 20 - Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante co-cultura de
linfócitos B e monócitos humanos infectados por somente 1 hora com DENV4 TVP/360
Figura 21 - Avaliação da canacidade de geração de ASCs mediante estimulação do
PBMCs por mitógenos durante 5 ou 7 dias

**Figura 22** – Comparação entre a capacidade de geração de ASCs derivadas de PBMCs após infecção por DENV4 TVP/360 em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs)..

Figura 23 – Estratégia de gating utilizada nos ensaios de citometria de fluxo para Figura 24 - Avaliação da capacidade de aquisição do fenótipo de secretora de anticorpos (CD20neg CD27high CD38high) mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360.....64 Figura 25 – Avaliação da capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (IgG) mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 Figura 26 - Heatmap representativo da enumeração de células secretoras de IgG geradas mediante cultura de PBMCs humanas na presenca de mitógenos ou DENV4 Figura 27 - Título de anticorpos IgG anti-NS1 (DENV1-4) no soro dos doadores de sangue para os experimentos in vitro......70 Figura 28 – Avaliação da capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (IgG), entre as amostras doadas por homens ou mulheres, mediante cultura de PBMCs na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360.....71 Figura 29 – Avaliação da capacidade de aquisição do fenótipo (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) e da função (produção de IgG) de secretora de anticorpos mediante cultura de PBMCs humanas na presença de DENV4 TVP/360 ou DENV4 TVP/360 inativado.....73 Figura 30 – Avaliação da capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (produção de IgG) mediante cultura de células B isoladas (CD19+) na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360. .....75 Figura 31 – Avaliação da importância do contato célula-célula e/ou fatores secretados na capacidade de aquisição do fenótipo de secretora de anticorpos (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) mediante cultura de células B (CD19+) humanas em poços de placas de Figura 32 – Avaliação da importância do contato célula-célula e/ou fatores secretados na capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (produção de IgG) mediante cultura de células B (CD19+) humanas em poços de transwell na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360.....79 Figura 33 - Análise quantitativa do triptofano e da quinurenina nos sobrenadantes de culturas estimuladas por mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360. ......81 Figura 34 – Análise quantitativa dos metabólitos do triptofano nos sobrenadantes de culturas de PBMCs estimuladas por mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360..82 Figura 35 - Correlação entre a quantificação de triptofano e quinurenina nos sobrenadantes e a enumeração de células secretoras produtoras de IgG em culturas de Figura 36 – Heatmap representativo da expressão de genes indutores ou repressores da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) no sangue total de pacientes sadios 

Figura 37 - Heatmap representativo da expressão de genes relacionados ao metabolismo do triptofano no sangue total de pacientes sadios (controle), com Dengue Figura 38 - Porcentagem de CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> e correlação entre a quantificação de quinurenina e a enumeração de células secretoras produtoras de IgG Figura 39 – Avaliação da estabilidade dos genes normalizadores (housekeeping) RPL19, GAPDH, B2M e RNA18S, por PCR quantitativa, em amostras de PBMCs tratadas com mitógenos ou infectadas por DENV4 TVP/360......92 Figura 40 – Expressão diferencial dos genes PAX5, BLC6, IRF4 e PRDM1 em culturas Figura 41 – Expressão diferencial dos genes IDO1 e IDO2 em culturas de PBMCs Figura 42 – Expressão diferencial dos genes TNFSF13B e IL10 em culturas de PBMCs Figura 43 – Expressão diferencial do gene SYK em culturas de PBMCs tratadas com Figura 44 – Expressão normalizada dos genes PRDM1, IRF4, PAX5 e BLC6 em células B (CD19+) isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de Figura 45 – Expressão normalizada dos genes NFATC1, STAT3, FOSL1 e SYK em células B (CD19+) isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de Figura 46 – Expressão normalizada dos genes IDO1 e IDO2 em células B (CD19+) e em células CD19 negativas isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis......101 Figura 47 – Expressão normalizada dos genes TNFSF13B e IL10 em células CD19 negativas isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos Figura 48 – Principais fatores hipoteticamente envolvidos na diferenciação de células B em ASCs durante a infecção pelo vírus da Dengue abordados nesse trabalho....... 132

# LISTA DE QUADROS

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificações dos iniciadores (primers) utilizados
Tabela 2 – Especificações dos genes de referência testados
Tabela 3 – Especificações dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo
<b>Tabela 4 –</b> Análise do número total de palavras encontradas, bem como das 10 palavrais
mais frequentes em cada perfil de busca
Tabela 5 – Dez genes mais diferentemente expressos entre amostras de sangue tota
de pacientes sadios (controle), com Dengue moderada (DF) e com Dengue hemorrágica
(DHF)
<b>Tabela 6 –</b> Dez genes mais diferentemente expressos entre amostras de sangue tota de pacientes com Dengue moderada (DF) e com Dengue hemorrágica (DHF)

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DG	2-desoxiglucose			
AA	Ácido antranílico, do inglês Anthranilic Acid			
ADE	Intensificação da infecção viral dependente de anticorpo, do			
	inglês Antibody-dependent Enhancement			
ADPR	Adenosina difosfato-ribose			
AhR	Receptor aril hidrocarboneto, do inglês Aryl hydrocarbon			
A 1/T	receptor			
ANI	Viral Operations / James and Ingles do Ingles V-Akt Munine Thymoma			
APRIL	Ligante indutor de proliferação A, do ingles A proliferation- inducing ligand			
AR-12	Inibidor químico do PI3K. OSU-03012			
ASCs	Células secretoras de anticorpos. do inglês Antibody-Secreting			
	Cells			
BACH2	Domínio BTB e Homólogo CNC 2, do inglês BTB Domain And			
	CNC Homolog 2			
BAFF	Fator de ativação das células B, do inglês B-cell activating fator			
BCL-6	Fator transcricional de linfoma de células B nº6, do inglês B- Cell Lymphoma 6			
BCR	Receptor de linfócitos B, do inglês B Cell Receptor			
BLIMP1	Proteína indutora da maturação induzida de linfócitos B nº1, do			
	inglês B lymphocyte-induced maturation protein-1			
(proteína) C	Proteína estrutural do capsídeo do DENV			
CD	Grupamento de diferenciação, do inglês Cluster of			
	Differentiation			
CD40L	Ligante do receptor de membrana CD40, do inglês Cluster of			
	Differentiation 40 ligant			
cRel	Subunidade no Nf-kB			
CSR	Reação de mudança de classe de imunoglobulina, do inglês			
	class-switch recombination			
CXCR5	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 5, do inglês C-X-C			
	chemokine receptor type 5			

DC	Células dendríticas, do inglês Dendritic Cells				
DCA	Dicloroacetato				
DC-SIGN	Molécula de adesão intercelular não integrina específica				
	das células dendríticas do inglês Dendritic Cell-Specific				
	Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin				
DENV	Vírus da Dengue				
DENV2 NGC	Vírus da Dengue sorotipo 2 isolado clínico da Nova Guiné C				
DENV4 TVP/360	Vírus da Dengue sorotipo 4 cepa laboratorial TVP/360				
DENV4 LRV13/422	Vírus da Dengue sorotipo 4 isolado clínico brasileiro LRV13/422				
DF	Dengue moderada, do inglês Dengue Fever				
DHF	Dengue hemorrágica, do inglês Dengue Hemorragic Fever				
dsRNA	RNA de fita dupla, do inglês Double-Stranded RNA				
(proteína) E	Proteína estrutural do envelope do DENV				
EDI	Domínio I da proteína E do DENV				
EDII	Domínio II da proteína E do DENV				
EDIII	Domínio III da proteína E do DENV				
ELISA	Ensaio imuno-enzimático, do inglês Enzyme-Linked				
	Immunosorbent Assay				
ERK 1/2	Quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2, do ingl				
	Extracellular Signal Regulated Kinases				
GC	Centro germinativo, do inglês Germinal Center				
GEO	Gene Expression Omnibus – plataforma online do NCBI				
	contendo dados públicos de transcriptomas				
GRP78	Proteína regulada pela glicose-78, do inglês glucose-regulating				
	protein 78				
НАТ	Histona acetiltransferase				
HIAA	Ácido 5-hidroxindolacético, do inglês 5-hydroxyindoleacetic				
	acid				
ICOS	Co-estimulador de células T indutível, do inglês Inducible T-cell				
	COStimulator				
IFI27	Proteína alfa induzível por interferons nº27, do inglês Interferon				
	Alpha Inducible Protein 27, também conhecida por ISG12				
	p27				
IFNAR	Receptor de IFN $\alpha \in \beta$ , do inglês <i>interferon-<math>\alpha/\beta</math> receptor</i>				

IFNGR	Receptor de IFNy, do inglês interferon-y receptor		
IFNs	Interferons		
lg	Imunoglobulina		
lghG1	Região constante da cadeia pesada da IgG1		
lghM	Região constante da cadeia pesada da IgM		
IL	Interleucina		
IRF	Fator regulador de interferon, do inglês Interferon Regulatory		
	Factor		
JEV	Vírus da encefalite japonesa, do inglês Japanese Encephalitis		
	Virus		
JNK	Quinases Jun-N-terminais		
KA	Ácido Quinurênico, do inglês Kynurenic Acid		
Kb	Quilobase = 1000 pares de base		
kDa	Quilodalton		
KYN	Quinurenina, do inglês <i>kynurenine</i>		
LSP	Lipopolissacarídeos bacterianos, do inglês lipopolysaccharide		
(proteína) M	Proteína estrutural da membrana do DENV		
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos, do inglês M <i>itogen</i>		
	Activated Protein Kinase		
MDA5	Fator de diferenciação do mieloma – 5, do inglês <i>Melanoma</i>		
	Differentiation-Associated protein 5		
MITF	Fator de transcrição indutor de melanócitos, do inglês		
	Melanocyte Inducing Transcription Factor		
ΜΟΙ	Multiplicidades de infecção, do inglês Multiplicity Of Infection		
MOXD1	Monooxigenase tipo DBH 1 ou monooxigenase X		
mRNA	RNA mensageiro		
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês mammalian target		
	of rapamycin		
NA	Ácido nicotínico, do inglês <i>Nicotinic Acid</i>		
nAbs	Anticorpos neutralizantes, do inglês neutralizing antibodyes		
NAD+	Adenina dinucleotídeo		
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas, do inglês Nuclear factor of		
	activated T-cells		
Nf-κB	Fator nuclear kappa B, do ingles <i>Nuclear Factor kappa B</i>		

NK	Células natural killer				
nm	Nanômetro = 10 <sup>-9</sup> metro				
NS	Proteína não estrutural				
P50	Subunidade no Nf-kB				
P52	Subunidade no Nf-kB				
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase, do inglês Phosphoinositide 3-				
	kinase				
(proteína) NS1	Proteína não estrutural 1				
(proteína) NS2a	Proteína não estrutural 2a				
(proteína) NS2b	Proteína não estrutural 2b				
(proteína) NS3	Proteína não estrutural 3				
(proteína) NS4a	Proteína não estrutural 4a				
(proteína) NS4b	Proteína não estrutural 4b				
(proteína) NS5	Proteína não estrutural 5				
OMS	Organização Mundial de Saúde				
ORF	Fase de leitura aberta do genoma, do inglês Open Reading				
	Frame				
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos, do inglês				
	Pathogen-Associated Molecular Patterns				
PAX-5	Proteína <i>box</i> -pareada 5, do inglês <i>Paired box protein 5</i> )				
PBMCs	Leucócitos do sangue periférico, do inglês Peripheral Blood				
	Mononuclear Cells				
PD-1	Proteína de morte celular programada 1, do inglês Programmed				
	cell death protein 1)				
PI3K	Proteína fosfatidilinositol-3 quinase, do inglês Phosphoinositide				
	3-kinase				
РКТ	Proteínas tirosinas quinases, do inglês Protein Tyrosine				
	Kinases				
PRR	Receptores de padrões moleculares de patógenos, do inglês				
	Pattern Recognition Receptors				
QA	Ácido quinolínico, do inglês <i>Quinolinic Acid</i>				
qPCR	PCR quantitativa				
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso				

RIG-I	Helicase I induzida pelo ácido retinoico, do inglês Retinoic Acid		
	Inducible Gene 1		
RelA	Subunidade no Nf-kB		
RelB	Subunidade no Nf-kB		
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da		
	polimerase, do inglês Reverse Transcription Polymerase Chain		
	Reaction		
SHM	Hipermutação somática, do inglês Somatic Hypermutation		
ssRNA	RNA de fita simples, do inglês single stranded RNA		
STAT3	Transdutor de sinais e ativador da transcrição 3, do inglês		
	Signal transducer and activator of transcription 3		
Tfh	Células T helper foliculares, do inglês Follicular helper T cell		
TGFb/ TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta, do inglês		
	transforming growth fator		
TLR	Receptores do tipo Toll, do inglês Toll Like Receptors		
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês Tumor necrosis fator		
	alpha		
TRP	Triptofano, do inglês <i>tryptophan</i>		
UPR	Resposta a proteínas desenoveladas, do inglês Unfolded		
	Protein Response		
YF	Febre amarela, do inglês Fellow Fever		
YFV/17DD	Vírus da Febre Amarela atunuado utilizado em vacinas		
XBP-1	Proteína de ligação X-box 1, do inglês X-box binding protein 1		
ZIKV	Vírus Zika, do inglês <i>Zika Virus</i>		
ZIKV-MR766	Vírus Zika, isolado clínicos da África MR766		
ZIKV-PE243	Vírus Zika, isolado clínicos de Pernambuco/BR PE243		

# SUMÁRIO

1.	. INT	RODUÇÃO 1
	1.1.	Dengue1
	1.2.	O vírus da Dengue (DENV)5
	1.3.	Infecção pelo DENV7
	1.4.	Resposta imune ao DENV10
2.	OB	JETIVOS
	2.1 C	bjetivo geral22
	2.2.	Objetivos específicos
3.	DE	LINEAMENTO EXPERIMENTAL23
4.	CA	SUÍSTICA E MÉTODOS24
	4.1.	Mineração de dados textuais (Text data minig)24
	4.2.	Análise de dados públicos de transcriptoma24
	4.3.	Amostras25
	4.4.	Cepas virais
	4.5.	Processamento e obtenção de leucócitos mononucleares
	4.6.	Isolamento de células B (CD19+) e monócitos (CD14+) humanos27
	4.7. cultui	Modelo de diferenciação em células secretoras de anticorpos baseado na co- a de monócitos infectados com DENV e linfócitos B
	4.8. difere	Cultura de PBMC ou células B humanas (CD19+) isoladas com mitógenos para nciação das células B em secretoras de anticorpos28
	4.9. flaviv	Infecção de PBMC ou células B humanas (CD19+) isoladas por diferentes
	4.10.	Obtenção das frações de RNA total das amostras29
	4.11.	Quantificação de RNA
	4.12.	Síntese de DNA complementar (cDNA)29
	4.13.	Expressão gênica por Real Time – PCR
	4.14.	Seleção do gene de referência
	4.15.	Citometria de fluxo
	4.16.	ELISPOT
	4.17.	Quantificação de metabólitos da via do triptofano
	4.18.	Determinação da exposição prévia ao DENV por ELISA 34
	4.19.	Titulação viral do sobrenadante das culturas
	4.20.	Análises estatísticas

5. RESULTADOS
5.1. Mineração de dados textuais ( <i>Text data mining</i> ) através do IBM-Watson <i>For Drug Discovery</i>
5.2. Análise de dados de transcriptoma40
5.3. Construção de uma hipotética via de diferenciação de células B em plasmablastos durante infecção pelo DENV50
<ul> <li>5.4. Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante co-cultura de linfócitos</li> <li>B humanos e monócitos infectados com DENV</li></ul>
5.5. Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante estimulação de PBMCs por mitógenos ou infecção por DENV
5.5.1 Padronização do controle positivo – geração de ASCs mediante estímulo por mitógenos
5.5.2 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) a ser utilizada na avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante infecção por DENV4 TVP/360
5.5.3 Avaliação da capacidade de aquisição do fenótipo de secretora de anticorpos (CD20 <sup>neg</sup> CD27 <sup>high</sup> CD38 <sup>high</sup> ) mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/36061
5.5.4 Avaliação da capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (produção de IgG) mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360
5.5.5 Avaliação da importância da integridade viral na indução da diferenciação das células B em ASCs neste modelo72
<ul> <li>5.6. Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante estimulação de células</li> <li>B (CD19+) isoladas por mitógenos ou infecção por DENV</li></ul>
5.7. Avaliação da importância do contato célula-célula e/ou fatores secretados na capacidade de geração de ASCs mediante infecção de PBMCs por DENV4 TVP/360
5.8. Análise dos metabólitos da via do triptofano80
5.8.1. Culturas de PBMCs estimuladas com mitógenos ou infectadas por DENV4 TVP/360
5.8.2. Culturas de PBMCs infectadas por um isolado clínico de DENV (DENV4 LRV13/422), ou por outros flavivírus (ZIKV-PE2343, ZIKV-MR766, YFV/17DD) 88
5.9. Análise da expressão gênica de moléculas envolvidas na diferenciação de células B em ASCs a partir de PBMCs tratadas com mitógenos ou com DENV4 TVP/360
5.10. Análise da expressão gênica de moléculas importantes na diferenciação em ASCs em células CD19+ isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV

6.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	
7.	CONCLUSÕES	
8.	ASPECTOS ÉTICOS	
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
AN	IEXOS	

### 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Dengue

A Dengue é uma infecção viral sistêmica, cujo agente etiológico – o vírus da Dengue (DENV) – é transmitido aos humanos pelas fêmeas dos mosquitos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (SIMMONS et al., 2012). Trata-se da arbovirose de maior prevalência no mundo, com cerca de 390 milhões de infecções estimadas e 96 mil casos reportados anualmente (BHATT et al., 2013; WHO, 2016).

Sua prevalência situa-se, sobretudo, nas faixas tropicais e subtropicais do globo, sendo endêmica em mais de 100 países da Ásia, América Latina, Pacífico e África. Além disso, recentemente, foi responsável por alguns surtos locais

nos Estados Unidos e em partes da Europa (**Figura 1**) (BHATT et al., 2013; SCHAFFNER; MATHIS, 2014; TEETS et al., 2014). Nas últimas décadas, devido ao aumento de sua extensão geográfica, número de casos e gravidade da doença, a Dengue vem sendo reconhecida como um importante problema de saúde pública, apresentando substancial efeito social e econômico (GUZMAN; HARRIS, 2015).



**Figura 1 – Distribuição global do risco de infecção pelo vírus da Dengue no período de 07/02/2019 à 07/08/2019.** As áreas de risco estão representadas pela escala de cor que vai de azul (ausente) à vermelho (presente) e são determinadas por um consenso entre as diferentes fontes, incluindo: sistemas nacionais de vigilância, literatura, questionários e relatórios formais e notícias informais. Relatórios recentes de casos locais ou importados de Dengue, recolhidos a partir de dados oficiais, artigos de jornais e outras fontes de mídia, estão representados pelos círculos vermelhos, tanto para casos locais (círculo pequeno), quanto para casos nacionais (círculo grande). Retirado de: HEALTH MAP (2019).

O Brasil encontra-se entre um dos países mais afetados pela Dengue. Em 2012, um levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) apontou o Brasil como o país líder em número de casos de infecção pelo DENV no período entre 2004 e 2010, seguido da Indonésia e do Vietnam (WHO, 2012). Em 2015, a incidência média de pessoas infectadas ultrapassou os valores epidêmicos, chegando a mais de 900 casos por 100 mil habitantes em estados como Acre, Goiás e São Paulo. Já nos anos seguintes, em particular a partir de 2016, esses valores caíram drasticamente, totalizando nacionalmente apenas 265.934 casos em 2018. (**Figura 2**) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Em geral, isso ocorre em grandes centros urbanos, pois a transmissão da Dengue exibe uma periodicidade interanual, que consiste em surtos a cada 3-5 anos, frequentemente de sorotipos alternados (BENNETT et al., 2010). Entretanto, a razão para uma queda tão abrupta nos casos de Dengue em 2017 no Brasil ainda não foi bem estabelecida (LOPES et al., 2018).



Figura 2 – Série histórica da incidência de Dengue no Brasil. Fonte: SVS (2019).

A transmissão da doença é favorecida em áreas urbanas, pois nelas o mosquito *Aedes aegypti* (principal vetor da Dengue), para o Brasil, encontra condições extremamente favoráveis para sua proliferação. Dentre os fatores que podem estar integrados na sua propagação, destacam-se as temperaturas mais altas, impactos ambientais nos ecossistemas, rápido crescimento demográfico associado à intensa, desordenada urbanização e enfraquecimento dos serviços de saúde pública, além da introdução de novos sorotipos em áreas consideradas indenes (MENDONÇA; SOUZA; DUTRA, 2009). Depois da picada pelo mosquito infectado e de um período de incubação de 4-8 dias, a infecção pelo DENV pode produzir um amplo espectro de formas da doença. Apesar da maioria dos casos se caracterizarem por serem assintomáticos ou subclínicos (total ausência de sintomas e titulação positiva de IgM ou IgG específicos para proteínas do vírus) (KHETARPAL; KHANNA, 2016), parte dos pacientes desenvolvem a forma moderada ou clássica da doença. Esta forma é associada ao surgimento de sintomas inespecíficos, como febre alta e dor no corpo, e ao surgimento de sinais característicos, como a formação de petequias e exantemas, que duram de 5 a 6 dias. Ainda, uma pequena proporção de pacientes avança para as formas graves (hemorrágica ou síndrome de choque) caracterizadas respectivamente por alterações no sistema de coagulação, assim como problemas de caráter cardiorrespiratório, gastrointestinal, neurológico, entre outros, podendo levar o paciente a óbito (KHETARPAL; KHANNA, 2016).

A partir de 2014, o Brasil passou a utilizar uma nova classificação para as formas de Dengue. Esta abordagem enfatiza que a Dengue é uma doença única, dinâmica e sistêmica, que pode evoluir tanto para a remissão dos sintomas quanto para um agravamento clínico. Por estas razões, são necessárias constantes avaliações dos pacientes para que, quando quaisquer intervenções sejam necessárias, elas possam ser prontamente efetivadas, evitando óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Nessa nova classificação, o estadiamento da doença baseia-se em dados de anamnese e exame físico, e subdivide os pacientes em quatro categorias:

- Grupo A, com ausência de sinais de alarme (**Quadro 1**) e ausência de comorbidades, grupo de risco ou condições clínicas especiais;

- Grupo B, com ausência de sinais de alarme (**Quadro 1**) e com presença de sangramento espontâneo de pele (petéquias) ou induzido (prova do laço positiva) e/ou presença de condições clínicas especiais e/ou risco social ou comorbidade;

- Grupo C, presença de algum sinal de alarme (Quadro 1);

- Grupo D, presença de sinais de choque, sangramento grave ou disfunção grave de órgãos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

# Quadro 1 – Sinais de alarme derivados da infecção pelo vírus da Dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

- Dor abdominal intensa (referida ou à palpação) e contínua
- Vômitos persistentes
- Acúmulo de líquidos (ascite, derrame pleural, derrame pericárdico)
- Hipotensão postural e/ou lipotimia
- Hepatomegalia maior do que 2 cm abaixo do rebordo costal
- Sangramento de mucosa
- Letargia e/ou irritabilidade
- Aumento progressivo do hematócrito

Visto que os sintomas da Dengue são similares aos de outras doenças febris, a disponibilidade de testes diagnósticos específicos é extremamente importante para confirmação da doença em casos suspeitos. Várias técnicas têm sido aplicadas para diagnóstico laboratorial da infecção por DENV. Essas técnicas incluem: detecção do vírus (cultura de célula, imunofluorescência), detecção do ácido nucléico viral (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase - RT-PCR), detecção do antígeno viral não estrutural 1 (NS1; ensaio imuno-enzimático - ELISA e ensaio imunocromatográfico - 'teste rápido'), e detecção de anticorpos anti-DENV (inibição da hemaglutinação, teste de fixação do complemento, teste de neutralização e ELISA) (GUZMAN; HARRIS, 2015). Entretanto, dada a cinética variável de cada marcador da doença, não há disponível um teste único que possa ser utilizado para diagnosticar definitivamente infecções pelo DENV em todas as fases da infecção (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). O desempenho de testes diagnósticos para a confirmação de Dengue tem sido avaliado em diferentes estudos (AHMED; BROOR, 2014; FERRAZ et al., 2013; TONTULAWAT et al., 2011). Testes moleculares e sorológicos foram comparados avaliando a exatidão e a capacidade de diagnóstico precoce da infecção por DENV, objetivando determinar a porcentagem de contribuição que cada teste pode adicionar ao diagnóstico final (AHMED; BROOR, 2014; FERRAZ et al., 2013; TONTULAWAT et al., 2011). No Brasil, o Ministério da Saúde indica em seu protocolo de diagnóstico e manejo clínico, alguns desses métodos para confirmação laboratorial de Dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Normalmente, são solicitados RT-PCR para detecção do ácido nucléico viral ou ensaio imunocromatográfico - 'teste rápido' - para NS1 até o quinto dia do início dos

sintomas. Já a partir do sexto dia, é solicitada sorologia pelo método ELISA para detecção de imunoglobulinas anti-DENV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Se positivos, o caso é confirmado. Se negativos, uma nova amostra de sangue é ou deveria ser coletada para posterior realização de análise sorológica.

Por não possuir nenhum tratamento específico, a base do seu manejo está no gerenciamento dos fluidos, com monitoração cuidadosa dos órgãos e correção de distúrbios metabólicos. Níveis baixos de cálcio no sangue (hipocalcemia) são encontrados durante a infecção pelo DENV, podendo ser ainda mais pronunciados nas formas mais graves da doença. Além disso, o cálcio também tem sido implicado na imunopatogênese da Dengue. No entanto, as implicações clínicas precisas dessas interações ainda não estão claramente definidas (SHIVANTHAN; RAJAPAKSE, 2014). Ainda, quando não controlado, o aumento da permeabilidade vascular pode levar a perda de um grande volume de sangue, resultando em choque hipovolêmico e até mesmo morte. Por tal razão, o monitoramento diário do hematócrito e do número de plaquetas faz-se necessário por pelo menos 2-3 dias durante o período de febre. A redução do número de plaquetas é acompanhada da redução sérica de serotonina (envolvida na agregação plaquetária), podendo atuar conjuntamente como marcadores prognósticos do agravamento da doença (CUI et al., 2016). O precursor da serotonina, o triptofano, também se encontra reduzido durante a infecção pelo DENV, sendo essa redução ainda mais proeminente nas formas graves da doença (BECERRA et al., 2009a). Além disso, pacientes com Dengue também apresentam maior atividade das enzimas Indoleamina 2,3-Dioxigenase 1 e 2 responsáveis por catabolizar o triptofano em quinurenina (BECERRA et al., 2009a), sugerindo que este metabolismo possui um papel na patogênese da Dengue.

#### 1.2. O vírus da Dengue (DENV)

O DENV possui quatro sorotipos, identificados como DENV-1 a 4 (GUBLER et al., 1979). Embora geneticamente diversos, eles compartilham certa identidade entre seus aminoácidos (cerca de 60-75%) (SIMMONS et al., 2016). Porém, ainda que todos os sorotipos possuam capacidade similar de infecção, suas variações genéticas são importantes determinantes da virulência e potencial de epidemia (COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005). Assim como outros vírus da família Flavivírus, o DENV apresenta morfologia esférica, com 40-50 nm de diâmetro, contendo um

genoma de RNA fita simples, senso positivo, envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico. Este nucleocapsídeo é circundado por uma membrana lipoprotéica, contendo proteínas do envelope e membrana ou pré-membrana – dependendo da maturidade do vírus (**Figura 3A** e **3B**) (GUZMAN et al., 2010; KUHN et al., 2002).



Figura 3 – Representação esquemática e estrutural da partícula do vírus da Dengue, madura e imatura. A- Representação esquemática da partícula viral do DENV, imatura (esquerda) e madura (direita). B- Representação estrutural em 3D da superfície da partícula do DENV, imatura (esquerda) e madura (direita). E: proteína do envelope; prM: proteína precursora da proteína M (pré-membrana); M: proteína de membrana; C: proteína C (core ou capsídeo). Modificado de HEINZ; STIASNY (2017).

Seu genoma, presente no interior do nucleocapsídeo, possui aproximadamente 11 Kb de comprimento e uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*) que expressa uma poliproteína de aproximadamente 370 kDa. Após clivagens nesta poliproteína, três proteínas estruturais do DENV são originadas (core ou capsídeo [C], que compõe o nucleocapsídeo; membrana [M], que é um fragmento proteolítico de sua percursora, a pré-membrana [prM]; e envelope [E], envolvida na interação das partículas virais com receptores celulares). Da mesma forma, também são originadas sete proteínas não estruturais (NS, do inglês *non structural*): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Com ajuda das proteínas hospedeiras, elas remodelam a organização interna da célula, replicam o RNA viral e ajudam o vírus a escapar do sistema imunológico (**Figura 4**) (EL SAHILI; LESCAR, 2017; GUZMAN; HARRIS, 2015; KUHN et al., 2002).



**Figura 4 – Representação do genoma do vírus da Dengue e de sua organização.** C: proteína C (core ou capsídeo); E: proteína do envelope; prM: proteína precursora da proteína M (pré-membrana); M: proteína de membrana;NS: proteínas não estruturais, do inglês *non structural.* 

### 1.3. Infecção pelo DENV

O ciclo do DENV em humanos se inicia com a inoculação de partículas virais através da picada do mosquito infectado. Após serem introduzidas na derme do hospedeiro, ocorre a invasão das células alvo (principalmente macrófagos e células dendríticas, incluindo as células de Langherans residentes na pele) e o início do ciclo de replicação viral, didaticamente separado em: adsorção, penetração, desnudamento, tradução, replicação, montagem, e brotamento das partículas virais (**Figura 5**) (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A entrada do vírus na célula hospedeira envolve a endocitose mediada por diversos receptores celulares aos quais se ligam as proteínas do envelope viral (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Entre estes receptores, temos: a

Molécula de adesão intercelular não integrina específica das células dendríticas (DC-SIGN; do inglês Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), a proteína regulada pela glicose-78 (GRP78; do inglês glucoseregulating protein 78), o receptor de manose, moléculas associadas a CD14, entre outros. Além disso, a infecção parece depender da interação com receptores auxiliares como o heparan sulfato e outros glicosaminoglicanos (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). Seja qual for a molécula envolvida, uma vez que a ligação entre o vírus e um receptor da célula do hospedeiro ocorre, as partículas virais são internalizadas através da formação de vesículas endocíticas recobertas por clatrina. De lá, elas trafegam para o compartimento pré-lisossomal endocítico, onde, com a maturação desse compartimento ocorre a acidificação do pH em seu interior. Essa redução no pH lisossomal permite uma mudança conformacional nas proteínas estruturais virais, induzindo a fusão entre o envoltório viral e a membrana da célula hospedeira para liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Em consequência, o RNA é desnudado, ficando disponível para replicação viral e associação ao retículo endoplasmático rugoso (RER), onde ocorre a tradução da poliproteína viral. A associação do complexo de replicação às membranas do RER é mantida principalmente através das interações envolvendo as proteínas não estruturais do vírus (Figura 5) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Assim como a replicação e tradução, a montagem dos vírions também ocorre em associação com as membranas intracelulares. Inicialmente múltiplas cópias de C interagem com uma única cópia de RNA genômico no citoplasma, para formar o nucleocapsídeo. Em seguida, as partículas adquirem o envelope a partir do brotamento para o lúmen do RER em um processo rápido e coordenado (**Figura 5**) (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; SCREATON et al., 2015). As proteínas E e prM são sintetizadas simultaneamente e permanecem integradas às membranas do RER através de âncoras transmembranais da região C-terminal. No lúmen do RER, os vírions formado aqui são partículas imaturas de superfície irregular, e projeções formadas pelos heterotrímeros de prM-E. Nessas projeções, as três subunidades de prM recobrem os peptídeos de fusão localizados no topo das subunidades de E (**Figuras 3 e 5**) (SCREATON et al., 2015).



Figura 5 – Ciclo de vida do vírus da Dengue. Modificado de PIERSON (2002).

Após completa montagem, essas partículas são transportadas а individualmente até o complexo de Golgi através de vesículas. A maturação das partículas virais ocorre em duas etapas. Primeiramente, a redução do pH induz uma mudanca conformacional irreversível nas proteínas prM e E. Em seguida, uma protease residente no complexo de Golgi, furina, cliva o peptídeo pr, liberando M. Essa clivagem gera uma desorganização do heterotrímero e permite a reorganização de E em homodímeros, os quais formam a superfície esférica e regular das partículas virais maduras (Figuras 3 e 5) (SCREATON et al., 2015). Finalmente, os vírions maduros percorrem a via secretora do Golgi, acumulam-se no compartimento endossomal e são liberados da célula por exocitose, podendo infectar novas células (Figura 5) (SCREATON et al., 2015).

Em razão da forma de inoculação, o DENV tende a infectar primeiramente células de origem monocítica, como células dendríticas e macrófagos, assim como fibroblastos. Em seguida, essas células monocíticas infectadas migram para os linfonodos drenantes, facilitando a disseminação viral e tornando a infecção sistêmica.

Essa segunda série replicativa amplifica a progênie viral e origina o estado virêmico, no qual o vírus espalha-se pela corrente sanguínea e linfática através da infecção de células mononucleares e, finalmente, por diversos órgãos (JESSIE et al., 2004; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Apesar de células dendríticas, monócitos e macrófagos desempenharem o papel principal na infecção e replicação do DENV, estudos têm demonstrado outras células sanguíneas, como as células T e B, também são permissivas ao vírus durante a infecção (CORREA et al., 2015; SILVEIRA et al., 2018; YAM-PUC et al., 2015). Recentemente, foi sugerido que células B podem ser infectadas *in vivo* (SILVEIRA et al., 2018; YAM-PUC et al., 2015) ou *in vitro* (CORREA et al., 2015). No entanto, as partículas virais liberadas destas células B *in vitro* não se mostram funcionais (CORREA et al., 2015).

#### 1.4. Resposta imune ao DENV

A resposta imune à infecção pelo DENV é constituída tanto por mecanismos da imunidade inata como adaptativa. Quanto à resposta imune inata, ela é a primeira linha de defesa contra a infecção pelo DENV. Sua ativação é decorrente da produção de interferons (IFNs) tipo I, alfa e beta, pelas células infectadas (GOMES et al., 2010; HO et al., 2005). A produção dessas citocinas é provocada pela detecção de estruturas conhecidas como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês Pathogen-associated molecular patterns). Neste caso, RNAs do DENV de fita dupla ou simples que aumentam de concentração após os primeiros ciclos de replicação viral são reconhecidos por sensores específicos do hospedeiro, denominados receptores de reconhecimento de padrão (PPRs, do inglês Pattern Recognition Receptors) (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011). Vários PRRs estão envolvidos na detecção do DENV, entre eles a RNA helicase I induzida pelo ácido retinoico (RIG-I, do inglês Retinoic Acid Inducible Gene 1), o fator 5 de diferenciação do mieloma (MDA5, do inglês Melanoma Differentiation-Associated protein 5) (NASIRUDEEN et al., 2011; NG; KATO; FUJITA, 2012), e os receptores do tipo Toll (TLR, do inglês Toll like receptors), principalmente TLR3 e TLR7 (LIANG et al., 2011; TSAI et al., 2009). Os TLRs 3 e 7 estão localizados nas vesículas citoplasmáticas, tais como endossomo e RER, sendo que TLR3 detecta RNA de fita dupla (dsRNA, do inglês Double-Stranded RNA), enquanto TLR7 reconhece RNA de fita simples

(ssRNA, do inglês *single stranded RNA*). Já RIG-I e MDA5 foram identificados como receptores citoplasmáticos de dsRNA (KELSALL et al., 2002). Após a detecção destes PAMPs pelos PRRs, a célula ativa múltiplas vias de sinalização que induzem a translocação nuclear de uma série de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NFκ-B, do ingles *Nuclear Factor kappa B*) e os fatores reguladores de interferons (IRF, do inglês *Interferon regulatory factors*) 3 e 7, a coordenar programas antivirais via indução de IFN-I (DEJNIRATTISAI et al., 2008). Essa resposta desencadeia a transcrição de muitos genes que influenciam a síntese proteica, regulação da apoptose e proliferação celular. Isso acarreta em uma maior maturação das células dendríticas (DC, do inglês *Dendritic cells*), citotoxicidade das células NK (*natural killers*) e diferenciação dos linfócitos T citotóxicos (CD8+), proporcionando, assim, uma ligação importante entre respostas imunes inata e adaptativa (KUTUBUDDIN et al., 1991).

Quanto à resposta imune adaptativa, o processo de apresentação de antígenos do DENV é fundamental para sua plena ativação. As DCs são consideradas as células apresentadoras de antígenos as mais eficientes (BANCHEREAU; LEBECQUE; LIU, 2000; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; GUÉRY; ADORINI, 1995; ROTHOEFT et al., 2006). Logo após a infecção pelo DENV, as DCs, infectadas ou não, são ativadas e migram aos linfonodos para posterior apresentação de antígenos (KELSALL et al., 2002). Nesses locais, antígenos virais previamente processados e complexados às suas moléculas de HLA de classe I e II são apresentados principalmente à linfócitos T CD8+ e T CD4+ respectivamente (DEJNIRATTISAI et al., 2008; KUTUBUDDIN et al., 1991). Enquanto as células T CD8+ ativadas produzem INF-gama e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α, do inglês Tumor necrosis fator alpha) e são responsáveis pela lise de células infectadas via degranulação de granzimas e perforinas (DEJNIRATTISAI et al., 2008), as células T CD4+ ativadas produzem citocinas pró (IFN-y, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-21) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-13) e auxiliam na ativação de linfócitos T CD8+ (APPANNA et al., 2007; DEJNIRATTISAI et al., 2008; SIMMONS et al., 2005), e de linfócitos B CD19+ (HO et al., 2001; UBOL; HALSTEAD, 2010).

Quanto à importância da resposta humoral, proveniente das células B, destacase o fato que os anticorpos produzidos podem controlar a infecção viral bloqueando a interação do vírus com a célula hospedeira, em um processo chamado neutralização (WAHALA; DE SILVA, 2011). Durante a infecção primária, os principais alvos dos anticorpos são as proteínas estruturais E, prM e C, além da proteína NS3 (ROTHMAN, 2011). No entanto, essa resposta humoral acaba não sendo efetiva, pois ela apresenta sua maior magnitude no soro normalmente após o declínio da viremia (**Figura 6**) (GUZMAN et al., 2010).



Figura 6 – Carga viral e resposta humoral detectadas após infecção com o vírus da Dengue. Modificado de GUZMAN et al. (2010).

Em geral, estes anticorpos até reagem cruzadamente contra diferentes sorotipos do DENV, mas neutralizam preferencialmente partículas virais do sorotipo envolvido na infecção primária. No entanto, recentemente foi demonstrado que diferentes epítopos de E podem induzir anticorpos neutralizantes (nAbs, do inglês *neutralizing antibodyes*) contra os 4 sorotipos. Dentre os alvos destes nAbs estão epítopos lineares e conformacionais dos domínios EDI, EDII e EDIII (DEJNIRATTISAI et al., 2015), além da cadeia principal do loop de fusão da E, cadeias conservadas de glicano e sítio de ligação de prM durante a maturação viral (DEJNIRATTISAI et al., 2015).

Acredita-se que essa proteção sorotipo-específica é devido à produção de nAbs e da ativação de células T de memória específica para DENV, conferindo imunidade contra este mesmo sorotipo por longo período. Contudo, se infectado por um sorotipo viral diferente, alguns daqueles anticorpos pré-existentes reagiriam contra o novo sorotipo, formando imunocomplexos. Normalmente, estes anticorpos possuem baixa capacidade de neutralização para um sorotipo diferente. Assim, esses imunocomplexos acabam sendo internalizados por macrófagos através de receptores Fc e escapam do endossomo para o citoplasma. Tendo acesso à maquinaria de replicação da célula do hospedeiro, há um posterior aumento da carga viral. Este processo, conhecido como Intensificação da infecção viral dependente de anticorpo
(ADE, do inglês *Antibody-dependent Enhancement*), permite que um maior número de células sejam infectadas, particularmente no inicio da infecção, e está associado ao risco de desenvolvimento de Dengue grave em infecções secundárias (MATHEW et al., 2011; MIDGLEY et al., 2011; ROTHMAN, 2011; SARIOL; NOGUEIRA; VASILAKIS, 2018). A ocorrência de ADE durante uma infecção secundária pelo DENV já foi documentada *in vitro* (PUERTA-GUARDO et al., 2010), em camundongos (ZELLWEGER et al., 2014), em primatas não humanos (BORGES et al., 2019) e em humanos (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013). Ainda, em razão das semelhanças estruturais e da co-circulação endêmica com o virus Zika (ZIKV), a ocorrência de ADE em infecções pelo virus Zika (ZIKV) por imunidade preexistente ao DENV pode ser induzida *in vitro* (HALSTEAD; PORTERFIELD; O'ROURKE, 1980) e em camundongos imunodeficientes (BARDINA et al., 2017), por outro, não há evidências para apoiar a ocorrência ADE em primatas não humanos (PANTOJA et al., 2017) ou em humanos (TERZIAN et al., 2017).

O conhecimento dos aspectos celulares envolvidos na resposta humoral vem ganhando cada vez mais importância, principalmente através de estudos focados em plasmablastos. Isso porque plasmablastos representam uma população de células secretoras de anticorpos (ASCs, do inglês antibody secreting cells), detectáveis no sangue periférico e geradas após um estímulo antigênico, sendo este derivado de infecção ou vacinação (CARTER et al., 2017). Avaliações do número de plasmablastos têm sido amplamente utilizadas para descrever a magnitude ou espectro da resposta imune celular e humoral após vacinação (ELLEBEDY et al., 2016; HE et al., 2011). A quantificação dessas células pode fornecer dados importantes relativos à especificidade do anticorpo produzido, seu isotipo e o tempo da resposta dos plasmablastos (CARTER et al., 2017). Com relação à resposta celular que suporta a produção de anticorpos durante a Dengue, ela é extremamente alta e específica. Pacientes infectados pelo DENV apresentam um grande aumento na frequência de plasmablastos na circulação, com pico detectado em cerca de sete dias após o desenvolvimento dos sintomas. Já foi demonstrado que a grande maioria destes plasmablastos é específica a epítopos do envelope viral (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012). Além disso, pacientes que apresentam Dengue grave têm uma maior magnitude de resposta de plasmablastos específicos que os pacientes com Dengue moderada (THAI et al., 2011). Curiosamente, a quantidade de

plasmablastos oriundos desta resposta equivale a mais de 50% de todas as células B circulantes no sangue. Essa representatividade é muito maior que a observada durante respostas imunes induzidas contra outros flavivírus (vacina da febre amarela) ou outros vírus (gripe), as quais não atingem 10% de média (WRAMMERT et al., 2012).

A presença destas células no sangue periférico em frequência superior a 1% ou 2% das células B circulantes é rara. Valores equivalentes a 20% ou mais sugerem leucemia plasmocitária ou mieloma, possuindo mal prognóstico ambas as doenças (KOSMO; GALE, 1987). Relatos de casos demonstram que infecções pelo DENV induzem uma frequência de plasmablastos tão elevadas que assemelham-se à leucemia plasmocitária (J.M.; W.W., 2003; THAI et al., 2011). Embora isso seja visto em cerca de 64% a 73% dos pacientes infectados por DENV (THAI et al., 2011; WRAMMERT et al., 2012), como a infecção pelo DENV é capaz de induzir uma resposta tão alta de plasmablastos?

A diferenciação de células B em ASCs é complexa, sendo mediada por sinais extrínsecos às células, como contatos com co-receptores de células circundantes e alterações no microambiente (citocinas e quimiocinas), quanto sinais intrínsecos, através de uma coordenada regulação da expressão gênica a níveis epigenéticos, transcricionais e pós-transcricionais (BARWICK et al., 2016; COFFRE; KORALOV, 2017; NERA et al., 2006). No que diz respeito aos sinais extrínsecos, ASCs são geradas como resultado de interações cognatas entre células B antígeno-específicas, T CD4+ e DCs em resposta à antígenos (MOENS; TANGYE, 2014). Essas interações podem levar as células B a se tornarem, rapidamente, plasmablastos (ASCs circulantes e de vida curta), os quais promovem uma onda inicial de proteção contra o patógeno invasor (NUTT et al., 2015). Podem ainda, levar a formação de centros germinativos (GC, do inglês Germinal Centers), estruturas especializadas dos folículos de tecidos linfóides secundários, onde ocorrem as reações de mudança de classe de imunoglobulina (CSR, do inglês class-switch recombination) e hipermutação somática (SHM, do inglês Somatic Hypermutation) das regiões variáveis das imunoglobulinas (Ig) (DE SILVA; KLEIN, 2015). Essas células B do GC podem, então, dar origem às ASCs (plasmablastos de vida curta e/ou plasmócitos de vida longa) ou células B de memória (NUTT et al., 2015). Esses eventos de diferenciação são, em partes, regulados pelas células T helper foliculares (Tfh, do inglês Follicular helper), distinto subtipo de células T CD4+ caracterizadas pela expressão do fator

transcricional de linfoma de células B nº6 (Bcl-6, do inglês B-Cell Lymphoma 6), dos marcadores de membrana como o receptor de quimiocina C-X-C tipo 5 (CXCR5, do inglês C-X-C chemokine receptor type 5), a proteína de morte celular programada 1 (PD-1, do inglês Programmed cell death protein 1), o co-estimulador de células T indutível (ICOS, do inglês Inducible T-cell COStimulator) e o ligante CD40 (CD40L), e da produção de várias citocinas, como IL-4, IL-10 e IL-21 (CROTTY, 2011; DE SILVA; KLEIN, 2015; MA et al., 2012). Células Tfh localizam-se nos folículos e GC, onde interagem com células B e medeiam sua maturação em células B de memória ou diferenciação em ASCs (CROTTY, 2011; MA et al., 2012). As citocinas exibem considerada redundância em suas funções (FIETTA; COSTA; DELSANTE, 2014). Ao interagirem com receptores de membrana específicos, elas iniciam vias de transdução de sinais que são críticas para diversos espectros de funções, como indução da resposta imune, proliferação, diferenciação celular e apoptose (FIETTA; COSTA; DELSANTE, 2014). A contribuição chave das citocinas durante a diferenciação das células B em ASCs baseia-se na habilidade dessas moléculas em modular a expressão de diversos fatores de transcrição, de modo que eles regulem a secreção de anticorpos pelas células B ativadas (MOENS; TANGYE, 2014). O efeito das citocinas na diferenciação das células B é evidenciado não apenas pela magnitude da resposta de anticorpos, mas também pela gualidade, em termos de isotipo, de la induzida (BRIÈRE et al., 1994; PUNNONEN et al., 1993). Além das citocinas secretadas pelas Tfh, outras também já tiveram suas participações descritas nesse processo, como IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IFNs, TNF-α, o fator de ativação das células B (BAFF, do inglês B-cell activating fator) e o ligante indutor de proliferação A (APRIL, do inglês A proliferation-inducing ligand) (Figura 7) (MOENS; TANGYE, 2014).



Figura 7 – Indução da diferenciação de células B em células secretoras de anticorpos. Modificado de MOENS; TANGYE (2014).

Infecções pelo DENV sabidamente induzem uma alta ativação resposta imune mediante a produção de uma "tempestade" de citocinas (SRIKIATKHACHORN; MATHEW; ROTHMAN, 2017). Entretanto, se essa é a principal razão pela alta frequência de plasmablastos vista durante a doença, ainda não foi bem estabelecido. De qualquer forma, é inegável que ela contribui para a diferenciação. Inclusive, recentemente, foi demonstrado que monócitos CD14+ CD16+ auxiliam no desenvolvimento da resposta humoral contra o vírus da Dengue através da indução de plasmablastos *in vitro* via expressão de BAFF/APRIL e IL-10 (KWISSA et al., 2014).

No que diz respeito aos sinais intrínsecos, a diferenciação das células B em ASCs requer mudanças coordenadas na expressão de centenas de genes (SHI et al., 2015). Estas mudanças resultam, dentre outras coisas, em grandes alterações estruturais nos componentes do RER, permitindo o aumento da produção e do tipo de Ig associada à membrana celular (característica das células B) para a forma secretada (característica das ASCs) (SHAFFER et al., 2004). Este processo de regulação gênica é mediado tanto por alterações epigenéticas, como modificações de histonas e metilações do DNA (BARWICK et al., 2016; KULIS et al., 2015; ZAN; CASALI, 2015), quanto por alterações transcricionais (NUTT et al., 2015) e pós transcricionais (COFFRE; KORALOV, 2017; ZAN; CASALI, 2015), coordenadas por fatores de

transcrição e RNAs não codificadores respectivamente. Quanto à regulação epigenética, já foi demonstrado que para o processo de diferenciação de células B em ASCs é necessária uma intensa perda na metilação de regiões específicas do genoma associadas a fatores transcricionais das ASCs ou regiões promotoras dos mesmos. Entre essas regiões, é possível citar *loci* próximos aos genes do fator regulador de interferon 4 (IRF4, do inglês *Interferon regulatory factor 4*), da proteína indutora da maturação induzida de linfócitos B nº1 (BLIMP1, do inglês *B lymphocyte-induced maturation protein-1*) e da proteína de ligação X-*box* 1 (Xbp1, do inglês *X-box binding protein 1*) (BARWICK et al., 2016; KULIS et al., 2015). Esse processo de demetilação é acompanhado de modificações em histonas, principalmente acetilações, tornando essas histonas ativas e suas cromatinas acessíveis para a maquinaria de transcrição (BARWICK et al., 2016; ZAN; CASALI, 2015). Em outras palavras, a combinação desses dois processos permite uma maior expressão de genes essenciais para a diferenciação dessas células.

Desregulações epigenéticas podem resultar em resposta aberrante humoral a antígenos exógenos ou próprios, além de contribuírem diretamente com a linfomagênese de células B na maioria dos tumores (ZAN; CASALI, 2015). Colpitts et al. (2011) demonstraram, que a proteína C interage diretamente com histonas que compõem o nucleossomo durante infecções pelo DENV em células hepáticas. Essa interação não impede a ligação das histonas com o DNA, mas pode atrapalhar a maquinaria genética das células hospedeiras em favor da replicação viral e do ciclo de vida viral. Além disso, os níveis de proteínas de histona aumentaram dramaticamente durante a infecção pelo DENV, possivelmente como um mecanismo compensatório desta interação. Por fim, a presença do vírus alterou a fosforilação da histona H2 de maneira tempo dependente, sendo esta, associada a recrutar proteínas envolvidas no reparo do DNA (COLPITTS et al., 2011). Entretanto, esse estudo não avalia se a interação com a proteína C com nucleossomos ocorre de maneira inespecífica ou possui regiões alvo definidas. Além disso, não se sabe ainda se essa interação do capsídeo visa intencionalmente modular a expressão gênica da célula hospedeira. Em relação à desregulações no perfil de metilação, outras infecções virais demonstraram serem capazes de influenciar o perfil de metilação da célula hospedeira e, com isso, influenciar o desfecho clínico da doença (HE et al., 2015; NAKAYAMA-HOSOYA et al., 2015). Já no contexto de infecções pelo DENV, foi demonstrado por Gomes, A. V. et al. (2016) que pacientes infectados têm maior demetilação na região

promotora de TNF-α, com aumento na expressão de transcritos dessa citocina em relação à indivíduos não infectados, Segundo o estudo, a modulação epigenética induzida pelo DENV pode contribuir diretamente com a gravidade da doença uma vez que elevados níveis de TNF-α contribuem para o acometimento de inflamação aguda e aumento na permeabilidade vascular em células endoteliais. Dessa forma, não seria impossível pensar que alterações epigenéticas induzidas pelo DENV possam colaborar com a alta quantidade de plasmablastos vista durante a infecção.

Quanto às alterações transcricionais presentes na diferenciação de células B em ASCs, estas se concentram principalmente na ativação e supressão específica de fatores de transcrição. O aumento na expressão de fatores que suportam o programa transcricional das ASCs, como IRF4, BLIMP1 e Xbp1, resultante das modificações epigenéticas e dos estímulos vistos anteriormente, suprime a expressão de fatores de transcrição que mantêm o fenótipo de célula B, como o já citado BCL6, e os fatores proteína *box*-pareada 5 (Pax5, do inglês *Paired box protein 5*), o Domínio BTB e Homólogo CNC 2 (Bach2, do inglês *BTB Domain And CNC Homolog 2*) e o fator de transcrição indutor de melanócitos (MITF, do inglês *Melanocyte Inducing Transcription Factor*) e permitem que a célula se diferencie (**Figura 8**) (NUTT et al., 2015).



**Figura 8 – Rede de fatores de transcrição em células B e em células secretoras de anticorpos.** Em células B, Bach2, Bcl6, MITF e Pax5 reprimem os fatores de transcrição de células secretora de anticorpos (esquerda). Blimp-1, IRF4 e XBP-1 promovem a diferenciação em células secretoras de anticorpos suprimindo a expressão de fatores de transcrição que mantêm o fenótipo de célula B (direita). Caixas vermelhas indicam genes ativos/expressos. Caixas cinzas indicam genes não ativos/pouco ou nada expressos. Linhas terminando em traços e linhas terminando em setas indicam efetiva repressão e ativação gênica, respectivamente. Traços pontilhados representam desfechos biológicos. Ig: imunoglobulina. Modificado de IGARASHI; OCHIAI; MUTO (2007).

Uma vez que as células B são positivamente selecionadas no GC, elas passam gradativamente a mudar o seu transcriptoma de célula B para ASCs (NERA; KYLÄNIEMI; LASSILA, 2015). A diminuição na expressão do fator transcricional célula B específico, Pax5, parece ser um dos eventos iniciais desse processo (KALLIES et al., 2007; NERA; KYLÄNIEMI; LASSILA, 2015). Esse fator é responsável por suprimir a expressão de genes de linhagens não-B e promover a expressão de genes específicos das células B, como genes codificantes de diversos componentes chaves do BCR e de sua via de sinalização, bem como outros importantes fatores de transcrição, como Bach2, IRF8 e IRF4 (PRIDANS et al., 2008; SCHEBESTA et al., 2007). O IRF4 parece funcionar de maneira dose-dependente (OCHIAI et al., 2013; SCIAMMAS et al., 2006, 2011). Baixos níveis de sua expressão destinam as células B a permanecerem nos GCs e tornarem-se células de memória ativando a expressão de Bcl6 (OCHIAI et al., 2013; SCIAMMAS et al., 2011). Já níveis elevados do IRF4 estão intimamente relacionados com a diferenciação em ASCs, por repressão de Bcl6 e ativação de BLIMP1 (SCIAMMAS et al., 2006). Quanto ao Bcl6, ele é expresso em células B dos GCs e é necessário para a formação do mesmo, além de bloquear a diferenciação em ASCs e manter o fenótipo das células B por suprimir a expressão de BLIMP1 (TUNYAPLIN et al., 2004), que é considerado o regulador máximo da diferenciação em ASCs, além de um importante repressor de Bach2 (ALINIKULA et al., 2011; IGARASHI et al., 2014). Quanto ao Pax5, ele também suprime a expressão de XBP-1, o qual é responsável por regular genes envolvidos na via de resposta à proteínas mal desenoveladas (UPR, do inglês Unfolded Protein Response), como resposta celular ao acúmulo dessas no lúmen do RER (REIMOLD et al., 1996). Essa via é essencial para a manutenção da alta secreção de Ig em ASCs (BENHAMRON et al., 2015).

Infecções pelo DENV demonstraram alterar o perfil de transcrição de diversos genes (DE KRUIF et al., 2008; DEVIGNOT et al., 2010; KWISSA et al., 2014; POPPER et al., 2012; SIMMONS et al., 2007). Embora o aumento na expressão dos genes que codificam Blimp-1, IRF4 e Xbp-1 seja esperado – uma vez que infecções pelo DENV aumentam no número de ASCs – nenhum desses estudos possuía como objetivo a comparação entre o perfil de transcrição dos fatores acima citados em infecções pelo DENV e infecções por outros vírus. Desta forma, apenas com esses dados, não é possível afirmar que a alta resposta de plasmablastos vista nas infecções pelo DENV

é decorrente apenas de uma maior expressão desses genes, ou quais vias poderiam estar levando a uma expressão exacerbada dos mesmos.

Por fim, para que possam exercer sua função efetora, após ativação, as células B dão início a um intenso processo de reprogramação celular e citoplasmáticas que darão suporte à futura secreção de anticorpos. Essas mudanças, por sua vez, demandam uma grande produção de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e nucleotídeos, bem como um alto consumo energético, nos quais diversas vias metabólicas estão crucialmente envolvidas (CARO-MALDONADO et al., 2014; WATERS et al., 2018). A sinalização intracelular não apenas regula a entrada do ciclo celular e a função efetora, mas também governa quais vias metabólicas são utilizadas pela célula (JELLUSOVA; RICKERT, 2017). Diversas moléculas que participam da ativação e diferenciação das células B, como a fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K, do inglês *Phosphoinositide 3-kinase*), o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês mammalian target of rapamycin) e o proto-oncogene c-Myc são capazes de modular o seu metabolismo (JELLUSOVA; RICKERT, 2017). Uma das vias metabólicas mais estudadas até o momento durante a ativação das células B é a via glicolítica. A estimulação de células B naïve com anti-IgM, lipopolissacarídeos bacterianos (LPS, do inglês lipopolysaccharide), IL4, anti-CD40 e BAFF leva ao aumento da captação e utilização de glicose (JELLUSOVA; RICKERT, 2017). Em camundongos, a geração de anticorpos após a imunização pode ser revogada fornecendo 2-desoxiglucose (2DG) ou dicloroacetato (DCA) na água potável (CARO-MALDONADO et al., 2014). Ambos 2DG e DCA inibem as principais enzimas da via glicolítica: hexoquinase e piruvato desidrogenase quinase, respectivamente, sugerindo que a glicólise é necessária para uma resposta imune humoral eficaz. Da mesma forma, camundongos com uma deleção específica nas células B do transportador de glicose Glut1 têm menos células B e mostram geração de anticorpos prejudicada após uma imunização com um antígeno dependente de células T (CARO-MALDONADO et al., 2014). Ainda, um estudo recente demonstrou que o metabolismo lipídico também é importante para a diferenciação em ASCs (DUFORT et al., 2014). inibição da enzima que promove a lipogênese, a ATP citrato liase (ACLY, do inglês ATP citrate synthase) em células B estimuladas por LPS leva à uma menor proliferação, sobrevivência e a redução de vários marcadores da diferenciação em ASCs, incluindo a expansão do RER e das expressões de CD138 e BLIMP1 (DUFORT et al., 2014). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre as relações entre os diferentes

metabolismos e como estes suportam e ou, até mesmo, regulam a maturação, ativação e diferenciação das células B (CARO-MALDONADO et al., 2014; WATERS et al., 2018).

Mediante tantos possíveis fatores, nos questionamos quais vias de sinalização celular podem ser ativadas para gerarem tantas ASCs durante esta infecção viral? Nossa hipótese é que a infecção pelo DENV altere de forma desproporcional a expressão gênica e potencialmente de proteínas das células B, propiciando uma maior diferenciação delas em plasmablastos. Assim, no intuito de melhor entender quais vias estão participando desse processo de diferenciação, avaliamos dados públicos de transcriptoma obtidos do sangue total de pacientes infectados ou não pelo DENV, bem como o metabolismo e a expressão gênica de culturas celulares infectadas pelo mesmo. Ainda, avaliamos também a expressão gênica de células B (CD19+) isoladas de pacientes com Dengue. A elucidação sobre quais vias de sinalização de células B são ativadas durante esta infecção viral trará uma fundamental contribuição para melhor entendimento da resposta de plasmablastos induzida pelo DENV.

### 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Elucidar as vias de sinalização e moléculas-chave participantes da massiva diferenciação de células B em secretoras de anticorpos que ocorre durante a infecção pelo vírus da Dengue.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar moléculas potencialmente correlacionadas com a massiva diferenciação de células B em secretoras de anticorpos vista em Dengue através da literatura e de análises de *text-data mining*.
- Isolar células CD19+ a partir do PBMCs de pacientes infectados pelo DENV e de indivíduos saudáveis, para análise de sua expressão gênica.
- Avaliar a capacidade de geração de células secretoras de anticorpos *in vitro* mediante co-cultura de monócitos (CD14+) infectados com DENV e linfócitos B (CD19+).
- Avaliar a capacidade de geração de células secretoras de anticorpos, em PBMCs ou linfócitos B (CD19+) isolados, mediante estímulo com mitógenos ou infectadas por DENV *in vitro*.
- Avaliar se fatores secretados por PBMCs depletadas de células CD19+ e estimuladas com mitógenos ou infectadas por DENV são capazes de induzir a geração de células secretoras de anticorpos através da cultura de seu sobrenadante com linfócitos B (CD19+).
- Quantificar as concentrações de triptofano e de seus respectivos metabólitos nos sobrenadantes de culturas de células B (CD19+) ou PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis e infectadas *in vitro* com DENV ou outros flavivírus ou tratadas com mitógenos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.
- Quantificar a expressão dos genes PRDM1, PAX5, BCL6, IRF4, SYK, IL10, STAT3, NFATC1, TNFSF13B, IDO1, IDO2 e FOSL1 por PCR quantitativa (qPCR; Real Time PCR) a partir de RNA extraído de: I) Células B (CD19+) isoladas do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados pelo DENV, II) PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis e infectadas *in vitro* com DENV ou tratadas com mitógenos.
- Correlacionar esses achados com dados públicos de transcriptoma obtidos do sangue total de pacientes infectados ou não pelo DENV.

#### 3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Figura 9 – Delineamentos experimentais utilizados neste projeto.

#### 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 4.1. Mineração de dados textuais (Text data minig)

Com o objetivo de encontrar novos alvos potencialmente relacionados com a diferenciação de ASCs ocorrendo em Dengue, nós realizamos uma mineração de dados textuais *in silico* utilizando a plataforma *Watson for Drug Discovery* (WDD) da IBM, em parceria com o laboratório do Professor Helder Takashi Imoto Nakaya (FCF-USP), especializado em bioinformática. Esta ferramenta de inteligência artificial capaz de determinar a presença de associações entre palavras através de um levantamento de dados da literatura e de patentes. Para tal, realizamos buscas contendo diferentes combinações das seguintes palavras-chave: "Dengue", "hemorragic Dengue fever", "b cell", "NFKB", "ERK1", "ERK2", "GCN5", "NFATC1", "NFATC2", "IRF4", "PRDM1", "XBP1", "SYK", "LYN", "MTOR", "PPP3CA", "STAT3", "P38", "IL6", "IL10", "calcium", "ORAI1", "DOK3" e "plasma cell myeloma". Foi determinado que o intervalo de busca incluiria apenas literaturas publicadas nos 10 últimos anos e que a confiança seria superior à 60% em todas as buscas.

#### 4.2. Análise de dados públicos de transcriptoma

Dados de transcriptoma gerados a partir de RNA total extraído do sangue total de 9 indivíduos saudáveis, 18 com Dengue moderada (DF) e 10 com Dengue hemorrágica (DHF), captados no Hospital Siriraj, em Bangkok (Tailândia), foram utilizados para complementar as análises de genes e vias possivelmente envolvidas neste processo de geração de plasmablastos, vistos durante a infecção por DENV. Esses dados foram obtidos por Kwissa et al. (2014), através da plataforma de análise *Human U133 Plus 2.0 Arrays* (Affymetrix), contendo 7258 genes, e encontram-se disponíveis na ferramenta *Gene Expression Omnibus* (GEO) do NCBI (Series: GSE51808) para uso livre.

Os perfis de expressão de grupos de genes foram avaliados por *Heatmaps*, realizados pelos doutorandos Diógenes Ribeiro de Lima e Patrícia Gonzales no laboratório do Professor Helder Nakaya (FCF-USP), através da função *heatmap.2* do pacote *gplots* - *Various R programming tools for plotting data*. Eventuais avaliações funcionais dos agrupamentos gênicos gerados nos *heatmaps* foram realizadas por

nós através do banco de dados GO Molecular Function 2017 da plataforma online Enrichr.

A seleção dos 10 genes mais diferentemente expressos (para mais ou para menos) entre os indivíduos controle e os pacientes infectados, e entre os pacientes DF е DHF, foi realizada através do com sistema GEO2R (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r) disponível na plataforma NCBI-GEO. Essa ferramenta gerou automaticamente os 250 genes com maior diferença de expressão entre as amostras selecionadas. A ontologia desses genes foi avaliada com plataforma online Enrichr, através do banco de dados GO Biological Process 2017. Para a construção das redes de interação gênica entre esses e os alvos iniciais do nosso trabalho utilizamos a plataforma online GeneMANIA (http://genemania.org/).

Além disso, os dados brutos de expressão dos 7258 genes disponíveis no NCBI-GEO foram utilizados para a análise da expressão gênica individual quando julgado necessário.

#### 4.3. Amostras

Cerca de 8-10mL de sangue periférico foram coletados de indivíduos saudáveis. Estes indivíduos eram oriundos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (São Paulo – SP) ou do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR) e foram convidados a participar do estudo por mim mesma. Somente aqueles que aceitaram o convite, e aprovaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE), tiveram suas amostras de sangue coletadas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de adotados pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, vide **Item 9** deste documento). Os tubos de coleta de sangue continham heparina como anticoagulante.

Amostras de PBMCs de 5 pacientes com Dengue, foram gentilmente doadas pelo Professor José Luiz Proença Módena do Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes – Departamento de Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da UNICAMP (Campinas – SP). Essas amostras encontravam-se congeladas e a Dengue havia sido confirmada por ensaios sorológicos.

#### 4.4. Cepas virais

Ao longo deste trabalho foram utilizadas as seguintes cepas de vírus da Dengue nos ensaios *in vitro*:

- Vírus da Dengue sorotipo 2 isolado clínico da Nova Guiné C (DENV2 NGC), gentilmente cedida pelo Professor Luis Carlos de Souza Ferreira do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP).
- Vírus da Dengue sorotipo 4, adaptado de laboratório (DENV4 TVP/ 360), e o isolado clínico (DENV4 LRV13/422; nº de acesso no *Genebank* KU513441) gentilmente cedidas pela professora Claudia Nunes Duarte dos Santos do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas Fiocruz/PR (Curitiba PR).

Também foram utilizados cepas do vírus Zika oriundos de isolados clínicos da África e de Pernambuco/BR (ZIKV-MR766 - Dick et al., (1952) e ZIKV-PE243 - Donald et al., (2016) respectivamente) e do vírus atenuado da Febre Amarela utilizado em vacinas (YFV/17DD), igualmente cedidos professora Claudia Nunes Duarte dos Santos do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR).

#### 4.5. Processamento e obtenção de leucócitos mononucleares

Após a coleta de sangue, as amostras foram processadas, tendo o plasma removido por meio de centrifugação a 1600 x g por 10 minutos, com freio. Esse plasma foi aliquotado em tubos de 1,5 mL, devidamente identificados, e então armazenados em freezer -20° C para análises futuras. Após a remoção do plasma, foi adicionado um volume de PBS 1x equivalente ao volume de plasma retirado, seguido de homogeneização. O volume total obtido foi cuidadosamente transferido a outro tubo contendo 4mL de gradiente de Histopaque (Histopaque®-1077 – Cat. 10771 – Sigma). O conjunto Histopaque + sangue foi centrifugado a 1600 x g por 30 minutos, com baixa aceleração e sem freio, para o isolamento de leucócitos mononucleares (PBMCs; do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). O anel de PBMCs isoladas era então transferido cuidadosamente para um novo tubo e submetido a três lavagens com solução de PBS 1X suplementado com 2% de FBS (PBS 1X – 2%FBS), através de ciclos de centrifugação a 800 x g por 10 minutos, sem freio, com descarte de

sobrenadante e homogeneização do pellet em solução de lavagem. Por fim, essas células foram contadas em câmara de Newbauer a partir de diluição em solução de Azul de Trypan e então utilizadas para cultura (**item 4.8**) ou para a obtenção de células B (CD19+) e/ou monócitos (CD14+) isolados (**item 4.6**).

#### 4.6. Isolamento de células B (CD19+) e monócitos (CD14+) humanos

Após a contagem de PBMCs de cada amostra, a densidade celular foi ajustada para posterior incubação com *beads* conjugadas a anticorpos anti-CD19 (Miltenyi - Cat. 130-050-301) ou a anticorpos anti-CD14 (Miltenyi - Cat. 130-050-301) para isolamento de células B humanas ou monócitos respectivamente. Os protocolos foram realizados conforme as instruções do fabricante das *beads*. Uma vez isoladas, essas células foram submetidas à cultura primária seguindo ou (I) um modelo de diferenciação em células secretoras de anticorpos baseado na co-cultura de monócitos infectados com DENV e linfócitos B (**item 4.7**) ou (II) cultura isolada de linfócitos B e indução da diferenciação em células secretoras de anticorpos por mitógenos (**item 4.8**).

# 4.7. Modelo de diferenciação em células secretoras de anticorpos baseado na co-cultura de monócitos infectados com DENV e linfócitos B

Com o intuito de simular a expansão de ASCs vista durante a infecção pelo DENV, nós utilizamos uma abordagem in vitro baseada na co-cultura de monócitos (CD14+) previamente infectados com DENV e linfócitos B (Kwissa et al., 2014). Para isso, monócitos humanos isolados por *beads* anti-CD14, foram cultivados em placas de 96 poços contendo 5x104 células por poço, durante 2 dias, em estufa 5% CO2-37°C, na presença de meio RPMI suplementado com 10% de FBS (RPMI-FBS 10%) e DENV2 (MOI:1) ou DENV4-TVP. Durante esse mesmo período, células B humanas isoladas por *beads* conjugadas a anticorpos anti-CD19 foram mantidas em *"resting"* em placas de 96 poços contendo 2x105 células por poço na presença de meio RPMI-FBS 10% em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Após esse período, os monócitos foram recuperados, lavados, contados e transferidos em uma proporção de 5:1, para a cultura de linfócitos B, os quais foram mantidos por 6 dias na presença de meio RPMI- FBS 10% contendo 20 U/ml de IL-2 (Miltenyi cat- 130-097-743) e 50 nM CpG ODN 2006 (Invivogen cat- TLRL-2006) em estufa 5% CO2- 37°C.

# 4.8. Cultura de PBMC ou células B humanas (CD19+) isoladas com mitógenos para diferenciação das células B em secretoras de anticorpos

PBMCs ou células B humanas (CD19+) isoladas foram cultivadas em placas de 96 ou 24 poços (descrito em cada experimento), por 7 dias em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, na presença de meio RPMI-FBS 10% contendo Pokeweed mitogen (PWM; diluído 1:100000 em RPMI-FBS 10%), Streptococcus aureaus cowan (SAC; diluído 1:10000 em RPMI-FBS 10%), CpG ODN 2006 (diluído à 6 µg/ml de um estoque 1mg/ml em RPMI-FBS 10%) e  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me; diluído 1/1000 em RPMI-FBS 10% de um estoque 50 mM), para a diferenciação das células B em secretoras de anticorpos (Crotty et al., 2004). Durante esse período o meio de cultura foi mantido sem trocas, sendo apenas adicionados 50-100µL de RPMI-FBS 10% por poço no quinto dia. No dia 5 ou 7, essas culturas tiveram suas células recuperadas para obtenção das frações de RNA (item 4.10), quantificação de RNA (item 4.11), síntese de DNA complementar (item 4.12), quantificação da expressão gênica (item 4.14), fenotipagem por citometria de fluxo (item 4.15) e enumeração de células secretoras de anticorpos por ELISPOT (item 4.16). O sobrenadante dessas culturas foi também recuperado e aliquotado para análise de metabólitos da via do triptofano (item 4.17) e titulação viral (item 4.19).

# 4.9. Infecção de PBMC ou células B humanas (CD19+) isoladas por diferentes flavivírus

PBMCs ou células B humanas (CD19+) isoladas foram individualmente infectadas pelas cepas de DENV, ZIKV ou YFV descritas no **item 4.4**. Para a infecção as células foram recuperadas, centrifugadas, ressuspedidas em meio RPMI não suplementado com FBS e contadas. Após contagem, elas foram infectadas de acordo com o nº de unidades formadoras de foco titulado em cada lote viral, para a obtenção da multiplicidade de infecção desejada (MOI; descrito em cada experimento). Essas células foram mantidas na presença do vírus por apenas 1 hora em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida, foram centrifugadas e lavadas, para serem, então,

cultivadas em placas de 96 ou 24 poços, por 7 dias, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, na presença de meio RPMI-FBS 10%. Assim como no **item 4.9** essas culturas tiveram suas células recuperadas para obtenção das frações de RNA (**item 4.10**), quantificação de RNA (**item 4.11**), síntese de DNA complementar (**item 4.12**), quantificação da expressão gênica (**item 4.14**), fenotipagem por citometria de fluxo (**item 4.15**) e enumeração de células secretoras de anticorpos por ELISPOT (**item 4.16**). O sobrenadante dessas culturas foi recuperado e aliquotado para análise de metabólitos da via do triptofano (**item 4.17**) e titulação viral (**item 4.19**).

#### 4.10. Obtenção das frações de RNA total das amostras

As células recuperadas das culturas descritas anteriormente tiveram o seu sobrenadante removido e armazenados. Em seguida, foram lavadas duas vezes com solução de PBS 1X, através de ciclos de centrifugação a 800 x g por 10 minutos, sem freio, com descarte de sobrenadante e homogeneização do pellet em solução de lavagem. Depois, elas foram homogeneizadas com 750 µL de TRIzol<sup>™</sup> *Reagent* (Invitrogen) por 5–10 × 10<sup>6</sup> células, cujos tubos foram imediatamente congelados a -20°C e mantidos assim até o momento de obtenção de suas frações proteicas e de RNA total.

O protocolo de isolamento das frações de RNA total foi realizado conforme as instruções do fabricante do TRIzol *Reagent* (Invitrogen).

#### 4.11. Quantificação de RNA

As amostras de RNA total obtidas no **item 4.9** foram quantificadas por espectrofotometria, utilizando o equipamento Synergy MX<sup>™</sup> (Biotek), através da plataforma Take3 *Micro-Volume* Plate<sup>™</sup> (Biotek). Para tal, 2 µL de RNA foram utilizados. A integridade das amostras foi avaliada através da razão da absorbância 260/280 nm.

#### 4.12. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para síntese do DNA complementar (cDNA) foram utilizados 2 µg de RNA. O volume equivalente a esta qualificação foi acrescido de 4 µL de *SuperScript Vilo Master Mix*<sup>™</sup> (Life Technologies) e ajustado com água ultrapura para uma reação final

de 20  $\mu$ L, conforme instruções do fabricante. Os tubos foram incubados em um termociclador por 5 min a 65°C, 120 min a 50°C e 5 min a 95°C. Após a reação, os tubos foram armazenados a -20°C.

#### 4.13. Expressão gênica por Real Time – PCR

As análises de expressão gênica foram realizadas através de reações em cadeia em tempo real (qPCR) no equipamento 7500 FAST Real Time System<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific). Nestas reações 200ng do cDNA obtido no **item 4.12** foram amplificados em uma reação contendo 10 µL do reagente *SYBR<sup>™</sup> Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) e 4 pmol dos iniciadores (*primers*) específicos (senso e antisenso) sintetizados pela Thermo Fisher Scientific conforme as especificações descritas na **Tabela 2**. O volume total da reação foi ajustado para 20uL utilizando água ultrapura.

A ciclagem utilizada foi: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min (exceto para a detecção viral, onde a temperatura de anelamento foi de 67°C). Curvas de dissociação (*Melting*) foram utilizadas para a verificação da especificidade relativa da reação.

Alvo	Sequência senso (Foward) 5'-3'	Sequência anti-senso (Reverse) 5'-3'	Amplicon (pb)	Referência
PRDM1	TACATACCAAAG GGCACACG	TGAAGCTCCCC TCTGGAATA	119	(WRIGHT et al., 2019)
PAX5	GGAGGAGTGAAT CAGCTTGG	GGCTTGATGCT TCCTGTCTC	188	(SCHMIDLIN et al., 2008)
BCL6	ACCCACCTACTG AATCTCGAA	GCCTGAGAGTT TAGCACGATGT	112	(PICAUD et al., 2016)
IRF4	ACCGAAGCTGGA GGGACTAC	GTGGGGCACAA GCATAAAAG	153	(SCHMIDLIN et al., 2008)
SYK	AAAGACAAATGG AAAGTTCCTGA	CTTTGTCGATG CGATAGTGC	104	(GRAMMATIKOS et al., 2013)
IL10	GGTTGCCAAGCC TTGTCTGA	AGGGAGTTCAC ATGCGCCT	101	(PFAFFL, 2001)
МАРКЗ	CC TGCGACC TTAAGATTTG TGATT	CAGGGAAGATG GGCC GGTTA GAGA	210	(WANG et al., 2011)
NFATC1	GCATCACAGGGA AGACCGTGTC	GAAGTTCAATG TCGGAGTTTCT GAG	153	(DAY et al., 2004)
STAT3	GAG AAG GAC ATC AGC GGT AAG	AGT GGA GAC ACC AGG ATA TTG	137	(TURTON et al., 2015)
TNFSF13B	AGGCAACTCCAG TCAGAACAGC	TCATCCCCAAA GACATGGACC	303	(SCHAUMANN et al., 2007)
FOSL1	CGGAGACTGACA AACTGG	CTCAGGTTCAA GCACAGG	236	(CAI et al., 2017)
IDO1	AGACCACAAGTC ACAGCGCC	TTGGCAAGACC TTACGGACAT	70	(OPITZ et al., 2011)
IDO2	TGCTTCATGCCTT TGATGAG	GAAGGCCTTAT GGGAAGGAG	104	(OPITZ et al., 2011)
DENV	GACTAGtGGTTAG AGGAGACC	GTCTCCTCTAA CCTCTAGTCCT	155	Cedidos pela Profa. Ana Luiza Pamplona (Fiocruz/PR)

Tabela 1 – Especificações dos iniciadores (primers) utilizados

A expressão relativa foi calculada pela diferença entre o *cycle threshold* (Ct) do gene alvo e o Cr do gene de referência  $\Delta$ Ct = (Ct gene alvo – Ct gene de referência). O gene de referência foi determinado conforme o **item 4.15**. A expressão diferencial (*fold change*) foi calculada pela fórmula 2^- $\Delta$ ACt = ( $\Delta$ Ct do grupo tratado –  $\Delta$ Ct do grupo controle) (KENNETH J. LIVAKA ; SCHMITTGENB; THOMAS, 2001), usando o grupo Mock como grupo controle.

#### 4.14. Seleção do gene de referência

O gene de referência foi selecionado de um painel de genes disponíveis no laboratório do Professor Alexandre Bruni-Cardoso (Instituto de Química – USP), utilizando amostras representativas das condições experimentais do estudo. Foram

testados *RPL19*, *GAPDH*, *B2M* e *RNA18S*. As sequências dos iniciadores (*primers*) senso e anti-senso estão descritas na **Tabela 3**. O ensaio de seleção do gene de referência foi realizado nas mesmas condições descritas no **item 4.14**. A avaliação do gene mais estável foi realizada através do programa GeNorm (https://genorm.cmgg.be/).

Gene alvo	Sequência senso (Foward) 5'-3'	Sequência anti-senso (Reverse) 5'-3'	Amplicon (pb)
RPL19	GATCGATCGCCACATGTATCAC	TTGTCTGCCTTCAGCTTGTG	65
GAPDH	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA	206
B2M	GAGTATGCCTGCCGTGTGAA	CGGCATCTTCAAACCTCCAT	60
RNA18S	GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC	CCAAGATCCAACTACGAGCTT	146

Tabela 2 – Especificações dos genes de referência testados

#### 4.15. Citometria de fluxo

O ensaio de Citometria de Fluxo foi realizado para a fenotipagem das células secretoras de anticorpos recuperadas das culturas descritas nos **itens 4.8** e **4.9**. Após 7 dias de cultura, as células foram recuperadas, centrifugadas a 400 x g por 3 minutos, a temperatura ambiente, e mantidas em 100µL de tampão de bloqueio (PBS1x - 5%FBS - 1% soro humano AB) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram lavadas com mais 100µL de tampão de bloqueio, seguido de centrifugação e incubação com um mix contendo anticorpos Anti-CD20, CD38 e CD27 humanos conjugados a fluorocromos (especificações na **Tabela 4**). Essa marcação foi feita por 30 minutos a 4ºC, no escuro. Passado esse período, as amostras foram lavadas com mais 100µL de tampão de bloqueio (PBS1x – 5%PFA) e mantido a 4ºC, no escuro, até o momento da leitura. As leituras correspondentes às fluorescências foram adquiridas em um citômetro de fluxo BD FACSCanto<sup>™</sup> II e as análises realizadas através do software FlowJo.

Antígeno humano	Clone	Fluorófulo	Fabricante
CD20	2H7	FITC	Biolegend
CD27	M-t271	PE	Biolegend
CD38	HI72	PE-Cy7	Biolegend

Tabela 3 – Especificações dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo

#### 4.16. ELISPOT

O ensaio de ELISPOT foi realizado para enumeração de células secretoras de IgG e IgM totais. Inicialmente 10  $\mu$ g/mL do anticorpo anti-IgA + IgM + IgG (H + L) humano (Jackson ImmunoResearch) diluído em PBS1X, foram adicionados às placas de ELISPOT (Millipore MSHAN4B50) para o *coating*. Essas placas foram mantidas overnight a 4°C e, após este período, foram lavadas 4 vezes com PBS 1X - 0,05% Tween 20 (PBS - 0,05%T20) e 4 vezes com PBS1X. Em seguida, bloqueadas por 2 horas com meio de cultura RPMI-10%FBS. Depois do bloqueio, o meio de cultura foi removido das placas e cerca de 1 x 10<sup>6</sup> PBMCs ou 2x10<sup>5</sup> células CD19+ isoladas, diluídas em RPMI - 10%FBS, foram adicionadas nos primeiros poços da placa. Diluições séricas de 3 vezes foram realizadas nos poços das linhas seguintes das placas, as quais foram incubadas por período overnight a 37°C em estufa de 5% de CO2. Depois, as células foram removidas por inversão e as placas lavadas 4 vezes com solução de PBS - 0,05%T20. Depois, uma solução de anticorpos secundários biotinilados anti-IgG (Jackson ImmunoResearch) ou anti-IgM (Life Technologies) humanos, diluídos 1:1000 em solução de PBS - 0,05% T20 - 2% FBS, foram incubadas individualmente por 2 horas, a temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as placas foram lavadas novamente por 4 vezes com solução PBS - 0,05%T20 por 4 vezes e uma solução de Avidin D - HRP (Vector labs), diluída 1:1000 em PBS - 0,05% T20 - 2% FBS, foi adicionada. A incubação com Avidin foi realizada por 2 horas à temperatura ambiente, no escuro. As placas foram lavadas, novamente, por 4 vezes com solução PBS - 0,05%T20 e 4 vezes com solução PBS1X. Por fim, o ensaio foi revelado a partir da adição do substrato filtrado 3-amino 9-etilcarbazol (AEC - BD™ ELISPOT cat 551951) às placas. Após revelação, todos os poços foram lavados com água corrente e as placas, secas e mantidas no escuro até obtenção das imagens de cada poco através do leitor automatizado AID ISPOT (AID – Autoimunn Diagnostika GmbH, Alemanha).

#### 4.17. Quantificação de metabólitos da via do triptofano

A quantificação dos metabólitos da via do triptofano foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo LC-MS/MS (QqQ), a partir de uma colaboração com a Professora Ana Campa, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O equipamento utilizado é composto por Bombas LC 1250 Bin Pump VL, auto-injetora 1260 HiP ALS acoplados ao espectrômetro de massas 6460 (todos da Agilent Technologies). As análises foram realizadas a partir do software MassHunter e os dados coletados a partir do modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). Para o preparo das amostras, o sobrenadante das culturas (300 µL) foi adicionado a um microtubo de 1,5 mL contendo 750 mL de metanol : acetona (1:1) com 0,1% de ácido acético. Após adição das amostras, 10 µL de um mix de padrões internos (MLT-D4 e Trp-D5) para os analitos estudos, foram adicionados ao microtubo. Posteriormente, homogeneizamos as soluções em vortex por 1 min e então armazenamos essas soluções por meia hora a -20°C para precipitação das proteínas do meio de cultura. Após a incubação, os microtubos foram submetidos a centrifugação a 14.000 x g por 10 min a 4 ºC. O sobrenadante dos microtubos foi transferido para novos microtubos e secas sob atmosfera de gás nitrogênio. Ao final da secagem, as amostras foram reconstituídas em 100 µL de uma mistura de água: metanol (9:1) para então serem analisadas por cromatografia líquida.

#### 4.18. Determinação da exposição prévia ao DENV por ELISA

Em parceria com o Professor Luis Carlos de Souza Ferreira do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP) o soro dos indivíduos saudáveis doadores de amostra para os experimentos descritos nos **itens 4.8** e **4.9** foram testadas quanto à exposição prévia dos mesmo ao vírus da Dengue. Para isso, foi realizado um ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de detecção de anticorpos IgG contra as proteínas não estruturais 1 (NS1) dos 4 sorotipos (DENV1-4).

O experimento foi realizado com o auxílio do doutorando Samuel Santos Pereira e consistiu nas seguintes etapas: sensibilização das placas de 96 poços

(Maxisorp) com pool das proteínas rNS1 DENVs 1-4 (1,5 ng/ µL de NS1 de DENV1 e 1,0 ng/ µL de NS1 de DENV2, DENV3 e DENV4) em tampão carbonato (0,29 g de NaHCO3, 0,158 g de Na2CO3, qsp 100 mL, pH 9,6), temperatura de 4 °C, overnight. Após incubação as placas foram lavadas 4 vezes com solução de PBS contendo 0,5% de Tween 20 (PBS - 0,5% T20) e bloqueadas com solução 3 % de leite desnatado com 0,5 % de Albumina do Soro Bovino (BSA) em 1X PBS-0,05 % Tween 20 (PBS -0,05% T20 – 0,5% BSA), sendo mantidas a 37 °C, por um período de 2 horas. Após o bloqueio, as placas foram lavadas com PBS - 0,5% T20, e na sequência adiciona-se os soros diluídos 1/100 foram adicionados, sendo posteriormente diluído seriadamente em fatores de 1:2. As placas foram novamente lavadas com 1X PBS-0,05 % Tween 20 e na sequência, o anticorpo secundário goat anti-lgG human (diluição 1:4000, Sigma) foi adicionado. Após uma nova etapa de lavagem, a incubação com solução reveladora tampão citrato fosfato pH 5,8; OPD [o-Phenylenediamine] e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi realizada por 15 minutos e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico 2 N (H2SO4) e a absorbância mensurada a 492 nm em leitor de placa (Epoch).

#### 4.19. Titulação viral do sobrenadante das culturas

A análise do número de partículas virais infectivas no sobrenadante das culturas foi realizada utilizando o protocolo padronizado no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR). Neste 100µL dos sobrenadantes obtidos das culturas descritas no **item 4.9**, foram descongelados e diluídos seriadamente em meio L-15 sem soro fetal bovino, até a concentração10<sup>-6</sup>. Cada diluição foi inoculada em duplicata em células C6/36 (placas de 24 poços, 1x10<sup>5</sup> cél/poço), as quais foram mantidas em estufa a 28°C por 90 minutos para adsorção do vírus. Ao final do tempo, o inóculo foi aspirado com uma pipeta e em cada poço foi adicionado 0,5mL de meio 1:1 32% CMC e L15 suplementado com 10% de FBS, 0,52% de triptose e 50µg de gentamicina. Essas placas foram lacradas com fita adesiva (para evitar evaporação) e incubadas por 7 dias a 28°C.

Em seguida, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta e descartado. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e o tapete celular foi fixado com paraformaldeído 3% por 20 minutos. Após esse período, o paraformaldeído é descartado e as placas lavadas por 3 vezes com PBS 1x. Então, as células foram

permeabilizadas com 0,5% Triton X-100 (200µL/ poço) por 4 minutos e lavadas mais 3 vezes com PBS 1x. Por fim, as células são incubadas com o anticorpo 4G2 (1:100) a 37°C por 60 minutos e então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti*mouse* conjugado com fosfatase alcalina (1:7500) por 37°C por 60 minutos. Então, essas foram lavadas e reveladas com 200µL da solução AP *buffer*, BCIP e NBT por no máximo 30 minutos e protegido da luz.

Após lavagem com agua, os pontos focais de infecção foram contados.

#### 4.20. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o *software* GraphPad Prism para Windows, versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). As variáveis quantitativas paramétricas foram comparadas por teste t ou por One-way ANOVA com comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni. Já as variáveis quantitativas não paramétricas foram comparadas por teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pelo teste Dunn's. O nível de significância considerado para determinar a diferença entre grupos de dados foi p<0,05.

#### 5. **RESULTADOS**

## 5.1. Mineração de dados textuais (*Text data mining*) através do IBM-Watson *For Drug Discovery*

Com o crescimento exponencial de dados gerados em publicações, principalmente aqueles relacionadas à geração de *big data*, extrair informações de maneira rápida e precisa pode ser extremamente desafiador. Por tal razão, a mineração de dados textuais, também conhecida como *text data mining*, tem sido cada vez mais utilizada. Sua execução através de mecanismos de inteligência artificial permite encontrar padrões e associações entre dados não estruturados presentes em textos de uma forma muito mais eficaz. Uma importante ferramenta capaz de gerar esse tipo de dados é o IBM - Watson (Chen et al., 2016). Em particular, a plataforma *Watson for Drug Discovery* (WDD), analisa vários conjuntos de conhecimentos disponíveis na literatura e em patentes, e revela conexões e relações entre genes, drogas, doença e outros *inputs*, incluindo evidências no nível das sentenças que apoiam essas conexões.

Em parceria com o Professor Helder Nakaya (FCF-USP), nós utilizamos esta plataforma para avaliar as combinações das palavras ""b cell", "Dengue" e IRF4" ou "b cell", "Dengue" e "PRDM1". A partir das palavras contidas nessas redes, novas palavras-chave foram sendo acrescidas nas combinações futuras. No total, 109 combinações envolvendo as palavras-chave "Dengue", "hemorrhagic Dengue fever", "b cell", "NFKB", "ERK1", "ERK2", "GCN5", "NFATC1", "NFATC2", "IRF4", "PRDM1", "XBP1", "SYK", "LYN", "MTOR", "PPP3CA", "STAT3", "P38", "IL6", "IL10", "calcium", "ORAI1", "DOK3" e "plasma cell myeloma" foram geradas e avaliadas.

A **Figura 10** exemplifica a rede de palavras geradas por essa plataforma através da combinação das palavras "b cell", "classical Dengue" e IRF4". É importante ressaltar, que a rede formada nessa análise não é composta por palavras que apareçam concomitantemente para as 3 palavras-chave juntas, e sim, associadas a cada uma delas individualmente. Ou seja, em literaturas ou patentes contendo em seu texto a palavra-chave IRF4, foi encontrada, por exemplo, a palavra MTOR; em uma outra literatura ou patente contendo a palavra-chave "classical Dengue" também foi encontrada a palavra MTOR; e em uma terceira literatura ou patente contendo a palavra-chave "b cell" também foi encontrada a palavra MTOR. Dessa forma, MTOR foi incluída na rede como uma palavra compartilhada pelas palavras-chave inseridas.



**Figura 10 – Exemplo de uma rede de** *text-mining* **gerada através da plataforma IBM Watson for** *Drug Discovery.* Rede de interação de palavras comuns às palavras-chave "IRF4", "classical Dengue" e "b cell". D: *disease* (doenças em inglês); T: *tissue* (tecido em inglês); G: Gene; Bolas brancas representam palavras-chaves inseridas. Bolas coloridas representam palavras encontradas pela plataforma (azuis: genes; verdes: fármacos; roxos: químicos).

Dessa forma, com o intuito de refinar ainda mais os dados levantados pelo WDD, fizemos um ranqueamento das 10 palavras mais frequentes em todas as nossas combinações, bem como das combinações que continham obrigatória e individualmente as palavras-chave "b cell", "Dengue" ou "IRF4" (**Tabela 4**). É possível observar que das 109 combinações totais realizadas, 16361 entradas foram levantadas, das quais excluindo-se suas repetições, equivaleram à 2726 palavras diferentes.

_					
_	Perfil da busca	Número de combinações avaliadas	Contagem total de palavras levantadas (incluindo repetições)	Total de palavras obtidas (excluindo repetições)	10 palavras mais frequentes
	Geral *	109	16361	2726	akt1, NF-kB, ifng, tp53, il4, ighm, tgfb1, il2, il6, ifnb1
	Que continham Dengue nas palavras-chave	32	2766	438	akt1, ifng, il4, tgfb1, nf-kb, tp53, tlr4, il6, ighm, ifnb1
	Que continham B cell nas palavras-chave Que continham	28	1586	282	akt1, ifng, ighm, il2, il4, stat3, tp53, syk, nf-kb, hla-e akt1 il2 il4
	IRF4 nas palavras-chave	30	2027	350	ighm, ifng, stat3, nf- kb, il6, tp53, ifnb1

Tabela 4 – Análise do número total de palavras encontradas, bem como das 10 palavrais mais frequentes em cada perfil de busca.

\* combinações variadas das palavras-chave: "Dengue", "hemorragic Dengue fever", "b cell", "NFKB", "ERK1", "ERK2", "GCN5", "NFATC1", "NFATC2", "IRF4", "PRDM1", "XBP1", "SYK", "LYN", "MTOR", "PPP3CA", "STAT3", "P38", "IL6", "IL10", "calcium", "ORAI1", "DOK3" e "plasma cell myeloma"

Com isso, realizamos um diagrama de *Venn*, entre as 10 palavras mais frequentes para cada um dos perfis de busca contidos na **Tabela 4** (**Figura 11**). É possível observar, que entre os 4 perfis de busca contidos na **Tabela 4**, seis das 10 palavras mais frequentes são compartilhadas: akt1, nf-kb, ifng, tp53, il4, ighm (**Figura 11**). As palavras syk e hla-e estão presentes somente nas buscas que continham obrigatoriamente a palavra-chave "b cell", enquanto tlr4 estava presente apenas nas buscas que continham obrigatoriamente a palavra-chave "Dengue" (**Figura 11**).



Figura 11 – Diagrama de Venn detalhando as intersecções das 10 palavras mais frequentes nos perfis de busca listados na Tabela 4. Diagrama gerado através da ferramenta *online* Venny (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/) utilizando dados de mineração textual gerados através da plataforma IBM-Watson. Geral: 10 palavras mais frequentes usando combinações variadas das palavras-chave: "Dengue", "hemorragic Dengue fever", "b cell", "NFKB", "ERK1", "ERK2", "GCN5", "NFATC1", "NFATC2", "IRF4", "PRDM1", "XBP1", "SYK", "LYN", "MTOR", "PPP3CA", "STAT3", "P38", "IL6", "IL10", "calcium", "ORAI1", "DOK3" e "plasma cell myeloma". Dengue: 10 palavras mais frequentes usando combinações que obrigatoriamente continham "IRF4" como palavra-chave. Bcell: 10 palavras mais frequentes usando combinações que obrigatoriamente continham "lengue" como palavra-chave. Quanto mais cinza a intersecção, maior o número de palavras contida nela

A combinação dos dados gerados pelas análises de mineração textual, nos permitiram identificar moléculas de interesse e suas subsequentes vias, para as nossas análises futuras.

#### 5.2. Análise de dados de transcriptoma

Com o intuito de melhor compreender quais vias de sinalização são ativadas em células B durante a infecção pelo DENV, acessamos dados públicos de transcriptoma disponíveis na ferramenta *Gene Expression Omnibus* (GEO) do NCBI. Nesta, selecionamos os dados publicados por Kwissa et al. (2014), referenciados como: GSE51808. Esse estudo foi selecionado por ter realizado, através da plataforma de análise *Human U133 Plus 2.0 Arrays* (Affymetrix), o transcriptoma do RNA total extraído a partir do sangue de 9 indivíduos saudáveis, 18 com DF e 10 com DHF, captados no Hospital Siriraj, em Bangkok (Tailândia). Desta forma, foram realizadas análises comparativas entre os perfis dos indivíduos saudáveis (controle) com o dos pacientes infectados pelo DENV.

Antes de iniciar qualquer análise estatística utilizando dados públicos de transcriptoma disponíveis no NCBI-GEO, recomenda-se que seja feita uma avaliação do perfil de distribuição dos mesmos para as amostras selecionadas (EDGAR; DOMRACHEV; LASH, 2002). Analisar a distribuição dos dados é importante para determinar se as amostras selecionadas são adequadas para serem comparadas entre si. Geralmente, valores centrais na mediana são indicativos de que os dados são normalizados e comparáveis (EDGAR et al., 2002). Sendo assim, a primeira coisa que fizemos foi avaliar a distribuição das amostras selecionadas para o nosso estudo (GEO Ref: GSE51808) (**Figura 12**). É possível observar que as linhas que representam a mediana, presente no interior dos *boxes plot*, apresentam-se quase que igualmente distribuídas entre todas as amostras incluídas, independente do seu subtipo. Desta forma, com base nos critérios descritos acima, sabemos que dados dessas amostras são comparáveis e que é possível dar continuidade com as análises estatísticas seguintes.





A próxima coisa que decidimos investigar foi quais dos 7258 genes, provenientes do mesmo dado público de transcriptoma (GEO Ref: GSE51808), estavam entre os 10 genes mais diferentemente expressos (para mais – *upregulated* – ou para menos - *downregulated*) entre os pacientes controle e os infectados (**Tabela 5**), bem como, entre os dois grupos de pacientes infectados, uma vez que em pacientes com DHF a resposta de células B costuma ser ainda mais exacerbada do que nos com DF (THAI et al., 2011; WRAMMERT et al., 2012) (**Tabela 6**).

Tabela 5 – Dez genes mais diferentemente expressos entre amostras de sangue total de pacientes sadios (controle), com Dengue moderada (DF) e com Dengue hemorrágica (DHF).

Controle vs DF Gene LogFC <i>p</i>		Con	Controle vs DHF			Controle vs DF+ DHF		
		Gene	Gene LogFC p		Gene	Gene LogFC		
IFI27	4.93	1.29e-14	CD38	4.8	1.33e-11	IFI27	4.851	5.53e-19
RRM2	4.422	7.30e-12	IFI27	4.709	1.17e-09	RRM2	4.479	2.54e-13
CEP55	4.359	4.51e-13	RRM2	4.629	1.13e-09	CEP55	4.331	9.75e-14
BUB1	4.008	2.59e-11	TYMS	4.071	1.26e-09	CD38	4.234	6.20e-14
MCM10	3.994	4.60e-12	HMMR	3.901	9.53e-10	BUB1	4.081	4.56e-12
PI3	-4.02	1.56e-11	NOV	-3.967	3.10e-13	PI3	-3.927	6.66e-14
CNTNAP3	-3.737	3.06e-13	PI3	-3.763	8.66e-12	CNTNAP3	-3.722	5.90e-17
NOV	-3.561	1.90e-10	CNTNAP3	-3.696	5.60e-11	NOV	-3.706	1.07e-13
GRAMD1C	-2.735	7.11e-20	DSC2	-3.167	4.81e-11	MICAL2	-2.827	2.96e-13
MLH3	-2.695	1.93e-12	MICAL2	-3.067	1.38e-10	GRAMD1C	-2.732	2.06e-21

Dados gerados através da plataforma GEO2R do NCBI-GEO, através do estudo GEO Ref: GSE51808. DF: Dengue moderada; DHF: Dengue hemorrágica; FC: *Fold change*. Genes com a expressão aumentada em relação ao controle (*fold change* positivo) foram coloridos em vermelho e genes com a expressão diminuída em relação ao controle (*fold chage* negativo) foram coloridos em azul.

Tabela 6 – Dez genes mais diferentemente expressos entre amostras de sangue total de pacientes com Dengue moderada (DF) e com Dengue hemorrágica (DHF).

DF vs DHF							
Gene	LogFC	p	Gene	LogFC	Р		
IGHG1	1.588	0.00290459	PAX8-AS1	-0.982	0.00237801		
MOXD1	1.265	0.00020715	HDGFRP3	-0.928	0.00039332		
DUSP5	1.178	0.00055713	PLA2G7	-0.843	0.00165248		
DDX11L2	1.155	0.00206028	DACH1	-0.806	0.0020947		
SCIN	1.136	0.00319017	CD109	-0.797	0.00307842		

Dados gerados através da plataforma GEO2R do NCBI-GEO, através do estudo GEO Ref: GSE51808. DF: Dengue moderada; DHF: Dengue hemorrágica; FC: *Fold change*. Genes com a expressão aumentada em relação ao DF (*fold change* positivo) foram coloridos em vermelho e genes com a expressão diminuída em relação ao DF (*fold chage* negativo) foram coloridos em azul.

Na **Tabela 5**, foi observado que existem genes que se repetem entre as três comparações realizadas. Entretanto, esses genes apresentam valores de *Fold change* diferentes em cada uma dessas análises. Isso indica que, independente do

estadiamento da doença, alguns genes têm sua expressão altamente induzida ou suprimida em relação aos pacientes não infectados. Já os genes da **Tabela 6** em nada se assemelham aos genes da **Tabela 5**. Esse dado pode ser um indicativo de que as moléculas da **Tabela 6** sejam responsáveis ou participem do processo fisiopatológico diferencial entre os dois estadiamentos da doença. É importante ressaltar também, a presença do CD38, marcador de ativação altamente expresso em plasmablastos, entre os genes mais expressos nas comparações entre controle e DHF e entre controle e DF + DHF.

Decidimos, então, verificar a ontologia desses genes diferentemente expressos nas **Tabelas 5 e 6** (**Figura 13**). Para isso, utilizamos a plataforma *online Enrichr*, para gerar informações, através do banco de dados *GO Biological Process* 2017, as quais foram traduzidas e representadas de forma ranqueada. Seguindo a classificação de cores utilizada nas **Tabelas 5** e **6**, as ontologias referentes aos genes com *Fold change* positivo foram representadas em tons de vermelho e as ontologias referentes aos genes com *Fold change* negativo foram representadas em tons de azul (**Figura 13**).

# **CONTROLE vs DF**



**Figura 13 – Ontologia dos 10 genes mais diferentemente expressos, positiva ou negativamente, segundo as tabelas 5 e 6.** DF: Dengue moderada. DHF: Dengue hemorrágica. Tons de azul representam genes com *Fold change* negativo. Tons de vermelho representam genes com *Fold change* positivo. Análises realizadas utilizando o banco de dados *GO Biological Process* 2017 na plataforma *online Enrichr*.

Essa análise permitiu verificar que dentre os genes com maior *Fold change* positivo entre os indivíduos infectados e os controles, estão aqueles que participam de processos mitóticos (**Figura 13**). Já entre os genes com maior *Fold change* 

negativo, estão genes que regulam negativamente o fator de transcrição Nf-κB (**Figura 13**). Interessantemente, o NF-kB também foi descrito entre as dez palavras mais frequentes em nossas análises de mineração textual (**Figura 11** e **Tabela 4**). Quando avaliados os genes diferentemente expressos entre pacientes com DF e pacientes com DHF, é possível observar que os genes com *Fold change* positivo parecem estar relacionados com regulação da proliferação celular e resposta imune inata (**Figura 13**). Enquanto que os com *Fold change* negativo parecem estar relacionados com a regulação negativa do processo de biossíntese do DNA, remodelação da LDL e com a quimiotaxia positiva de monócitos (**Figura 13**).

Uma forma comum de se representar visualmente perfis de expressão gênica, é através de gráficos do tipo *heatmaps*. Esses gráficos foram denominados desta forma por plotarem dados utilizando assinaturas de cores quentes e frias, representando genes mais ou menos expressos respectivamente. Além disso, esse tipo de análise baseia-se em distância euclidiana e em agrupamento hierárquico, compilando verticalmente os genes com valores de expressão similares, e horizontalmente, as amostras com perfis globais de expressão equivalentes. Podendo, desta forma, ser útil para identificar genes que são comumente regulados, ou assinaturas biológicas associadas com uma condição em particular.

Com o intuito de se conhecer melhor o perfil de sinalização de alguns genes relacionados com a ativação de células B em Dengue, foram inicialmente selecionados 95 genes pertencentes à via de sinalização *downstream* ao BCR, através do banco de dados *B Cell Receptor Signaling Pathway* (Homo sapiens), disponível em WikiPathways (http://www.wikipathways.org). Assim, foi gerado um *heatmap* através da função heatmap.2 do pacote *gplots - Various R programming tools for plotting data* (**Figura 14**). Essa etapa foi realizada em parceria com o laboratório do Professor Helder Nakaya (FCF-USP), mais especificamente pelo doutorando Diógenes Ribeiro de Lima. Os dados de entrada foram os valores de expressão de mRNA fornecidos para cada amostra pelo NCBI-GEO (GEO Ref: GSE51808), e identificados em cada um dos três grupos: controle, DF e DHF. Os dados resultantes foram plotados com tons de azul ou vermelho atribuídos para cada valor, sendo que tons de azul indicam amostras com genes menos expressos e tons de vermelho indicam amostras com genes mais expressos, em relação aos demais daquela linha.



Figura 14 Heatmap \_ representativo da expressão de genes relacionados à ativação de linfócitos B em sangue total de pacientes sadios (controle), com Dengue moderada (DF) е com Dengue hemorrágica (DHF). expressão de Dados retirados do estudo NCBI-GEO Ref: GSE51808 utilizando genes descritos no banco de dados B Cell Receptor Signaling Pathway (Homo sapiens), disponível em **WikiPathways** (http://www.wikipathways.org ). Tons de azul indicam amostras com genes menos expressos em relação aos demais daquela linha. Tons de vermelho indicam amostras com genes mais expressos, em relação aos demais daquela linha. (A): cluster gênico com perfil heterogêneo entre as amostras. (B): cluster gênico onde a expressão é maior nos indivíduos controles do que nos pacientes infectados. (C): cluster gênico onde a é menor nos expressão indivíduos controles do que nos pacientes infectados.

É possível verificar que embora o perfil de expressão desses genes seja muito heterogêneo, todos os indivíduos controles foram agrupados no mesmo cluster (Figura 14, canto direito). Isso indica que essas amostras apresentam um perfil semelhante de expressão para esse grupo de 95 genes. Além disso, é possível identificar que dentre os pacientes infectados, sejam DF ou DHF, há um grupo com perfil de expressão oposto ao controle (Figura 14, canto esquerdo), e um grupo com perfil de expressão intermediário (Figura 14, centralizado). Aqueles representados no canto esquerdo caracterizam, em sua maioria, pacientes com Dengue hemorrágica. Quanto aos genes, foi possível verificar que também há aproximadamente três grandes clusters formados: 1) aqueles com perfil heterogêneo entre as amostras, concentrados na parte superior do heatmap (Figura 14 A; n=33), 2) aqueles com maior expressão no grupo controle do que no grupo de infectados, concentrados na região central do *heatmap* (Figura 14 B; n=35), 3) aqueles com menor expressão no grupo controle do que no grupo de infectados, agrupados na parte inferior do heatmap (Figura 14 C; n=27). De maneira geral, esses dados reforçam a hipótese de que vias de sinalização se encontram desreguladas durante a infecção pelo DENV, em especial aquelas envolvendo moléculas-chave na ativação de células B, sendo mais intensa nos pacientes com DHF do que nos pacientes com a forma mais branda da doença. Entretanto, vale ressaltar aqui, que estas são amostras de sangue total e não de linfócitos B isolados.

Embora todos os genes avaliados no *heatmap* sejam correlacionados com vias de ativação dos linfócitos B e apresentem esta ontologia em comum, resolvemos avaliar se os agrupamentos gênicos formados (A, B e C da **Figura 14**) possuíam diferenças entre o tipo de atividade celular que estes genes exercem (ex: enzimática, transporte, etc.). Para isso, avaliamos a função molecular destes agrupamentos gênicos dentro do banco de dados *GO Molecular Function* 2017 pela plataforma *online Enrichr*. Essa análise gerou dados representados em forma de gráficos de barra, onde quanto maior era o comprimento da barra e mais clara a sua cor, maior a significância daqueles genes em relação a aquele termo (**Figura 14 A-C**).
	Ligação à proteína quinase (GO: 0019901)
	Atividade de fator de transcrição, ligação à sequência de DNA específica (GO: 0003700)
	Atividade proteína serina/treonina quinase (GO: 0004674)
_	Atividade de quinase (GO: 0016301)
Α	Atividade de ativador da transcrição, ligação sequencia-específica da RNA polimerase II à região proximal
	Ligação ao DNA (GO: 0003677) do promotor central (GO: 0001077)
	Ligação à resíduos de fosfotirosina (GO: 0001784)
	Ligação sequência-específica da RNA polimerase II à região proximal do promotor central (GO:0000978)
	Ligação à ubiquitina-proteína-ligase (GO: 0031625)
	Atividade fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (GO:0046934)
	Atividade proteína serina/treonina quinase (GO: 0004674)
	Ligação à proteína quinase (GO: 0019901)
	Ligação à resíduos de fosfotirosina (GO: 0001784)
_	Atividade de quinase (GO: 0016301)
R	Atividade de adaptador SH3 / SH2 (GO: 0005070)
	Atividade proteína tirosina quinase não membrana abrangente (GO:0004715)
	Atividade fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (GO:0046934)
	Atividade proteína quinase (GO:0004672)
	Atividade de fator de transcrição, ligação à sequência de DNA específica (GO:0003700)
	Ligação de tioesterase (GO: 0031996)
	Atividade de proteína quinase (GO:0004672)
	Ligação à resíduos de fosfotirosina (GO: 0001784)
	Atividade de adaptador do receptor transmembranar de proteína tirosina quinase (GO: 0005068)
0	Atividade fosfatidilinositol-4,5-bisfosfate 3-quinase (GO:0046934)
	Atividade de fator de troca de guanina-nucleotídeo (GO: 0005085)
	Atividade de homodimerização protéica (GO: 0042803)
	Atividade de fator de transcrição, ligação sequência-específica da RNA polimerase II à região proximal do
	Atividade do fator de troca de Ras guanina-nucleotídeo (GO: 0005088)
	Atividade de ativador GTPase (GO:0005096)
	Ligação sequência-específica da RNA polimerase II à região proximal do promotor central (GO:0000978)
	DEFINIÇÕES PADRÕES
	ligação à X
	Atividade [enzima]
	Catálise da reação: [reação catalisada pela enzima].
	Combina com X para iniciar uma alteração na atividade celular.
	Atividade de transportador de X
	Permite o movimento direcionado de x para dentro, fora ou dentro de uma célula, ou entre células.

Figura 15 – Classificação ontológica baseada na função molecular, dos genes agrupados em A, B ou C da Figura 14. Análise realizada através da plataforma *online Enrichr*, utilizando o banco de dados *GO Molecular Function* 2017. Os resultados foram traduzidos para melhor entendimento mantendo-se as cores e comprimento das barras originais.

O agrupamento A (**Figuras 14 A** e **15 A**) apresenta genes cujas três principais funções foram: interação seletiva e não covalente à proteínas quinases, fatores de transcrição e atividade serina/treonina quinase. Já o agrupamento B (**Figuras 14 B** e **15 B**) possui genes com três principais funções: atividade serina/treonina quinase, ligantes a proteínas quinases e interação seletiva e não covalente à fosfotirosinas. Por fim, o agrupamento C (**Figura 14 C** e **15 C**) apresenta genes cujas três principais funções foram: atividade proteína quinase, interação seletiva e não covalente à fosfotirosinas dunções foram: atividade proteína quinase, interação seletiva e não covalente à fosfotirosinas e proteínas permitem o transporte de tirosina quinases para dentro ou fora das células.

### 5.3. Construção de uma hipotética via de diferenciação de células B em plasmablastos durante infecção pelo DENV

Combinando dados da literatura, com mineração textual e dados públicos de transcriptoma nós esquematizamos uma via contendo hipotéticas moléculas que podem estar influenciando a diferenciação das células B em plasmablastos durante a infecção pelo DENV (**Figura 16**). Uma tabela descritiva sobre as moléculas incluídas nessa via e suas referências encontra-se disponível no **Anexo 3**.



**Figura 16 – Via hipotética de moléculas envolvidas na diferenciação de células B em plasmablastos durante infecção pelo vírus da Dengue.** Via de sinalização intracelular construída com base na literatura, dados de mineração textual e dados públicos de transcriptoma. As moléculas foram coloridas de acordo com o seu perfil de expressão (disponíveis em GEO-NCBI: GSE51808). Linhas pontilhadas representam dados hipotéticos. Linhas vermelhas representam sinais inibitórios. Linhas pretas representam sinais indutores. Linhas douradas representam sinais indutores de IDO. Os dados foram comparados utilizando teste t. DF: Dengue Moderada

Das 56 moléculas que tiveram expressões gênicas avaliadas nesta via, 18 apresentaram a expressão aumentada no sangue total de pacientes com DF em relação a indivíduos saudáveis (Figura 16 quadrados vermelhos). Apenas 11

apresentaram a expressão reduzida (**Figura 16** quadrados azuis). Outras 27 apresentaram expressão semelhante entre os pacientes com DF e indivíduos saudáveis (**Figura 16** quadrados cinza).

Dentre àquelas contidas nas 10 palavras mais frequentes resultantes de nossas buscas por mineração textual (**Figura 11**), apenas o STAT3 encontra-se com expressão aumentada (**Figura 16**). Interessantemente, outras moléculas relacionadas à via do STAT3, seja *upstream* (IL-10 e IL-6) ou *downstream* (IRF4 e BLIMP1 – chave no processo de diferenciação de células B em ASCs), também apresentam sua expressão aumentada (**Figura 16**). Ainda, as duas moléculas sinalizadas como repressoras da ativação do STAT3, a Calcineurina e a SOCS3, apresentaram suas expressões gênicas reduzidas ou não alteradas respectivamente (**Figura 16**). Outro ponto interessante é a menor expressão de moléculas que respondem aos sinais de cálcio, como a já mencionada Calcineurina e as moléculas NFATC1, DOK3 e GRB2 (**Figura 16**).

Curiosamente, LYN, uma molécula-chave na regulação negativa da geração excessiva de ASCs (INFANTINO et al., 2014), encontrou-se com a expressão gênica reduzida (**Figura 16**).

### 5.4. Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante co-cultura de linfócitos B humanos e monócitos infectados com DENV

Tendo em vista que nosso objetivo é compreender a expansão massiva de ASCs vista durante a infecção pelo DENV, e que, devido à baixa incidência de Dengue na cidade de São Paulo/SP nos anos que sucederam o início desse projeto a obtenção de amostras de pacientes foi imensamente prejudicada. Dessa forma, decidimos testar um modelo *in vitro* de diferenciação em ASCs proposto por Kwissa et al. (2014), onde células B isoladas foram colocadas em co-cultura com monócitos previamente infectados com DENV por 48 horas.

Em parceria com o Professor Luis Carlos de Souza Ferreira do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas no Departamento de Microbiologia do ICB/USP, iniciamos as primeiras tentativas de execução deste protocolo. Para tais, utilizamos um vírus da Dengue, isolado clínico da Nova Guiné C (DENV2 NGC), pertencente ao sorotipo 2. Inicialmente, tivemos dificuldades na recuperação dos monócitos infectados da placa de cultura e algumas modificações do protocolo foram necessárias

(dados não gerados). Acertado isso, conseguimos levar o experimento a diante. Entretanto, a capacidade de geração de ASCs através desse modelo foi ínfima, como demonstrado pelos dados de ELISPOT (**Figura 17 A** representativo e **Figura 17 B** ASCs por milhão). Quando mantidas em co-cultura com monócitos não infectados, 10 ASCs por milhão de célula B foram enumeradas (**Figura 17 B**). Apenas 36 ASCs por milhão de células B foram geradas quando colocadas em co-cultura com monócitos previamente infectados durante 48 horas com o DENV2 NGC (**Figura 17 B**). Estes números eram muito aquém daqueles obtidos quando células B foram tratadas com mitógenos (**Figura 22**).



Figura 17 – Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante co-cultura de linfócitos B e monócitos humanos infectados com DENV2 NGC. Linfócitos B humanos foram isolados de PBMCs através de *beads* magnéticas anti-CD19 e mantidos em cultura por 6 dias isoladamente ou na presença de monócitos isolados de PBMCs através de *beads* magnéticasaAnti-CD14+, infectados ou não pelo vírus da Dengue sorotipo 2, isolado clínico da Nova Guiné C (DENV2 NGC), MOI:1, por 48 horas. A) Comparação entre o número de "*spots*" gerados em cada uma das

condições, sem diluição (2x10<sup>5</sup> células viáveis/poço). B) Número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de células. Dados representativos de um único experimento.

Decidimos então, avaliar este mesmo modelo utilizando outra cepa de DENV, conhecida por uma maior adaptação na capacidade infectiva *in vitro*: a DENV4 TVP/360 (vírus da Dengue sorotipo 4 TVP/360). Esta etapa foi realizada em parceria com o Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR), sob a supervisão da Pesquisadora Claudia Nunes Duarte dos Santos e orientação da Pesquisadora Pryscilla Wowk. Desta vez, testamos o MOI:10 além do MOI:1 descrito no protocolo original por Kwissa et al. (2014) (**Figura 18**).



Figura 18 – Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante co-cultura de linfócitos B e monócitos humanos infectados com DENV4 TVP/360 em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs). Imagem representativa do número de "*spots*" gerados (2x10<sup>5</sup> células viáveis/poço) a partir de linfócitos B humanos isolados de PBMCs com *beads* magnéticas anti-CD19 e mantidos em cultura por 6 dias isoladamente ou na presença de monócitos isolados de PBMCs através de *beads* magnéticas anti-CD14+, infectados ou não pelo vírus da Dengue sorotipo 4 cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foram utilizados os MOI:1 e MOI:10, e o contato vírus-monócito foi mantido por 48 horas. Dados representativos de um único experimento.

Diferentemente do esperado, nenhum *spot* foi detectado, independente do MOI utilizado e de termos utilizado uma cepa de DENV adaptada para infecções *in vitro* (Figure 18)

#### (**Figura 18**).

Em seu trabalho, Kwissa et al. (2014) destacaram a importância dos monócitos portadores do fenótipo duplo positivo CD14+ CD16+ para a promoção da diferenciação de células B em ASCs na resposta contra o DENV. Sendo assim, nos questionamos se a falta de diferenciação encontrada em nossos ensaios estava relacionada com a não aquisição do fenótipo duplo positivo pelos monócitos na

presença do DENV4 TVP/360. Para responder à essa pergunta, realizamos uma análise cinética da expressão dos marcadores CD14 e CD16 nessas células nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas (**Figura 19 A** imagem representativa e **B** porcentagem no grupo amostral).



CD14+

B)



Figura 19 – Avaliação da capacidade de aquisição do fenótipo duplo positivo (CD14/CD16) por monócitos mantidos em cultura durante 72h com ou sem a presença de DENV. Monócitos (CD14+) foram isolados por *beads magnéticas* a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis. Estes, foram infectados ou não pelo vírus da Dengue cepa TVP/360 pertencente ao sorotipo 4 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado um MOI:1 e o contato vírus-monócito foi mantido por 72 horas em cultura. Após esse período, essas células foram recuperadas, lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD16 e anti-CD14 conjugados a fluorocromos. As leituras correspondentes às

fluorescências foram adquiridas em um citômetro de fluxo e as análises realizadas através do software FlowJo. A) Imagem representativa. B) Porcentagem de células duplo positivas para CD14 e CD16. Dados apresentados como mediana (linha) e valores individuais (n=3; círculos), estatisticamente comparados de forma pareada por teste Friedman e pós teste Dunn's.

Foi possível observar que a simples manutenção desses monócitos em cultura, independente da presença do vírus, já fazia com que eles adquirissem o fenótipo duplo positivo (CD14+ CD146+) (**Figura 19 A** imagem representativa e **B** porcentagem no grupo amostral). Portanto, a hipótese anterior foi descartada.

Já o protocolo de infecção por DENV padronizado para PBMCs no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR) consistia em manter as células em contato com o inóculo viral por 1 hora, na presença de meio RPMI não suplementado com soro fetal bovino, seguido da remoção do inóculo e lavagem das células. Suspeitando que a manutenção dos monócitos em contato com o vírus por 48 horas, conforme preconizado no protocolo de Kwissa et al. (2014), estivesse potencialmente induzindo a morte dos mesmos, ou ainda, que durante esse período as células B mantidas em *"resting"* estivessem igualmente perdendo o seu potencial de ativação, decidimos testar uma última adaptação neste modelo. Dessa vez, infectamos os monócitos seguindo a padronização do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR), removendo o inóculo viral após 1 hora e só então, esses monócitos foram colocados em contato com as células B (**Figura 20**).



**Figura 20 – Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante co-cultura de linfócitos B e monócitos humanos infectados por somente 1 hora com DENV4 TVP/360.** Imagem representativa do número de "*spots*" gerados (1,1x10<sup>4</sup> células viáveis/poço) a partir de linfócitos B isolados de PBMCs com *beads* magnéticas anti-CD19 e mantidos em cultura por 6 dias isoladamente ou na presença de monócitos

isolados de PBMCs com *beads* magnéticas Anti-CD14+, infectados ou não pelo vírus da Dengue sorotipo 4 cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado um MOI:1 e o contato vírus-monócito foi mantido por 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Dados representativos de um único experimento contendo 4 diferentes amostras.

Como é possível observar, mesmo com a modificação do protocolo de infeção, não foram detectados "*spots*" mediante co-cultura de linfócitos B (CD19+) e monócitos (CD14+) (**Figura 20**).

Desta forma, por não conseguirmos reproduzir a diferenciação de células B em ASCs descrita por Kwissa et al. (2014), decidimos abandonar o modelo e buscar novas estratégias.

### 5.5. Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante estimulação de PBMCs por mitógenos ou infecção por DENV

### 5.5.1 Padronização do controle positivo – geração de ASCs mediante estímulo por mitógenos

Antes de iniciarmos novos ensaios de diferenciação de células B em ASCs mediante infecção por DENV *in vitro*, padronizamos um modelo de diferenciação destas células baseado na estimulação por mitógenos, com o intuito de usá-lo como um controle positivo.

Em seu trabalho, Crotty et al. (2004) descreveram a detecção de uma maior magnitude de ASCs entre o 5º e o 7º dia de cultura celular na presença da combinação dos mitógenos *Pokeweed mitogen* (PWM), *Streptococcus aureaus cowan* (SAC) e CpG ODN 2006. Sendo assim, nós mantivemos inicialmente nossas culturas estimuladas inicialmente por um período de 5 dias apenas (**Figura 21 A** e **B**).



B)

A)

**Figura 21 – Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante estimulação de PBMCs por mitógenos durante 5 ou 7 dias.** PBMCs humanas foram isoladas através de centrifugação em gradiente de histopaque e mantidas em cultura por 5 ou 7 dias isoladamente ou na presença dos mitógenos *Pokeweed mitogen* (PWM), *Streptococcus aureaus cowan* (SAC) e CpG ODN 2006. A) Representativo do número de "*spots*" gerados após 5 dias de cultura para IgG em cada uma das condições, após diluições seriadas (3,7x10<sup>4</sup> células viáveis/poço). B) Número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs após 5 dias de cultura para IgG em cada uma das condições, após número de "*spots*" gerados após 7 dias de cultura para IgG em cada uma das condições, após produtoras de IgG por milhão de PBMCs após 5 dias de cultura. C) Representativo do número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs após 5 dias de cultura. D) Número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs após 5 dias de cultura. C) Representativo do número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs após 5 dias de cultura. C) Representativo do número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs após 7 dias de cultura. B) Número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs após 7 dias de cultura. A linha pontilhada representa o valor obtido com 5 dias de cultura, representado na letra B. Dados representativos de um único experimento contendo 1 única amostra.

Embora tenha sido possível observar que houve a diferenciação de células B em ASCs com 5 dias de cultura (Figura 21 A e B), a magnitude dessa resposta foi

58

considerada por nós aquém do esperado (grupo PBMC: 6 ASCs por milhão de PBMCs; grupo PBMC + mitógenos: 108 ASCs por milhão de PBMCs; n=1). Por tal razão, decidimos repetir o protocolo, aumentando o número de dias de cultura para 7 dias (**Figura 21 C** e **D**).

Foi possível observar que o ajuste no protocolo, aumentando o tempo de cultura de 5 para 7 dias levou à uma massiva diferenciação celular (grupo PBMC: 189 ASCs por milhão de PBMCs; grupo PBMC + mitógenos: 5109 ASCs por milhão de PBMCs; n=1; comparativo com linha pontilhada **Figura 21 D**). Desta forma, padronizamos todos os ensaios seguintes de cultura celular de 7 dias.

## 5.5.2 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) a ser utilizada na avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante infecção por DENV4 TVP/360

Com o modelo-controle de diferenciação por mitógenos padronizado, demos sequência a tentativa de estabelecer um modelo *in vitro* de diferenciação das células B em ASCs por infecção pelo DENV. Correa et al. (2015) detectaram a presença de IgM no sobrenadante de culturas de PBMCs infectadas com DENV1 no MOI:1, após 12 dias de cultura. Tomamos este dado como um indicativo de que as células B presentes nas PBMCs apresentam a capacidade de se diferenciarem em ASCs mediante infecção por DENV *in vitro*, e testamos este protocolo (**Figura 22**). Entretanto, decidimos incluir em nosso piloto o MOI:10 também, tendo em vista que o grupo de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR) demostrou que, apenas a partir deste, a infeção por DENV era detectável nessas células (SILVEIRA et al., 2018) (**Figura 22**).



Figura 22 – Comparação entre a capacidade de geração de ASCs derivadas de PBMCs após infecção por DENV4 TVP/360 em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs). PBMCs humanas foram isoladas através de centrifugação em gradiente de histopaque e, mantidas em cultura por 7 dias, isoladamente ou após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360), nos MOI:1 e MOI:10, durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. A) Representativo do número de "spots" gerados para IgG em cada uma das condições, após diluições seriadas (8x10<sup>4</sup> células viáveis/poço). B) Número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs. Dados representativos de um único experimento. Mock: grupo estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção. Dados representativos de um único experimento contendo 1 única amostra.

MOI:1

Como foi possível observar, a diferenciação em ASCs induzida pela infecção viral no MOI:10 foi quase o triplo da induzida pela infecção no MOI:1 (grupo PBMC mock: 24 ASCs por milhão de PBMCs; grupo PBMC + DENV4 TVP/360 MOI 1: 36 ASCs por milhão de PBMCs; grupo PBMC + DENV4 TVP/360 MOI 10: 132 ASCs por milhão de PBMCs; n=1; **Figura 22**). Desta forma, padronizamos que as infecções ocorreriam sempre no MOI:10 para os ensaios seguintes.

# 5.5.3 Avaliação da capacidade de aquisição do fenótipo de secretora de anticorpos (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360

Para a determinação da aquisição do fenótipo de ASCs por citometria de fluxo, utilizamos a estratégia de *gating* descrita anteriormente (QUÁCH et al., 2016), que consiste na seleção da população correspondente aos linfócitos e correspondente a células de tamanho um pouco maiores (equivalente a população dos monócitos, uma vez que as ASCs são maiores do que linfócitos B naïve), através dos parâmetros de tamanho (*Forward Scatter* ou FSC) e complexidade (*Side Scatter* ou SSC) (**Figura 23 A**). Em seguida foram excluídas as células reconhecidas como duplicadas das leituras (**Figura 23 B** e **C**). Feito isso, as células CD20 negativas foram selecionadas (**Figura D**) para posterior seleção daquelas que expressavam altas quantidades dos marcadores de ativação CD27 (CD27<sup>high</sup>) e CD38 (CD38<sup>high</sup>) (**Figura 23 E**).



Figura 23 – Estratégia de gating utilizada nos ensaios de citometria de fluxo para caracterização fenotípica das células secretoras de anticorpos. PBMCs humanas foram isoladas através de centrifugação em gradiente de histopaque e, mantidas em cultura, por 7 dias na presença dos mitógenos (Pokeweed mitogen [PWM], Streptococcus aureaus cowan [SAC] e CpG ODN 2006) ou após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado o MOI:10 e o contato vírus-células foi mantido durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Após 7 dias, essas células foram recuperadas, lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD20, CD38 e CD27 conjugados a fluorocromos. As leituras correspondentes às fluorescências foram adquiridas em um citômetro de fluxo e as análises realizadas através do software FlowJo. A) Seleção da população correspondente aos linfócitos e correspondente a células de tamanho um pouco maiores, através dos parâmetros de tamanho (Forward Scatter ou FSC) e complexidade (Side Scatter ou SSC) B e C) Exclusão das leituras duplicadas D) Seleção das células CD20 negativas. F) Seleção das células que são altamente positivas para CD27 (CD27<sup>high</sup>) e altamente positivas para CD38 (CD38<sup>high</sup>) Dentro da população de células CD20 negativas.

Seguimos então para a avaliação da capacidade de aquisição do fenótipo de ASCs mediante infecção de PBMCs por DENV *in vitro*, com um número amostral maior. Amostras de sangue foram coletadas de 19 indivíduos saudáveis e utilizadas para a obtenção de PBMCs através de centrifugação por gradiente de histopaque. Essas PBMCs foram mantidas em cultura por 7 dias após terem sido estimuladas com uma das seguintes condições: I) Sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas (Mock), II) mitógenos e III) DENV4 TVP/360, MOI:10. Após 7 dias, essas células foram recuperadas, lavadas e marcadas com anticorpos Anti-CD20, CD38 e CD27 conjugados à fluorocromos. As leituras correspondentes às fluorescências foram adquiridas em um citômetro de fluxo e as análises realizadas através do software FlowJo. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 24** na forma de valores individuais (círculos) e mediana (linha). Esses dados representam 5 experimentos realizados individualmente, com cerca de 4 amostras/cada.

Toda essa etapa foi conduzida no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR), sob orientação da Pesquisadora Pryscilla Wowk e auxílio do doutorando Allan Cataneo.





Figura 24 – Avaliação da capacidade de aguisição do fenótipo de secretora de anticorpos (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360. PBMCs humanas foram isoladas através de centrifugação em gradiente de histopaque e, mantidas em cultura, por 7 dias na presença dos mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM], *Streptococcus aureaus* cowan [SAC] e CpG ODN 2006) ou após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado o MOI:10 e o contato vírus-células foi mantido durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Após 7 dias, essas células foram recuperadas, lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD20, CD38 e CD27 conjugados a fluorocromos. As leituras correspondentes às fluorescências foram adquiridas em um citômetro de fluxo e as análises realizadas através do software Flow Jo. A) Imagem representativa. B) Porcentagem de células CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>. C) Número absoluto de células CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> por milhão de PBMCs. Mock: grupo estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção. Dados apresentados como mediana (linha) e valores individuais (n=19; círculos), estatisticamente comparados de forma pareada por teste Friedman e pós teste Dunn's.

Como foi possível observar, enquanto que as PBMCs estimuladas com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas (Mock) apresentaram uma frequência mediana de apenas 0,025% (percentil 25% / 75%: 0.0068 / 0.2730) de ASCs (CD20<sup>neg</sup> CD38<sup>high</sup> CD20<sup>high</sup>) após 7 dias de cultura (Figura 24 B), equivalentes à uma mediana de 200 (percentil 25% / 75%: 26/ 252) ASCs por milhão de PBMCs (Figura 24 C), as PBMCs estimuladas com mitógenos apresentaram uma frequência mediana de 0,33% (percentil 25% / 75%: 0,108 / 1,61) de ASCs (CD20<sup>neg</sup> CD38<sup>high</sup> CD20<sup>high</sup>) nesse mesmo período (Figura 24 B). Essa porcentagem equivale à 635 (percentil 25% / 75%: 191 / 3100) ASCs por milhão de PBMCs (p em relação ao Mock: <0,01; Figura 24 C). Já as PBMCs infectadas pelo DENV4 TVP/360 apresentaram uma frequência mediana de 0,17% (percentil 25% / 75%: 0,034 / 0,666) de ASCs (CD20<sup>neg</sup> CD38<sup>high</sup> CD20<sup>high</sup>) após 7 dias de cultura (Figura 24 B), equivalentes à 1272 (percentil 25% / 75%: 214 / 4135) ASCs por milhão de PBMCs (Figura 24 C). Dessa forma, a infecção pelo DENV4 TVP/360 é capaz de induzir a aquisição do fenótipo de ASCs (CD20<sup>neg</sup> CD38<sup>high</sup> CD20<sup>high</sup>) em 0,17% das células B presentes nas PBMCs, na mesma magnitude que a estimulação destas com mitógenos (Figura 24 A-C), tanto em termos de porcentagem (p em relação ao Mock: <0,05; p em relação ao grupo mitógenos: >0,05; Figura 24 B) quanto em número absoluto por milhão de PBMCs (p em relação ao Mock: <0,01; p em relação ao grupo mitógenos: >0,05; Figura 24 C).

## 5.5.4 Avaliação da capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (produção de IgG) mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360

Em seguida, avaliamos a capacidade de aquisição da função de secreção de anticorpos (IgG) mediante infecção de PBMCs por DENV *in vitro*. Utilizamos as mesmas 19 amostras e condições experimentais descritas no **Item 5.5.3**, porém, no sétimo dia, essas células foram recuperadas, contadas e distribuídas em placas de ELISPOT previamente sensibilizadas com anticorpos anti-IgG total humano. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 25** na forma de valores individuais (círculos) e mediana (linha). Esses dados representam 5 experimentos realizados individualmente, com cerca de 4 amostras/cada.

Toda essa etapa também foi conduzida no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR), sob orientação da Pesquisadora Pryscilla Wowk e auxílio do doutorando Allan Cataneo, exceto pela aquisição das imagens de ELISPOT, que foram realizadas no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia do Departamento de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP (São Paulo/SP).

A)

B)



Figura 25 – Avaliação da capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (IgG) mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360. PBMCs humanas foram isoladas através de centrifugação em gradiente de histopaque e, mantidas em cultura, por 7 dias na presença dos mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM], *Streptococcus aureaus cowan* [SAC] e CpG ODN 2006) ou após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado o MOI:10 e o contato vírus-células foi mantido durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Após 7 dias, essas células foram recuperadas, contadas e distribuídas em placas de ELISPOT previamente sensibilizadas com anticorpos anti-IgG total humana. A) Imagem representativa do ensaio de ELISPOT. B) Número absoluto de ASCs

produtoras de IgG por milhão de PBMCs. Mock: grupo estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção. Dados apresentados como mediana (linha) e valores individuais (n=19; círculos), estatisticamente comparados de forma pareada por teste Friedman e pós teste Dunn's.

Como foi possível observar, enquanto que as PBMCs estimuladas com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas (Mock) apresentaram uma mediana de 250 (percentil 25% / 75%: 31 / 847) ASCs por milhão de PBMCs no sétimo dia de cultura (**Figura 25 B**), as PBMCs estimuladas com mitógenos apresentaram 2010 (percentil 25% / 75%: 810 / 12000) ASCs por milhão de PBMCs nesse mesmo período (p em relação ao Mock: <0,01; **Figura 25 B**). Já as PBMCs infectadas pelo DENV4 TVP/360 apresentaram uma mediana 853 (percentil 25% / 75%: 375 / 1380) ASCs por milhão de PBMCs (p em relação ao Mock: <0,05; **Figura 25 B**). A infecção de PBMCs pelo DENV4 TVP/360 foi, portanto, capaz de induzir a aquisição de função de secreção de anticorpos (IgG) pelas células B presentes no PBMCs, após 7 dias de cultura, na mesma magnitude que os mitógenos (p em relação ao grupo mitógenos: >0,05; **Figura 25 B**). Esses dados, juntamente com os descritos no **Item 5.5.3** comprovam que este é um bom modelo de diferenciação de células B em ASCs mediante infecção por DENV *in vitro*.

Nos perguntamos, então, se a diferenciação estava ocorrendo de maneira semelhante para ambos estímulos dentro de uma mesma amostra. Aquelas com maior enumeração de ASCs na presença dos mitógenos também eram aquelas com maior enumeração de ASCs na presença do vírus? Existe um perfil definido na resposta celular obtida?

Para responder a estes questionamentos, elaboramos um *heatmap* utilizando o número absoluto de ASCs produtoras de IgG, por milhão de PBMCs, que foram detectadas por ELISPOT e representadas na **Figura 25 B** (**Figura 26**). Esta etapa foi realizada em parceria com o laboratório do Professor Helder Nakaya (FCF-USP), com o auxílio da doutoranda Patrícia Gonzales. Para tal, as amostras foram normalizadas por *z score* e plotadas nas linhas (**Figura 26**) e os tratamentos foram plotados nas colunas (**Figura 26**). Além disso, foram agrupadas verticalmente amostras com perfis de enumeração de *spots* similares, e horizontalmente, os grupos de tratamento com perfis globais de enumeração de *spots* parecidas (**Figura 26**).

A transformação dos valores em *Z* score é importante, pois fornece uma unidade básica de comparação entre dados que, se dispostos de outra forma,

67

apresentariam uma variação muito ampla. Seus valores oscilam entre -2 < Z < +2. Esse tipo de unidade permite avaliar o quanto uma medida se afasta da média em termos de desvio padrão (CHEADLE et al., 2003). Dessa forma, quando o *Z score* é positivo, é indicativo de que o dado está acima da média. Quando o *Z score* é negativo, é indicativo de que o dado está abaixo da média.



Figura 26 – Heatmap representativo da enumeração de células secretoras de IgG geradas mediante cultura de PBMCs humanas na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360. Dados representativos do número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs, geradas através de cultura na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360 e enumeradas por ELISPOT. Análise realizada através da função heatmap.2 do pacote *gplots - Various R programming tools for plotting data*, em R. Quanto maior a intensidade do vermelho maior a enumeração de *spots* daquela linha.

Foi possível observar que as amostras com maior enumeração de ASCs na presença dos mitógenos não foram as mesmas com maior enumeração de ASCs na presença do vírus (**Figura 26**). As amostras #15, #9, #7, #4, #6 e #2, agrupadas na parte superior do *heatmap* apresentaram um perfil de resposta maior através da

indução de diferenciação pelo vírus que pelos mitógenos (**Figura 26**, parte superior). Enquanto que as demais amostras apresentaram um perfil oposto (**Figura 26**, parte inferior). Dois pontos são dignos de nota aqui: 1) isso não significa que essas amostras responderam apenas para um tratamento e não para o outro, mas sim que o fato de uma amostra em particular se diferenciar com uma determinada magnitude na presença de um estímulo não implica que ela irá se diferenciar com a mesma magnitude para o outro. Entretanto, ela responde para ambos; 2) a amostra #5 se destaca como um *outlier*, onde a maior enumeração de ASCs ocorreu no poço sem nenhum estímulo (Mock) (**Figura 26**).

A partir desse resultado, um novo questionamento surgiu. Estariam então as amostras #15, #9, #7, #4, #6 e #2 (Figura 26, parte superior) apresentando uma maior resposta ao vírus que as demais devido à uma exposição prévia dos seus doadores ao DENV? Para responder à esta pergunta realizamos um ELISA anti-IgG específico para NS1 dos quatro sorotipos virais (Figura 27). Esta etapa foi realizada em parceria com o Professor Luis Carlos Ferreira (ICB/USP), com o auxílio do doutorando Samuel Pereira, e contou com uma proteína recombinante contendo as NS1 dos 4 sorotipos de DENV. Vale salientar, que infelizmente, não possuíamos o soro de todos os doadores para esta análise. Uma amostra de soro de um paciente sabidamente exposto ao DENV (oriunda da coleção de amostras do Prof. Luis) foi utilizada como controle positivo do ensaio, enquanto que outra sabidamente não reagente para DENV (oriunda da coleção de amostras do Prof. Luis), foi utilizada como controle negativo (Figura 27). Foram consideradas reagentes apenas as amostras que se encontravam acima do limite de detecção determinado pelo controle negativo (Figura 27, área cinza do gráfico).



#### Amostras

Figura 27 – Título de anticorpos IgG anti-NS1 (DENV1-4) no soro dos doadores de sangue para os experimentos *in vitro*. Quantificação dos títulos de IgG anti-NS1no soro dos indivíduos saudáveis doadores de sangue para a parte experimental *in vitro* deste projeto por ELISA. Controle positivo: amostra de um doador sabidamente exposto ao DENV e devidamente caracterizada como tal. Controle negativo: amostra de um doador sabidamente nunca exposto ao DENV e devidamente caracterizada como tal. Área cinza do gráfico: limite de detecção determinado pelo controle negativo. Amostras consideradas reagentes (previamente expostas ao vírus): amostras com títulos acima do limite de detecção.

Como foi possível observar, apenas 3 amostras (#13, #16 e #7) foram consideradas reagentes, ou seja, previamente expostas ao DENV (Figura 27, amostras acima da área cinza). Destas, somente a #7 também se encontrava entre as que tiveram maior enumeração de ASCs mediante infecção pelo DENV4 TVP/360 (Figura 26, parte superior). Além disso, os títulos de anticorpos detectados foram extremamente baixos se comparados com o controle positivo para as três amostras reagentes (Figura 27, amostras acima da área cinza e linha pontilhada superior respectivamente). Dessa forma, é possível concluir que a maior enumeração de ASCs mediante infecção pelo DENV4 TVP/360 não está relacionada com uma exposição prévia de seus doadores ao vírus. Da mesma forma, pode-se dizer que uma exposição prévia ao vírus não pareceu ser importante para a indução da diferenciação em ASCs induzida por DENV *in vitro*.

Decidimos avaliar, então, se a diferenciação em ASCs estava relacionada com a carga viral. Para isso, avaliamos tanto o sobrenadante das culturas por titulação (**Anexo 4**) quanto os transcritos celulares por qPCR (**Anexo 5**). Entretanto, não foi possível realizar essa correlação, pois não detectamos nem partículas infectivas no sobrenadante (no dia 7) das culturas infectadas com DENV4 TVP/360 (**Anexo 4**) nem RNA viral em quantidades significativas no interior das células (**Anexo 5**).

Ainda, tendo em vista que há uma extensa literatura suportando o fato de que, independentemente da idade, as mulheres tendem a apresentar respostas de anticorpos maiores que os homens, bem como níveis basais de imunoglobulina mais altos e maior número de células B (KLEIN; FLANAGAN, 2016), decidimos investigar se existia uma diferença na diferenciação em ASCs entre as amostras doadas por mulheres ou por homens em nosso estudo (**Figura 28 A-B**).

Dos 19 indivíduos saudáveis incluídos nessas análises, 12 eram mulheres e 7 eram homens. Avaliamos separadamente as respostas para mitógenos (**Figura 28 A**) e infecção por DENV4 TVP/360 (**Figura 28 B**). Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 28 A** e **B** na forma de valores individuais (círculos) e mediana (linha).



Figura 28 – Avaliação da capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (IgG), entre as amostras doadas por homens ou mulheres, mediante cultura de PBMCs na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360. Comparação do número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs (enumeradas por ELISPOT) entre amostras doadas por homens (n=7) e mulheres (n=12). A) Após estímulo pelos mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM], *Streptococcus aureaus cowan* [SAC] e CpG ODN 2006) ou após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado o MOI:10 e o contato vírus-células foi mantido durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Dados apresentados como mediana (linha) e valores individuais (círculos), estatisticamente comparados pelo teste Mann-Whitney.

Como foi possível observar, seja tanto pela estimulação por mitógenos (Homens: mediana 1564 [percentil 25% / 75%: 315 / 4650]; Mulheres: mediana 2017,5 [percentil 25% / 75%: 841,5 / 14588]; p=0,5828; **Figura 28 A**) como pela infecção por DENV4 TVP/360 (Homens: mediana 495 [percentil 25% / 75%: 375 / 1495]; Mulheres: mediana 862,5 [percentil 25% / 75%: 393,8 / 1289]; p=0,8991; **Figura 28 B**), não foram observadas diferenças entre o número de ASCs gerados por amostras de homens e mulheres.

### 5.5.5 Avaliação da importância da integridade viral na indução da diferenciação das células B em ASCs neste modelo

Tendo em vista que vacinas que fazem uso de vírus inativados, como por exemplo as vacinas contra hepatite A, poliomielite e raiva, são capazes de induzir potentes respostas humorais (STAUFFER; EL-BACHA; DA POIAN, 2008), nos perguntamos se para a geração de ASCs vista em nosso modelo a integridade viral era necessária. Para responder tal pergunta, inativamos alíquotas do DENV4 TVP/360 através de radiação UV (i-DENV4 TVP/360) e infectamos PBMCs humanas com i-DENV4 TVP/360 ou com a forma ativa DENV4 TVP/366 no MOI:10. Após 7 dias de cultura, avaliamos a capacidade de aquisição do fenótipo (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>; **Figura 29 A**) e da função (produção de IgG; **Figura 29 B**) de ASCs.



Figura 29 – Avaliação da capacidade de aquisição do fenótipo (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) e da função (produção de IgG) de secretora de anticorpos mediante cultura de PBMCs humanas na presença de DENV4 TVP/360 ou DENV4 TVP/360 inativado. PBMCs humanas foram isoladas através de centrifugação em gradiente de histopaque e mantidas em cultura por 7 dias ou na presença do vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360; MOI:10), íntegra ou inativada por UV, durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Após 7 dias, essas células foram recuperadas, contadas e distribuídas em placas de ELISPOT previamente sensibilizadas com anticorpos anti-lgG total humana. A) porcentagem de células CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> por milhão de PBMCs. B) Número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de PBMCs. Dados apresentados como mediana (linha) e valores individuais (n=12; círculos), estatisticamente comparados de forma pareada por teste Wilcoxon matched-pairs signed ranks.

Ficou claro que, as células B presentes nas PBMCs consequem adquirir o fenótipo (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>; partículas íntegras: mediana 0,1390 [percentil 25% / 75%: 0.339/ 0.7410]; partículas inativadas: mediana 0.02685 [percentil 25% / 75%: 0,0/ 0,448]; p<0,0001; Figura 29 A) e a função (produção de IgG; partículas íntegras: mediana 712,5 [percentil 25% / 75%: 318,8/ 1290]; partículas inativadas: mediana 225 [percentil 25% / 75%: 123,8/ 750]; p<0,05; Figura 29 B) de ASCs apenas quando a partícula viral está íntegra.

B)

### 5.6. Avaliação da capacidade de geração de ASCs mediante estimulação de células B (CD19+) isoladas por mitógenos ou infecção por DENV

Está claro que as células B presentes entre as PBMCs são capazes de se diferenciarem em ASCs após infecção pelo DENV4 TVP/360 (MOI:10). Neste modelo, as células B foram capazes de adquirir tanto o fenótipo (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) quanto a função (produção de IgG) das ASCs. Mas será que células B isoladas também são capazes de se diferenciarem quando expostas ao DENV? Para responder à essa pergunta, isolamos células B (CD19+) a partir de PBMCs obtidos de indivíduos saudáveis (n=5) através de *beads* magnéticas. Essas células B isoladas foram mantidas durante 7 dias em cultura, após serem estimuladas por mitógenos (**Figura 30 A** e **B**) seguindo o mesmo protocolo descrito por Crotty et al. (2004) ou infectadas por DENV4 TVP/360 (**Figura 30 A** e **B**). Desta vez, utilizamos o MOI:1 partindo do racional que as células B compõem apenas 10% das PBMCs totais e, portanto, em uma infecção de PBMCs utilizando MOI:10, as células B estariam sendo expostas a apenas 10% destes vírus. Entretanto, também testamos o MOI:10 a fim de evitar futuros questionamentos (dados não mostrados).

A capacidade de diferenciação em ASCs foi novamente avaliada por ELISPOT (Figura 30).



Figura 30 – Avaliação da capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (produção de IgG) mediante cultura de células B isoladas (CD19+) na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360. Células B (CD19+) humanas isoladas através de beads magnéticas a partir de PBMCs obtidos de indivíduos saudáveis. Elas foram mantidas em cultura por 7 dias na presença dos mitógenos (Pokeweed mitogen [PWM], Streptococcus aureaus cowan [SAC] e CpG ODN 2006) ou após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado o MOI:10 e o contato vírus-células foi mantido durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Após 7 dias, essas células foram recuperadas, contadas e distribuídas em placas de ELISPOT previamente sensibilizadas com anticorpos anti-IgG total humana. A) Imagem representativa. B) Número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de células B (CD19+). Mock: grupo estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção. Dados apresentados como mediana (linha) e valores individuais (n=5; círculos), estatisticamente comparados pelo teste Kruskall-Wallis e pós teste Dunn's.

Como foi possível observar, diferentemente de quando presentes nas PBMCs, células B (CD19+) isoladas não foram capazes de se diferenciarem em ASCs na presença do DENV4 TVP/360 (Grupo Mock: mediana 550 [percentil 25% /75%: 309,5/ 1057]; Mitógenos: mediana 34560 [percentil 25% / 75%: 10478/ 56114]; DENV4 TVP/360: mediana 600 [percentil 25% / 75%: 160,5/ 2168]; p<0,05 Figura 30 A-B). Isto sugere que fatores secretados e/ou o contato célula-célula proveniente das

A)

B)

demais PBMCs, sejam fundamentais para a indução dessa diferenciação celular na presença do vírus.

# 5.7. Avaliação da importância do contato célula-célula e/ou fatores secretados na capacidade de geração de ASCs mediante infecção de PBMCs por DENV4 TVP/360

Tendo em vista que as células B sozinhas não conseguem se diferenciar em ASCs mediante infecção pelo vírus (Figura 30 A-B), mas quando presentes em meio às PBMCs elas conseguem (Figura 24 A-C e Figura 25 A-B), realizamos um experimento utilizando a técnica de transwell, para nos ajudar a compreender esse cenário. Fatores secretados e/ou o contato com outras células seriam os responsáveis pela diferenciação neste modelo? Essa técnica consistiu em cultivar em um mesmo poço células B (CD19+) isoladas por beads magnéticas e o restante das PBMCs (flow through do processo de isolamento das CD19+), sem que essas tenham contato direto uma com as outras. Para isso, a células B foram colocadas sobre uma membrana de 3 µm, suspensa por um suporte, de tal forma que apenas fatores secretados no meio de cultura puderam entrar em contato com essas células (vide desenho experimental no item 3 dessa tese). As demais células foram posicionadas no fundo do poço, sem nenhum contato direto com essa membrana suspensa. É importante dizer que, nesse caso, apenas as células do flow through foram infectadas, e que essa infecção com o DENV4 TVP/360 ocorreu da mesma maneira que os demais ensaios de PBMCs, utilizando o MOI:10 por 1 hora, seguida de remoção do inóculo e lavagem das células. Após 7 dias de cultura, essas células foram recuperadas individualmente (flow through e células B separadamente) e avaliadas fenotipicamente (Figura 31) e funcionalmente (Figura 32). Dessa forma, se as células B desse ensaio fossem capazes de adquirir o fenótipo de ASCs (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) e de produzir anticorpos, significaria que os fatores secretados pelas demais células seriam os principais mediadores da diferenciação celular induzida pelo vírus. Caso o contrário, isto indica que o contato célula-célula é o que estaria participando, de fato, da diferenciação das células B em ASCs.

Novamente, toda essa etapa foi conduzida no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR), sob orientação da Pesquisadora Pryscilla Wowk e auxílio do doutorando Allan Cataneo.

O primeiro parâmetro avaliado foi a capacidade de aquisição do fenótipo. Para isto, as células foram recuperadas, lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD20, CD38 e CD27 conjugados a fluorocromos. As leituras correspondentes às fluorescências foram adquiridas em um citômetro de fluxo e as análises realizadas através do software FlowJo (**Figura 31**).

A)



Figura 31 – Avaliação da importância do contato célula-célula e/ou fatores secretados na capacidade de aquisição do fenótipo de secretora de anticorpos (CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) mediante cultura de células B (CD19+) humanas em poços de placas de *transwell* na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360. Células B (CD19+) humanas foram isoladas por *beads* magnéticas a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis. Essas foram cultivadas em poços de *trasnwell*, separadas por uma membrana de 3µm, das demais células contidas nas PBMCs e mantidas em cultura por 7 dias na presença dos mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM],

Streptococcus aureaus cowan [SAC] e CpG ODN 2006) ou após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado o MOI:10 e o contato vírus-células foi mantido durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Após 7 dias, as células B (CD19+) foram recuperadas, lavadas e marcadas com anticorpos Anti-CD20, CD38 e CD27 conjugados a fluorocromos. As leituras correspondentes às fluorescências foram adquiridas em um citômetro de fluxo e as análises realizadas através do software *FlowJo*. A) Imagem representativa. B) Porcentagem de células CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>. C) Número absoluto de células CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> por milhão de células CD19+. Mock: grupo estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção. Dados apresentados como mediana (linha) e valores individuais (n=5; círculos), estatisticamente comparados de forma pareada por teste Friedman e pós teste Dunn's.

Foi possível observar que sem o contato célula-célula com o *flow through*, as células CD19+ não foram capazes de adquirir o fenótipo de secretoras de anticorpos, tanto em porcentagem (Grupo Mock: mediana 0,0 [percentil 25% /75%: 0,0/ 2,11]; Mitógenos: mediana 1,39 [percentil 25% / 75%: 0,0/ 5,57]; DENV4 TVP/360: mediana 8,82 [percentil 25% / 75%: 2,22/ 37,5]; p=0,124; **Figura 31 B**), quanto em número absoluto (Grupo Mock: mediana 0,0 [percentil 25% /75%: 0,0/ 58]; Mitógenos: mediana 22 [percentil 25% / 75%: 0,0/ 53,5]; DENV4 TVP/360: mediana 127 [percentil 25% / 75%: 34,5/ 871]; p=0,124; **Figura 31 C**).

Em seguida, avaliamos a capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (produção de IgG), utilizando as mesmas condições experimentais descritas anteriormente para análise do fenótipo. Porém, no sétimo dia, as células CD19+ foram recuperadas, contadas e distribuídas em placas de ELISPOT previamente sensibilizadas com anticorpos anti-IgG total humano (**Figura 32**).



Figura 32 – Avaliação da importância do contato célula-célula e/ou fatores secretados na capacidade de aquisição da função de secretora de anticorpos (produção de IgG) mediante cultura de células B (CD19+) humanas em poços de transwell na presença de mitógenos ou DENV4 TVP/360. Células B (CD19+) humanas foram isoladas por beads magnéticas a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis. Essas foram cultivadas em poços de trasnwell, separadas por uma membrana de 3µm das demais células contidas entre as PBMCs e mantidas em cultura por 7 dias ou na presença dos mitógenos (Pokeweed mitogen [PWM], Streptococcus aureaus cowan [SAC] e CpG ODN 2006) ou após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4. cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360). Foi utilizado o MOI:10 e o contato vírus-células foi mantido durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Após 7 dias, as células CD19+ foram recuperadas, contadas e distribuídas em placas de ELISPOT previamente sensibilizadas com anticorpos anti-IgG total humana. A) Imagem representativa. B) Número absoluto de ASCs produtoras de IgG por milhão de células B (CD19+). Mock: grupo estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção. Dados apresentados como mediana (linha) e valores individuais (n=6; círculos), estatisticamente comparados de forma pareada por teste Friedman e pós teste Dunn's.

Como foi possível observar, embora os fatores secretados pelo *flow through* infectado com DENV4 TVP/360 tenham sido capazes de induzir funcionalmente a

A)

B)

diferenciação de algumas das células B em secretoras de anticorpos (Grupo Mock: mediana 2500 [percentil 25% /75%: 1875/ 8250]; Mitógenos: mediana 425250 [percentil 25% / 75%: 166875/ 661500]; DENV4 TVP/360: mediana 17500 [percentil 25% / 75%: 2250/ 66375]; **Figura 32 A-B**), a magnitude da resposta funcional não foi a mesma da vista quando essas células estão em contato umas com as outras (**Figura 25 A-B**). A ausência de diferença significativa entre a enumeração de ASCs no grupo infectado com DENV com a do grupo Mock e no tratado com mitógenos, isto sugere exatamente um perfil intermediário do grupo DENV entre os controles (negativo e positivo respectivamente) (**Figura 25 A-B**).

Com isso, ao que parece, embora os fatores secretados pelas demais células possam auxiliar na indução da diferenciação das células B em ASCs, a questão funcional destas ASCs é, de fato, prejudicada.

#### 5.8. Análise dos metabólitos da via do triptofano

#### 5.8.1. Culturas de PBMCs estimuladas com mitógenos ou infectadas por DENV4 TVP/360

Diferentemente de outras células do sistema imune, muito pouco se conhece sobre as relações entre o metabolismo e como este suporta e até mesmo regula a maturação, ativação e diferenciação das células B (WATERS et al., 2018). Nesse aspecto, a enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), responsável pela metabolização do triptofano (TRP) pela via das quinureninas, já demonstrou possuir um importante papel em processos infecciosos, neoplasias e autoimunidades (Puccetti, 2007). Tendo em vista que pacientes com Dengue apresentam maior atividade de IDO, menores níveis de TRP e maiores níveis de quinurenina (KYN) no soro durante os dias febris da doença, decidimos investigar o metabolismo do triptofano em nosso modelo de diferenciação em ASCs in vitro. Para tal, realizamos a quantificação do triptofano e seus metabólitos nos sobrenadantes das culturas de PBMCs estimuladas com mitógenos ou infectadas por DENV4 TVP/360 (MOI:10) após 7 dias por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo LC-MS/MS (Figuras 34 e 35). Essa etapa foi realizada em parceria com o Laboratório de Bioquímica Clínica, da Professora Ana Campa (FCF/USP), e contou com o auxílio das alunas de doutorado Maryana Branquinho e Maysa Braga.

Um esquema representativo das vias de metabolismo do TRP foi incluído no **Anexo 6** desse documento. Ainda, as quantificações de serotonina, triptamina, ácido xanturênico e o ácido indolacético não apresentaram diferença entre os diferentes tratamentos (p>0,05) e por isso foram incluídas no **Anexo 7** desse documento.



C)





**Figura 33 – Análise quantitativa do triptofano e da quinurenina nos sobrenadantes de culturas estimuladas por mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360.** Os sobrenadantes de culturas de PBMCs estimuladas com mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360 (MOI:10) após 7 dias foram avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo LC-MS/MS. Dados apresentados na forma de valores individuais da área do pico (círculos; n=19) e mediana (linha) e estatisticamente comparados de forma pareada por teste Friedman e pós teste Dunn's. A linha pontilhada de cada gráfico representa a quantificação daquele metabólito em um meio de cultura mantido nas mesmas condições experimentais, exceto pela ausência de células (branco). A) Quantificação de TRP nos sobrenadantes das diferentes condições experimentais. B) Quantificação de KYN nos sobrenadantes das diferentes condições experimentais. C) Valores individuais de triptofano e quinurenina nos sobrenadantes das amostras infectadas pelo DENV4 TVP/360. KYN: L-quinurenina, TRP: triptofano; Mock: grupo

estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção.



**Figura 34 – Análise quantitativa dos metabólitos do triptofano nos sobrenadantes de culturas de PBMCs estimuladas por mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360.** O sobrenadante de culturas de PBMCs estimuladas com mitógenos ou infectadas por DENV4 TVP/360 (MOI:10) após 7 dias foi avaliado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo LC-MS/MS. Dados apresentados na forma de valores individuais da área do pico (círculos; n=19) e mediana (linha) e estatisticamente comparados de forma pareada por teste Friedman e pós teste Dunn's. A linha pontilhada de cada gráfico representa

a quantificação daquele metabólito em um meio de cultura mantido nas mesmas condições experimentais, entretanto, sem a presença de nenhuma célula (branco). A) Quantificação de ácido quinurênico nos sobrenadantes das diferentes condições experimentais. B) Quantificação de ácido quinolínico nos sobrenadantes das diferentes condições experimentais. C) Quantificação de ácido nicotínico nos sobrenadantes das diferentes condições experimentais. D) Quantificação de ácido antranílico nos sobrenadantes das diferentes condições experimentais. D) Quantificação de ácido antranílico nos sobrenadantes das diferentes condições experimentais. E) Quantificação de ácido 5-hidroxindolacético nos sobrenadantes das diferentes condições experimentais. NA: ácido nicotínico mononucleotídeo; QA: ácido quinolínico; KA: ácido quinurênico; HIAA: ácido 5-hidroxindolacético; AA: ácido antranílico. Mock: grupo estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção.

Foi possível observar que o consumo do TRP foi maior no grupo de amostras infectadas com o DENV4 TVP/360 em relação ao Mock (Mock: mediana -0,3329 [percentil 25% /75%: -0,6071/-0,04735]; DENV4 TVP/360: mediana -0,6824 [percentil 25% / 75%: -0,7875/-0,5199]; p<0,001) e ao estimulado com Mitógenos (mediana -0,4988 [percentil 25% / 75%: -0,5652/-0,2720]; p<0,01) (Figura 33 A). Este foi acompanhado de uma maior síntese de KYN nestes respectivos grupos (Mock: mediana 0,02364 [percentil 25% /75%: 0,01007/0,06931] vs DENV4 TVP/360: mediana 0,06856 [percentil 25% / 75%: 0,04524/0,1019]; p<0,01; vs Mitógenos: mediana 0,00756 [percentil 25% / 75%: 0,00284/0,01439]; p<0,001; Figura 33 B). Também foi possível observar que, quando avaiadas individualmente, nem sempre as amostras infectadas pelo DENV4 TVP/360 que mais consumiram TRP foram as que apresentaram maior acúmulo de KYN (Figura 33 C). Da mesma forma, nem sempre aquelas quie apresentaram menor consumo de TRP foram as que menos acumularam KYN, demonstrando uma não linearidade metabólica (Figura 33 C).

No que diz respeito aos demais metabólitos avaliados, foi possível observar que subjacente à formação de KYN, a formação de ácido quinurênico (KA, do inglês *kynurenic acid*) diferu apenas entre o grupo tratado com mitógenos e o infectado com DENV4 TVP/360, sendo maior neste último (Mock: mediana -0,00008 [percentil 25% /75%: -0,00138/0,00145] vs DENV4 TVP/360: mediana 0,00072 [percentil 25% / 75%: -0,00047/0,00296]; p>0,05; vs Mitógenos: mediana -0,00101 [percentil 25% / 75%: -0,0025/-0,00007]; p<0,0001; **Figura 34 A**). Outros metabólitos dessa mesma via como o ácido quinolínico (QA, do inglês *quinolinic ácid*; Mock: mediana 0,00451 [percentil 25% /75%: 0,00203/0,0101]; DENV4 TVP/360: mediana 0,0092 [percentil 25% / 75%: -0,00045/0,00041]; p<0,0001; **- Figura 34 B**), o ácido nicotínico (NA, do inglês *nicotinic acid;* Mock: mediana -0,00048];

DENV4 TVP/360: mediana 0,00007 [percentil 25% / 75%: -0,00068/0,00163]; p>0,0001; Mitógenos: mediana 0,01358 [percentil 25% / 75%: 0,00733/0,0247]; p<0,001; **Figura 34 C**) e ácido antranílico (AA, Mock: mediana 0,01938 [percentil 25% /75%: 0,00645/0,05303]; DENV4 TVP/360: mediana 0,0229 [percentil 25% / 75%: 0,01214/0,02953]; p>0,0001; Mitógenos: mediana 0,00066 [percentil 25% / 75%: 0,00039/0,00152]; p<0,0001; **Figura 34 D**) tiveram uma menor formação nas amostras tratadas com mitógenos em relação aos demais. Já para a via da serotonina, embora não tenhamos visto diferença na quantificação de serotonina propriamente dita (**Anexo 7**), o seu metabólito subsequente Ácido 5-hidroxindolacético (HIAA, do inglês *5-hydroxyindoleacetic acid;* Mock: mediana 0,00207 [percentil 25% / 75%: 0,00052/0,00376]; DENV4 TVP/360: mediana 0,00265 [percentil 25% / 75%: 0,00139/0,00326]; p>0,01; Mitógenos: mediana 0,00122 [percentil 25% / 75%: 550,00028/0,0020]; p<0,001; **Figura 34 E**) foi menos sintetizado que nos demais grupos.

Checamos então, se o consumo de TRP e a geração de KYN (**Figura 34 A** e **B**) vista nas amostras infectadas com DENV4 TVP/360 se correlacionavam com a diferenciação em ASCs vista nesse grupo (**Figura 35 A-B**).



Figura 35 – Correlação entre a quantificação de triptofano e quinurenina nos sobrenadantes e a enumeração de células secretoras produtoras de IgG em culturas de PBMCs infectadas por DENV4 TVP/360. A) Correlação entre as quantidicações de triptofano de triptofano no sobrenadante das culturas infectadas por DENV4 TVP/360 (Figura 34 A) e da enumeração de células secretoras de IgG vista nesse mesmo grupo (Figura 25). B) Correlação entre as quantidicações de triptofano de sculturas infectadas por DENV4 TVP/360 (Figura 34 A) e da enumeração de células secretoras de IgG vista nesse mesmo grupo (Figura 25). B) Correlação entre as quantidicações de triptofano de quinurenina no sobrenadante das culturas infectadas por DENV4 TVP/360 (Figura 34 B) e da enumeração de células secretoras de IgG vista nesse mesmo grupo (Figura 25). Dados estatisticamente comparados através do teste de correlação *Spearman*. KYN: L-quinurenina; ASCs: células secretoras de anticorpos
Foi possível observar que a quantificação de TRP apresentava uma correlação negativa com a enumeração de ASCs vista nas amostras infectadas com DENV4 TVP/360 (r=-0,3982; p<0,05; **Figura 35 A**) e a quantificação de KYN apresentava uma correlação positiva com a enumeração de ASCs vista nas amostras infectadas com DENV4 TVP/360 (r=0,5772; p<0,001; **Figura 35**). Esses resultados sugerem que, de alguma forma, o metabolismo do TRP, em particular através da via das KYN, se relaciona com a diferenciação das células B em ASCs induzida durante a infeção pelo DENV *in vitro*.

Com o intuito de se aprofundar o entendimento sobre o potencial papel do metabolismo do TRP na massiva diferenciação de ASCs vista em Dengue, decidimos fazer uma busca de informações a partir de dados públicos de transcriptoma de pacientes. Assim, selecionamos da literatura 26 genes descritos como indutores ou repressores da IDO, incluindo a própria enzima (**Figura 36**), bem como outros 9 genes associados de alguma forma a esta via metabólica, para a elaboração de *heatmaps* utilizando dados públicos de transcriptoma (**Figura 37**). Para esta análise selecionamos novamente o estudo: GSE51808, que contém o transcriptoma do RNA total extraído a partir do sangue de 9 indivíduos saudáveis, 18 com DF e 10 com DHF.

Essa etapa foi realizada em parceria com o laboratório do Professor Helder Nakaya (FCF-USP), mais especificamente pelo doutorando Diógenes Ribeiro de Lima. Os dados de entrada foram os valores de expressão de mRNA fornecidos para cada amostra pelo NCBI-GEO (GEO Ref: GSE51808), e identificados em cada um dos três grupos: controle, DF e DFH.



Figura 36 – Heatmap representativo da expressão de genes indutores ou repressores da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) no sangue total de pacientes sadios (controle), com Dengue moderada (DF) e com Dengue hemorrágica (DHF). Dados de expressão retirados do estudo NCBI-GEO Ref: GSE51808 utilizando genes selecionados da literatura. Análise realizada através da função *heatmap.*2 do pacote *gplots - Various R programming tools for plotting data*, em R. Tons de azul indicam amostras com genes menos expressos em relação aos demais daquela linha. Tons de vermelho indicam amostras com genes mais expressos, em relação aos demais daquela linha. O algoritmo agrupa verticalmente genes com valores de expressão similares entre os grupos, e horizontalmente, as amostras com perfis globais de expressão parecidas. Amostra de indivíduos controle apresentadas em rosa, amostras de pacientes com Dengue moderada (DF)

apresentadas em preto e amostras de pacientes com Dengue Hemorrágica (DHF) apresentadas em azul petróleo.



Figura 37 – Heatmap representativo da expressão de genes relacionados ao metabolismo do triptofano no sangue total de pacientes sadios (controle), com Dengue moderada (DF) e com Dengue hemorrágica (DHF). Dados de expressão retirados do estudo NCBI-GEO Ref: GSE51808 utilizando genes selecionados da literatura. Análise realizada através da função *heatmap.*2 do pacote *gplots - Various R programming tools for plotting data*, em R. Tons de azul indicam amostras com genes menos expressos em relação aos demais daquela linha. Tons de vermelho indicam amostras com genes mais expressos, em relação aos demais daquela linha. O algoritmo agrupa verticalmente genes com valores de expressão similares entre os grupos, e horizontalmente, as amostras com perfis globais de expressão parecidas. Amostra de indivíduos controle apresentadas em rosa, amostras de pacientes com Dengue moderada (DF) apresentadas em azul petróleo.

Curiosamente, o perfil de expressão dos genes indutores ou repressores da IDO agrupou as amostras de forma a segmentar os pacientes infectados em dois grupos separados pelos controles (**Figura 36** - topo). No grupo da esquerda, encontram-se majoritariamente amostras oriundas de pacientes com DF (**Figura 36** – quadrados escuros). Já no grupo da direita, encontram-se principalmente amostras oriundas dos pacientes com DHF (**Figura 36** – quadrados verde-acinzentado). Isso indica que essas moléculas apresentam um perfil distinto de expressão dependendo da gravidade da doença. Cabe ressaltar aqui, que embora essas moléculas possam

exercer efeitos indutores ou repressores sobre a IDO, elas apresentam diversos outros mecanismos fisiológicos. Entretanto, o próprio gene *IDO1* foi encontrado com expressão menor no grupo de amostras majoritariamente enriquecido pelos pacientes de DHF (**Figura 36**, sexta linha).

Já o perfil de expressão dos genes apresentados na **Figura 37**, agrupou as amostras de maneira diferente daquela vista na **Figura 36**. Na **Figura 37**, as amostras referentes ao controle foram agrupadas no canto direito do gráfico e as amostras referentes aos pacientes foram agrupadas quase que totalmente na esquerda do gráfico em relação aos controles (**Figura 37** - topo). Ainda, dentre as amostras dos pacientes, parece haver um agrupamento majoritário referente aos pacientes categorizados como DF, na região central do gráfico (**Figura 37** – quadrados escuros), e outro referente aos pacientes categorizados como DHF, na esquerda do gráfico (**Figura 37** – quadrados verde-acinzentado). Esse tipo de agrupamento indica que enquanto que as amostras de DHF e controle teriam perfis opostos de expressão para estes genes, as amostras de DF teriam um perfil intermediário entre essas duas últimas.

## 5.8.2. Culturas de PBMCs infectadas por um isolado clínico de DENV (DENV4 LRV13/422), ou por outros flavivírus (ZIKV-PE2343, ZIKV-MR766, YFV/17DD)

Tendo em vista que, até o momento, a massiva expansão de ASCs vista em nosso modelo foi obtida com a cepa laboratorial DENV4 TVP/360, decidimos incluir uma cepa de DENV oriunda de isolado clínico de mesmo sorotipo em nossas análises. Este isolado foi gentilmente cedido pela Professora Claudia Nunes Duarte dos Santos do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (Curitiba – PR). Além disso, este tipo de resposta celular não foi descrita ainda para nenhum outro flavivírus. Sendo assim, decidimos avaliar se o metabolismo do TRP difere durante infecções induzidas por outros vírus. Se positivo, verificaríamos se isso teria qualquer relação com a menor diferenciação de ASCs induzida por estes outros patógenos. Para isso, infectamos PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis, sob um MOI:10, com duas cepas do Vírus Zika (ZIKV), oriundas de isolados clínicos da África (ZIKV-MR766 descrito por Dick et al., 1952) e de Pernambuco/BR (ZIKV-PE243 descrito por Donald et al., 2016), ou do vírus atenuado da Febre Amarela utilizado para vacinações (YFV/17DD).

Avaliamos, então, a relação entre as concentrações de KYN no sobrenadante dessas culturas e a enumeração de ASCs secretoras de IgG (**Figura 38**).

A)



Figura 38 – Porcentagem de CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> e correlação entre a quantificação de quinurenina e a enumeração de células secretoras produtoras de IgG em culturas de PBMCs infectadas por diferentes flavivírus. PBMCs humanas foram isoladas através de centrifugação em gradiente de histopaque e mantidas em cultura por 7 dias nas seguintes condições I) Sobrenadante de culturas

de células de mosquito C6/36 não infectadas (Mock) n=19, II) DENV4 LRV13/422, MOI:10 n=9, III) ZIKV-MR766, MOI:10 n=12, IV) ZIKV-PE243, MOI:10 n=12 e V) YFV/17DD, MOI:10 n=6\*A;4\*E. Após 7 dias, essas células foram recuperadas, lavadas e marcadas com anticorpos Anti-CD20, CD38 e CD27 conjugados à fluorocromos. As leituras correspondentes às fluorescências foram adquiridas em um citômetro de fluxo e as análises realizadas através do software *FlowJo.* A) Quantificação da porcentagem de células com o fenótipo CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>. B-E) Correlação entre as quantificações de quinurenina no sobrenadante e a enumeração de ASCs por milhão de PBMCs obtida por ELISPOT, após infecção pelos diferentes flavivírus. A quantificação da quinurenina foi obtida do sobrenadante dessas culturas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadruplo LC-MS/MS. Dados apresentados na forma de valores individuais e mediana (linha) e estatisticamente comparados de forma pareada por teste Kruskal-Wallis e pós teste Dunn's e através do teste de correlação *Spearman.* KYN: L-quinurenina; ASCs: células secretoras de anticorpos.

Apenas nas amostras infectadas por DENV foi possível observar uma maior aquisição do fenótipo CD20<sup>neg</sup> CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> (Mock: mediana 0,0360% [percentil 25% / 75%: 0,0057/0,1340]; DENV4 LRV13/422: mediana 0,4400% [percentil 25% / 75%: 0,163/0,9670]; p<0,01; ZIKV-PE243: mediana 0,1320% [percentil 25% / 75%: 0,06073/0,8513]; p>0,05; ZIKV-MR766: mediana 0,1840% [percentil 25% / 75%: 0,06395/0,6803]; p>0,05; YFV/17DD: mediana 0,0581% [percentil 25% / 75%: 0,0324/0,1800]; p>0,05; Figura 38 A) em relação ao Mock. Além de corroborar com a literatura, esse resultado indica que mesmo um isolado clínico do DENV reproduz os achados vistos com a cepa DENV4 TVP/360. Ainda, somente nas amostras infectadas por DENV encontramos uma correlação entre a quantificação de KYN no sobrenadante e o número de células secretoras de IgG por milhão de PBMCs (DENV4 LRV13/422: r=0,7395, p<0,05; ZIKV-PE243: r=0,2321, p>0,05; ZIKV-MR766: r=0,1565, p>0,05; YFV/17DD: r=0,4000, p>0,05; Figura 38 B). Com isso, nossos achados sugerem a hipótese que fatores intrínsecos da infeção por DENV, que não são comuns à de outros flavivírus, estejam induzindo a diferenciação das células B em ASCs. E, entre estes, o metabolismo do triptofano parece ter um papel importante.

# 5.9. Análise da expressão gênica de moléculas envolvidas na diferenciação de células B em ASCs a partir de PBMCs tratadas com mitógenos ou com DENV4 TVP/360.

Considerando que a diferenciação das células B em ASCs acontece na mesma magnitude entre o tratamento de PBMCs com mitógenos e a infecção destas pelo DENV4 TVP/360 (**Figuras 25** e **26**), mas difere metabolicamente entre esses dois estímulos (**Figuras 34** e **35**), resolvemos avaliar, quais outras moléculas poderiam estar participando deste processo cada modelo por PCR quantitativa. Para isso, o RNA total das PBMCs cultivadas na presença de mitógenos ou infectadas com DENV4 TVP/360 (MOI:10) foi recuperado no dia 7 de cultura e transformado em DNA complementar (cDNA).

Antes de iniciar os experimentos de análise da expressão gênica com os nossos alvos de interesse, realizamos um ensaio para determinação do gene endógeno (*housekeeping* ou normalizador) mais estável. Esse ensaio consistiu em testar um painel de genes usualmente utilizados como normalizadores (*RPNL19*, *GAPDH*, *B2M* e *RNA18S*) disponíveis no laboratório do Professor Alexandre Bruni-Cardoso (Instituto de Química – USP), utilizando amostras representativas das condições experimentais do estudo. A avaliação do gene mais estável foi realizada através do programa *GeNorm* (https://genorm.cmgg.be/). Os valores médios de estabilidade de expressão (M) obtidos nesse ensaio estão representados na **Figura 39**. Quanto menor o valor de M, maior a estabilidade de expressão daquele gene nas condições experimentais estudadas.



#### Estabilidade média de expressão dos genes normalizadores

Figura 39 – Avaliação da estabilidade dos genes normalizadores (*housekeeping*) *RPL19, GAPDH, B2M* e *RNA18S*, por PCR quantitativa, em amostras de PBMCs tratadas com mitógenos ou infectadas por DENV4 TVP/360. Valores médios de estabilidade de expressão foram calculados através do software *GeNorm* (https://genorm.cmgg.be/), a partir dos Cts (*cycle threshold*) obtidos de amostras de DNA complementar representativas das seguintes condições experimentais por PCR quantitativa: I) PBMCs Mock: células mantidas em cultura por 7 dias após estímulo com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; II) PBMCs mantidas em cultura por 7 dias na presença dos mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM], *Streptococcus aureaus cowan* [SAC] e CpG ODN 2006). III) PBMCs mantidas em cultura por 7 dias após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360), MOI:10, durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células.

Dentre os quatro genes comumente utilizados como normalizadores, é possível observar que os dois mais estáveis nas condições experimentais testadas foram o *B2M* e o *RNA18S* (**Figura 39**). Decidimos então, utilizar o *RNA18S* como normalizador em nossos ensaios futuros de PCR quantitativa. Feito isso, demos sequência avaliando a expressão dos fatores de transcrição-chave na diferenciação das células B em ASCs (*PAX5*, *BLC6*, *IRF4* e *PRDM1*) (**Figura 40**).



Figura 40 – Expressão diferencial dos genes PAX5, BLC6, IRF4 e PRDM1 em culturas de PBMCs tratadas com mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360. Expressão diferencial (fold change;  $2^{-}\Delta\Delta$ Ct) calculada utilizando o grupo Mock como controle (linha pontilhada). Amostras de mRNA obtidas no dia 7 das culturas de PBMCs na presença de mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM], *Streptococcus aureaus cowan* [SAC] e CpG ODN 2006) ou infectadas com DENV4 TVP/360, (MOI:10). Em ambas quantificações realizadas por PCR quantitativa, foi utilizando o gene *RNA18S* como normalizador. Dados apresentados na forma de valores individuais de fold change (círculos) e mediana (linha) e estatisticamente comparados por teste *Kruskal-Wallis* e pós teste *Dunn's*.

Embora tanto o tratamento com mitógenos quanto a infeção pelo DENV tenham sido capazes de induzir o fenótipo e a função de ASCs (**Figuras 25** e **26** respectivamente), a expressão dos genes relativos aos fatores de transcrição-chave na diferenciação das células B em ASCs (*PAX5*, *BLC6*, *IRF4* e *PRDM1*) não acompanharam esse fenômeno (**Figura 40**). Era esperada uma redução nas expressões de *BLC6* e *PAX5* acompanhada de um aumento nas expressões de *IRF4* e *PRDM1* em ambos os grupos. No entanto, apenas as amostras referentes ao

- -

93

tratamento com mitógenos apresentaram esse perfil, demonstrando aumento de *IRF4* (Mitógenos: mediana = 3,615 [percentil 25% / 75%: 2,178/6,440]; DENV4 TVP/360: mediana = 0,5722 [percentil 25% / 75%: 0,2835/1,812]; p<0,001; **Figura 40 C**)., *PRDM1* (Mitógenos: mediana = 2,836 [percentil 25% / 75%: 0,3621/4,894]; DENV4 TVP/360: mediana = 0,3875 [percentil 25% / 75%: 0,1512/0,9162]; p<0,01; **Figura 40 D**) e redução de *PAX5* (Mitógenos: mediana = 0,5913 [percentil 25% / 75%: 0,1950/1,100]; DENV4 TVP/360: mediana = 1,372 [percentil 25% / 75%: 0,3343/4,149]; p= 0,2201; **Figura 40 B**). O gene *BCL6*, entretanto, não apresentou redução em nenhum dos grupos (Mitógenos: mediana = 2,816 [percentil 25% / 75%: 0,4584/5,907]; DENV4 TVP/360: mediana = 3,739 [percentil 25% / 75%: 0,00193/10,27]; p= 0,7871; **Figura 40 A**).

Tendo em vista o alto consumo de TRP acompanhado da alta geração de KYN vista nas amostras infectadas por DENV (**Figura 33 A-B**), avaliamos também a expressão da enzima IDO, codificada pelos genes *IDO1* e *IDO2*, nas PBMCs tratadas com mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360 (**Figura 42**).

A)

B)



Figura 41 – Expressão diferencial dos genes *IDO1 e IDO2* em culturas de PBMCs tratadas com mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360. Expressão diferencial (*fold change;*  $2^{-}\Delta\Delta$ Ct) calculada utilizando o grupo Mock como controle (linha pontilhada). Amostras de mRNA obtidas no dia 7 de culturas de PBMCs na presença dos mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM], *Streptococcus aureaus cowan* [SAC] e CpG ODN 2006) ou infectadas com DENV4 TVP/360, (MOI:10). Elas foram avaliadas por PCR quantitativa, utilizando o *RNA18S* como gene normalizador. Dados apresentados na forma de valores individuais de *fold change* (círculos) e mediana (linha) e estatisticamente comparados por teste *Kruskal-Wallis* e pós teste *Dunn's*.

A expressão de *IDO1* (Mitógenos: mediana = 0,06480 [percentil 25% / 75%: 0,01947/0,3394]; DENV4 TVP/360: mediana = 2535000 [percentil 25% / 75%: 308624/2535000]; p<0,001; **Figura 41 A**) e *IDO2* (Mitógenos: mediana = 0,1048 [percentil 25% / 75%: 0,06307/0,1792]; DENV4 TVP/360: mediana = 1,010 [percentil 25% / 75%: 0,3462/5,944]; p<0,05; **Figura 41 B**) encontra-se aumentada nas amostras infectadas com DENV em relação grupo Mock e às tratadas com mitógenos (**Figura 42**), resultado coerente com o perfil de consumo do TRP e geração de KYN dessas amostras (**Figura 33 A-B**).

Nossos ensaios utilizando placas de cultura com poços *transwell* demonstraram que fatores secretados pelas demais células presentes nas PBMCs são capazes de induzir e colaborar com a diferenciação destas em ASCs (**Figura 32**). Ainda, Kwissa et al. (2014) sugere em seu estudo que os fatores BAFF e IL-10 (codificados pelos genes *TNFSF13B* e *IL10* respectivamente) seriam os principais mediadores dessa diferenciação em Dengue. Por tal razão, decidimos investigar a expressão gênica dessas duas moléculas em nosso modelo (**Figura 42**).



**Figura 42 – Expressão diferencial dos genes** *TNFSF13B e IL10* em culturas de PBMCs tratadas com mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360. Expressão diferencial (*fold change;* 2^-ΔΔCt) calculada utilizando o grupo Mock como controle (linha pontilhada). Amostras de mRNA obtidas no sétimo dia de culturas de PBMCs na presença dos mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM], *Streptococcus aureaus cowan* [SAC] e CpG ODN 2006) ou infectadas com DENV4 TVP/360. (MOI:10). Elas foram avaliadas por PCR quantitativa, utilizando o *RNA18S* como gene normalizador. Dados apresentados na forma de valores individuais de *fold change* (círculos) e

mediana (linha) e estatisticamente comparados por teste *Kruskal-Wallis* e pós teste *Dunn's*.

Foi possível observar que tanto a expressão de *TNFSF13B* (Mitógenos: mediana = 0,3694 [percentil 25% / 75%: 0,03163/0,7378]; DENV4 TVP/360: mediana = 3,595 [percentil 25% / 75%: 14,19]; p<0,001; **Figura 42 A**) quanto de *IL10* (Mitógenos: mediana = 0,5837 [percentil 25% / 75%: 0,05461/1,915]; DENV4 TVP/360: mediana = 4,911 [percentil 25% / 75%: 1,004/14,88]; p<0,001; **Figura 42 B**). estavam aumentadas nas amostras infectadas pelo DENV4 TVP/360. Isto corrobora com a hipótese que a secreção dessas moléculas poderia favorecer a diferenciação das células B em ASCs também em nosso modelo.

Por fim, tendo em vista que a molécula Syk apareceu entre as 10 mais frequentes das 2726 palavras encontradas em nossas análises de mineração de dados (**Tabela 5**), e que essa era necessária tanto para respostas humorais, dependentes ou não de células T (ACKERMANN et al., 2015), decidimos avaliar sua expressão gênica em nosso modelo (**Figura 43**).



**Figura 43 – Expressão diferencial do gene SYK em culturas de PBMCs tratadas com mitógenos ou infectadas pelo DENV4 TVP/360.** Expressão diferencial (*fold change;* 2^-ΔΔCt) calculada utilizando o grupo Mock como controle (linha pontilhada). Amostras de mRNA obtidas no sétimo dia 7 de culturas de PBMCs na presença dos mitógenos (*Pokeweed mitogen* [PWM], *Streptococcus aureaus cowan* [SAC] e CpG ODN 2006) ou infectadas com DENV4 TVP/360, (MOI:10). Elas foram avaliadas por PCR quantitativa, utilizando o *RNA18S* como gene normalizador. Dados apresentados na forma de valores individuais de *fold change* (círculos) e mediana (linha) e estatisticamente comparados por teste *Kruskal-Wallis* e pós teste *Dunn's*.

Desta forma foi possível observa que a expressão diferencial de *SYK* foi maior nas amostras infectadas por DENV4 TVP/360 do que naquelas tratadas com mitógenos (Mitógenos: mediana = 0,7205 [percentil 25% / 75%: 0,1328/1,273]; DENV4 TVP/360: mediana = 2,123 [percentil 25% / 75%: 0,7865/6,284]; p<0,01; **Figura 43**). Esse resultado sugere que, embora em ambos tratamentos as células B tenham se diferenciado em ASCs na mesma magnitude, moléculas importantes da sinalização intracelular como Syk, possam estar atuando diferentemente em cada processo.

### 5.10. Análise da expressão gênica de moléculas importantes na diferenciação em ASCs em células CD19+ isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV

Decidimos, então, avaliar a expressão gênica de moléculas importantes na diferenciação das células B em ASCs *in vivo*, apartir de células B (CD19+) isoladas de PBMCs de pacientes por citometria de fluxo. Para isto, devido a dificuldade em conseguirmos amostras de sangue fresco, utilizamos um total de cinco amostras criopreservadas de PBMCs de pacientes com Dengue, doadas pelo Professor José Luiz Proença Módena do Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes – Departamento de Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da UNICAMP (Campinas – SP). Como controle utilizamos quatro amostras de PBMCs de indivíduos saudáveis que também foram submetidas ao congelamento.

Primeiramente, avaliamos a expressão de fatores de transcrição chave para a diferenciação em ASCs: *PRDM1*, *IRF4*, *PAX5* e *BCL6* (**Figura 44**).



**Figura 44 – Expressão normalizada dos genes** *PRDM1, IRF4, PAX5* e *BLC6* em células B (CD19+) isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis. Expressão normalizada (2^-ΔCt) calculada utilizando como gene normalizador o *RNA18S*. Amostras de mRNA obtidas de células B (CD19+) isoladas por citometria de fluxo a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis, foram avaliadas por PCR quantitativa. Dados apresentados na forma de valores individuais de expressão normalizada (círculos) e mediana (linha) e estatisticamente comparados por teste *Mann Whitney*.

Como foi possível observar, a expressão de *PRDM1*, *IRF4* e *BCL6* não foi detectada nas amostras de células B (CD19+) dos pacientes com Dengue (**Figura 44 A**,**B** e **D**). Já a expressão do *PAX5*, embora tenha sido detectada, não apresentou diferenças significativas entre as amostras de células B (CD19+) dos pacientes com Dengue e as de indivíduos controle (CD19+ Dengue: mediana = 0,0001025 [percentil 25% / 75%: 0,00003/0,00031]; CD19+ controle: mediana = 0,0000629 [percentil 25% / 75%: 0,00001/0,01402]; p=0,9048; **Figura 44 C**).

Decidimos, então, avaliar o perfil gênico de moléculas cuja expressão ocorreia anteriormente ao processo de diferenciação das células B em ASCs, como os indutores *SYK* e *STAT3* e os repressores *NFATC1* e *FOSL1* (**Figura 45**).



Figura 45 – Expressão normalizada dos genes NFATC1, STAT3, FOSL1 e SYK em células B (CD19+) isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis. Expressão normalizada (2^-ΔCt) calculada utilizando como gene normalizador o *RNA18S*. Amostras de mRNA obtidas de células B (CD19+) isoladas por citometria de fluxo a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis, foram avaliadas por PCR quantitativa. Dados apresentados na forma de valores individuais de expressão normalizada (círculos) e mediana (linha) e estatisticamente comparados por teste *Mann Whitney*.

Como foi possível observar, não encontramos diferenças entre a expressão de *NFATC1* (CD19+ Dengue: mediana = 0,000057 [percentil 25% / 75%: 0,0/0,00062]; CD19+ controle: mediana = 0,0001032 [percentil 25% / 75%: 0,00007/0,0002963]; p=0,5386; **Figura 45 A**), *FOSL1* (CD19+ Dengue: mediana = 0,0002841 [percentil 25% / 75%: 0,0001286/0,0009752]; CD19+ controle: mediana = 0,0001371 [percentil

25% / 75%: 0,00006/0,02787]; p=0,7302; **Figura 45 C**) e *SYK* (CD19+ Dengue: mediana = 0,00 [percentil 25% / 75%: 0,00/0,00008]; CD19+ controle: mediana = 0,00007 [percentil 25% / 75%: 0,00003/0,000036]; p=0,1054; **Figura 45 D**) entre as amostras de de células B (CD19+) dos pacientes com Dengue e as de indivíduos controle. E, contrariamente ao esperado, encontramos uma menor expressão de *STAT3* nas amostras de células B (CD19+) dos pacientes com Dengue em relação as de indivíduos controle (CD19+ Dengue: mediana = 0,00098 [percentil 25% / 75%: 0,0/0,00016]; CD19+ controle: mediana = 0,0008475 [percentil 25% / 75%: 0,0005140/0,01658]; p<0,05; **Figura 45 B**).

Em seguida, decidimos avaliar a expressãode *IDO1* e *IDO2* tanto nas células B (CD19+), quanto nas demais células presentes nas PBMCs (CD19-) de pacientes com Dengue e de indivíduos saudáveis (**Figura 46**).



**Figura 46 – Expressão normalizada dos genes IDO1 e IDO2 em células B (CD19+) e em células CD19 negativas isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis.** Expressão normalizada (2^-ΔCt) calculada utilizando como gene normalizador o *RNA18S*. Amostras de mRNA obtidas de células B (CD19+) e de células CD19 negativas isoladas por citometria de fluxo a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis, foram avaliadas por PCR quantitativa. Dados apresentados na forma de valores individuais de expressão normalizada (círculos) e mediana (linha) e estatisticamente comparados por teste *Mann Whitney*.

Como foi possível observar, enquanto que a expressão de *IDO1* não apresentou diferenças entre as células B (CD19+) dos pacientes com Dengue e as de indivíduos controle (CD19+ Dengue: mediana = 0,0005452 [percentil 25% / 75%: 0,0001078/0,0009106]; CD19+ controle: mediana = 0,000043 [percentil 25% / 75%: 0,000019/0,01173; p=0,555; **Figura 46 A**), esse mesmo gene foi mais expresso nas amostras das demais células presentes nas PBMCs (CD19-) de pacientes com Dengue em relação aos indivíduos saudáveis (CD19- Dengue: mediana = 0,0001599 [percentil 25% / 75%: 0,0001307/0,001410]; CD19- controle: mediana = 0,000060 [percentil 25% / 75%: 0,00011/0,0001054]; p<0,05; **Figura 46 A**). Entretanto, não encontramos diferença entre a expressão das células B (CD19+) e as demais células presentes nas PBMCs (CD19-) de pacientes células presentes nas PBMCs (CD19+) e as demais células presentes nas PBMCs (CD19-) dos pacientes com Dengue (p=0,812; **Figura 46 A**).

Já para *IDO2* não observamos diferença nem na expressão entre as células B (CD19+) dos pacientes com Dengue e as de indivíduos controle (CD19+ Dengue: mediana = 0,0001860 [percentil 25% / 75%: 0,0/0,00016]; CD19+ controle: mediana = 0,0008475 [percentil 25% / 75%: 0,00008/0,0003674]; p=0,27857; **Figura 46 B**), nem na expressão das demais células presentes nas PBMCs (CD19-) de pacientes com Dengue em relação aos indivíduos saudáveis (CD19- Dengue: mediana = 0,00 [percentil 25% / 75%: 0,0/0,0008]; CD19- controle: mediana = 0,0002 [percentil 25% / 75%: 0,00008/0,0005p=0,3832; **Figura 46 B**). Entretanto, a expressão das células B (CD19+) foi maior do que nas demais células presentes nas PBMCs (CD19-) de pacientes com Dengue (p<0,05; **Figura 46 B**).

Por fim, decidimos avaliar o perfil de expressão de *IL10* e de *TNFSF13B*, que codifica a molécula BAFF, nas demais células presentes nas PBMCs (CD19-) de pacientes com Dengue e de indivíduos saudáveis (**Figura 47**).



**Figura 47 – Expressão normalizada dos genes** *TNFSF13B* e *IL10* em células CD19 negativas isoladas a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis. Expressão normalizada (2^-ΔCt) calculada utilizando como gene normalizador o *RNA18S*. Amostras de mRNA obtidas de células CD19 negativas isoladas por citometria de fluxo a partir de PBMCs de pacientes infectados por DENV ou de indivíduos saudáveis, foram avaliadas por PCR quantitativa. Dados apresentados na forma de valores individuais de expressão normalizada (círculos) e mediana (linha) e estatisticamente comparados por teste *Mann Whitney*.

Como foi possível observar não encontramos diferença na expressão de *TNFSF13B* (CD19- Dengue: mediana = 0,000019 [percentil 25% / 75%: 0,0/0,0002236]; CD19- controle: mediana = 0,00002 [percentil 25% / 75%: 0,00001/0,00002; p=0,9021; **Figura 47 A**), nem na expressão de *IL10* (CD19- Dengue: mediana = 0,0001723 [percentil 25% / 75%: 0,00005/0,00075]; CD19- controle: mediana = 0,00003 [percentil 25% / 75%: 0,00001/0,00005; p=0,1905; **Figura 47 B**) entre as amostras das demais células presentes nas PBMCs (CD19-) de pacientes com Dengue e de indivíduos saudáveis.

#### 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nesse trabalho buscamos compreender quais vias de sinalização e/ou quais moléculas-chave estariam colaborando para a massiva diferenciação de células B em ASCs vista durante a infecção pelo DENV (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012). Para isso, foi primeiramente necessário determinar quais moléculas e vias seriam investigadas por nós no contexto dessa infecção. Tendo em vista que existe uma extensa literatura descrevendo moléculas participantes do processo de diferenciação das células B em ASCs, fizemos uso de um recurso mineração de dados textuais relacionados à inteligência virtual (plataforma *Watson for Drug Discovery* da IBM), para nos auxiliar nessa seleção. Um total de 2726 palavras referentes a genes, drogas e doenças foram encontradas através de buscas utilizando as seguintes combinações: "Dengue + *b cell* + IRF4" (**Tabela 4**). Destas, listamos as mais frequentes: Akt1, NF-kB, IFNg, IFN-b1, TP53, IL-4, IghM, STAT3, TGF-b1, IL-2 e IL-6 (**Tabela 4** e **Figura 11**).

A enzima Akt1 (do inglês V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1 – também conhecida como Proteína Quinase B ou PKB) faz parte de uma família de serina/treonina quinases (Akt1-3), expressas em células B, com funções parcialmente redundantes (CALAMITO et al., 2010). Elas são conhecidas por aumentar o metabolismo celular e regular positivamente a sobrevivência e a proliferação da célula, ativando diversas vias bioquímicas (MANNING; CANTLEY, 2007). A ativação de Akt1 requer a PI3K, uma quinase lipídica heterodimérica recrutada para a membrana plasmática após a ligação de uma variedade de receptores de superfície como os coreceptores de BCR: CD19, CD81 ou CD21 (OTERO; OMORI; RICKERT, 2001). Diversos vírus já demonstraram modular a via de sinalização PI3K/Akt (DAWSON et al., 2002; HE et al., 2002; NAIR; SOMASUNDARAM; KRISHNA, 2003; SHIH et al., 2000; TALMAGE et al., 1989). Em particular, aqueles associados à oncogênese, como os vírus polioma (TALMAGE et al., 1989), Epstein-Barr (DAWSON et al., 2002), papilomavírus humano (NAIR; SOMASUNDARAM; KRISHNA, 2003), hepatite B (SHIH et al., 2000) e hepatite C (HE et al., 2002). Nesses, a modulação da via PI3K/Akt demonstrou estimular a sobrevivência celular de modo a bloquear a apoptose de células infectadas. Isto acarreta na sobrevivência viral e transformação oncogênica da célula infectada. Ainda, a ativação de PI3K/Akt também parece participar da

104

replicação do vírus e montagem do vírion (ESFANDIAREI et al., 2004). Células HeLa infectadas por Vírus de Coxsackie B3 e tratadas com um inibidor da via PI3K apresentaram menores expressões do RNA viral, acompanhadas de menores detecções de capsídeos virais, em relação as células controle (ESFANDIAREI et al., 2004). Da mesma forma, infecções pelos flavivírus DENV e vírus da encefalite japonesa (JEV, do inglês Japanese Encephalitis Virus) também demonstraram modular esta via, ativando Akt de maneira PI3K dependente (LEE; LIAO; LIN, 2005). O bloqueio de PI3K nas células infectadas por JEV e DENV através de inibidores específicos, tais como LY294002 e wortmanina, resultou em maior apoptose numa fase inicial da infecção (LEE; LIAO; LIN, 2005). Isto sugere que esses flavivírus modulam essa via a fim de assegurar maior sobrevida das células infectadas. Ainda, a proteína NS4A do DENV demonstrou ser a responsável pela proteção contra a morte celular, induzindo autofagia de maneira dependente de PI3K (MCLEAN et al., 2011). Interessantemente, o processo de autofagia parece impulsionar a diferenciação de células B em plasmablastos, bem como a produção de IgM antígeno-específica após imunização (ARNOLD et al., 2016). Mais recentemente foi demonstrado que o inibidor da sinalização PI3K/Akt, o AR-12, reduza replicação viral e a mortalidade de camundongos infectados por DENV, suportando a ideia de que essa via também estaria participando da replicação viral em Dengue (CHEN et al., 2017).

Embora esses achados indiquem que essa via estaria altamente ativada durante a infecção, nossas análises de dados públicos de transcriptoma apontaram que a expressão de PI3K e AKT em pacientes com DF encontrava-se não alterada e diminuída respectivamente em relação aos controles (**Figura 16**). Contrariamente aos nossos achados, um estudo avaliando o microRNA-491-5p, responsável por inibir a sinalização de PI3K/Akt, estava negativamente regulado após infecção por DENV, sugerindo uma maior ativação desta via. Ainda, análises agrupando 12 microRNAs diferentes, indicaram que de um total de 73 vias significativamente alteradas, a PI3K/Akt era a via mais afetada (TAMBYAH et al., 2015). Dessa forma, é plausível que a suposta não ativação desta via em nossas análises (**Figura 16**) deveu-se ou I) ao momento em que o RNA foi extraído desses pacientes neste estudo, ou II) ao fato de que, por se tratar de uma análise em sangue total, a expressão dessas moléculas nos linfócitos B poderia estar "mascarada" pela expressão das mesmas em outras células.

Estudos demonstraram que a Akt regula a atividade transcricional do fator nuclear-kB (NF-kB, do inglês Nuclear Factor kappa B), induzindo a fosforilação e a subsequente degradação do seu inibidor IkB (KANE et al., 1999; ROMASHKOVA; MAKAROV, 1999). Além disso, a atividade de NF-kB é importante para a transformação oncogênica induzida por PI3K/Akt (BAI; UENO; VOGT, 2009). Interessantemente, além da Akt, o NF-kB também estava presente entre as palavras mais frequentes em nossas buscas por mineração de dados textuais (Tabela 4 e Figura 11). O NF-kB é um importante fator transcricional de mais de 100 genes, a maioria dos guais, envolvidos na resposta imunológica (HOFFMANN; BALTIMORE, 2006). Esses incluem uma série de citocinas e quimiocinas, receptores necessários para o reconhecimento imunológico, proteínas envolvidas na apresentação de antígenos e receptores de adesão envolvidos na transmigração através das paredes dos vasos sanguíneos (HOFFMANN; BALTIMORE, 2006). Na verdade, o NF-kB, consiste de uma dúzia de dímeros compostos por três proteínas contendo o domínio de ativação (cRel, RelA e RelB) e dois parceiros de dimerização (p50 e p52) (HOFFMANN; BALTIMORE, 2006). Em células B, os dímeros de NF-kB formados pelas subunidades RelA+p50 e cRel+p50 são induzidos após a ativação (KAILEH; SEN, 2012). Nestas, a atividade do dímero cRel+p50 é necessária para a sobrevivência das células, o crescimento, e divisão após a ativação celular (POHL et al., 2002; SHOKHIREV et al., 2015). Já o dímero RelA+p50 é necessário para a geração de ASCs, através da ativação de Blimp1 (HEISE et al., 2014). Uma vez expresso, Blimp1 passa a reprimir a expressão de cRel, através da remodelação epigenética de seu promotor (ROY et al., 2019). Assim, tanto o dímero formado por cRel quanto o formado por RelA são indispensáveis para a imunidade humoral, mas por diferentes razões funcionais. Ainda, a atividade desregulada de NF-kB (em particular aos dímeros compostos pela subunidade RelA ou RelB) tem sido diretamente implicada na patogênese do mieloma múltiplo, um tipo de neoplasia onde há a frequência aumentada de ASCs tanto na medula quanto no sangue (ROY; SARKAR; BASAK, 2018). Não surpreendentemente, a ativação persistente da via do NF-kB mantida por certos vírus contribui para a transformação oncogênica, como no caso do vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 e o vírus Epstein-Barr.(HISCOTT; KWON; GÉNIN, 2001). A ativação do NF-kB durante a infecção pelo DENV tem sido relatada desde a década de 1990 (AVIRUTNAN et al., 1998; MARIANNEAU et al., 1997). Mais recentemente, foi esclarecido que a ativação de NF-

kB ocorre por meio da interação do complexo da protease DENV NS2B-NS3 com o seu inibidor (IkB) e, leva a apoptose de células do endotélio vascular e ao desenvolvimento de hemorragia (LIN et al., 2014). Contrariamente a esses achados, em nossas análises de dados públicos de transcriptoma, a expressão de NF-kB (incluindo as subunidades p50, ReIA e cReI) em pacientes com DF encontra-se intacta em relação aos controles (Figura 16). Outro estudo utilizando células dendríticas murinas infectadas por DENV-2 in vitro relatou que este sorotipo induziu baixos níveis de ativação de IFN-B, além de bloquear a ativação de ERK e NF-kB mediada por TLRs (CHANG et al., 2012). Embora entre os dados públicos de transcriptoma que utilizamos existam amostras oriundas de pacientes com DENV2 (29%), a maioria delas é proveniente de pacientes infectados com o sorotipo 1 (43%) (KWISSA et al., 2014), descartando a hipótese de que poderia ser essa a razão de uma menor expressão de NF-kB nesse grupo avaliado. Novamente, é possível que o momento em que o RNA foi extraído desses pacientes neste estudo esteja retratando um momento da infecção onde esse gene não esteja mais ativo ou ainda não tenha sido ativado.

Outras duas palavras presentes entre as mais frequentes em nossas buscas por mineração de dados textuais foram os IFN-g e IFN-b1 (Tabela 4 e Figura 11). Interferons (IFNs) são uma família de citocinas envolvidas na defesa contra infecções virais que desempenham um papel fundamental na ativação do sistema imune inato e adaptativo (FENSTERL; CHATTOPADHYAY; SEN, 2015). Os IFNs são classificados de acordo com os receptores de superfície celular aos quais eles se ligam. Os IFNs do tipo I (IFN-a e IFN-b ou IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) sinalizam através do receptor dimérico IFNAR. Já os IFNs do tipo 2 (IFN-g ou IFN-y) ligam-se ao receptor tetramérico IFNGR (FENSTERL; CHATTOPADHYAY; SEN, 2015). Além disso, embora as respostas biológicas a esses dois tipos de IFN se sobreponha em alguns aspectos, tais como sua capacidade de inibir a replicação do vírus em células infectadas, outros efeitos da sinalização de IFN tipo I e II são distintos. Em primeiro lugar, porque nem todos os IFNs e todos os receptores são produzidos por todas as células (DE WEERD; NGUYEN, 2012). Enquanto que os IFNs do tipo I são produzidos por um amplo espectro de células, IFNs do tipo 2 são produzidos em sua maioria apenas por linfócitos natural killers, T e B e células apresentadoras de antígenos (DE WEERD; NGUYEN, 2012). Em segundo lugar, diferentes tipos de IFNs induzem distintas vias de sinalização e complexos de fatores de transcrição, levando à ativação de diferentes genes. Enguanto IFNs do tipo I estão associados com a ativação de JAK1, Tyk2, STAT 1-5, MAPK, PI3K, Akt, NF-kB, p53 e PRMT1, IFNs do tipo II estão associados com a ativação de JAK1, JAK2 STAT 1-3 e 5, MAPK, PI3K, Akt e NF-kB (DE WEERD; NGUYEN, 2012). Interessantemente, altas concentrações de IFN-γ já foram descritas no soro de pessoas infectadas pelo DENV (RESTREPO et al., 2008). Contudo, o DENV desenvolveu várias maneiras de subverter as respostas antivirais intracelulares e inibir diretamente as cascatas de sinalização celular mediadas por IFNs do tipo I. A proteína DENV NS2B/3 interfere na indução de IFN-α e β clivando as proteínas STING e MITA. O complexo NS2A, NS4A e NS4B bloqueia a fosforilação STAT1, enquanto a NS5 se liga ao STAT2 e promove a sua degradação, juntas evitando assim, a formação do heterodímero STAT1/STAT2 e a indução transcricional de genes estimulados por IFNs (GREEN et al., 2014). No que diz respeito às células B, os IFNs do tipo I já demonstraram influenciar uma variedade de mecanismos celulares, incluindo efeitos na expressão de receptores Toll-like, na migração celular, na apresentação de antígeno, na produção e responsividade a citocinas, na sobrevivência, na diferenciação e na troca de classe de imunoglobulina (BON et al., 2006; BRAUN; CARAMALHO; DEMENGEOT, 2002; CORO; CHANG; BAUMGARTH, 2006; HEER et al., 2007; KIEFER et al., 2012). Já os IFNs do tipo II, são capazes de induzir a expressão de Blimp1 nas células B (STONE et al., 2019). Entretanto, estes mesmos IFNs do tipo II também iniciam um programa de genes inflamatórios que, se não contidos, impedem a formação de ASCs (STONE et al., 2019). Nesses casos, a indução do fator de transcrição T-bet nas células B é um importante modulador negativo da resposta de IFNs do tipo II, sendo crítica para a diferenciação das células B em ASCs durante infecções virais (STONE et al., 2019). Sendo assim, não foi surpresa que as palavras IFN-g e IFN-b1 tenham sido encontradas entre as mais frequentes em nossas buscas de mineração de dados (Tabela 4 e Figura 11). Estranhamente, quando avaliamos através de dados públicos de transcriptoma a expressão tanto de IFN-β quanto de IFN-γ em pacientes com DF, ambas encontravam-se inalteradas em relação aos controles (Figura 16). Mais uma vez, embora a coleta das amostras nesses pacientes tenha sido realizada durante a fase aguda da doença, é possível que naquele momento, a expressão destes genes já não mais tivesse sendo induzida ou ainda não tivesse sido iniciada.

Um achado curioso do nosso levantamento por mineração de dados foi a presença de TLR4 em todas as buscas contendo a palavra-chave "Dengue" (**Tabela** 

4 e Figura 11). Esse receptor, membro da família de receptores do tipo Toll é, geralmente, associado ao reconhecimento de padrões presentes em estruturas bacterianas e não virais, como é o caso do lipopolissacarídeo (LPS) (MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011). Recentemente, entretanto, foi descrito que a proteína NS1 do DENV é capaz de ativar diretamente receptores do tipo TLR4 (MODHIRAN et al., 2015, 2017). Essa proteína, além de possuir a habilidade circular no sangue de pacientes infectados por DENV, podendo ativar células em tecidos distantes da que foi secretada, tem a sua expressão positivamente correlacionada com a gravidade da doença (ALLONSO et al., 2014), assim como a frequência de plasmablastos (GARCIA-BATES et al., 2013). Embora em modelos murinos o engajamento dos TLR4 seja capaz de induzir diretamente a diferenciação das células B em ASCs (GENESTIER et al., 2007), em humanos, devido à baixa expressão desse receptor em células B naïves, o TLR4 atua como um potencializador da resposta humoral em células B já ativadas, onde sua expressão é bem maior (ANDERSON; LAWTON, 1987; DUMONT et al., 2009; MITA et al., 2002). Ainda, sinergias entre BCR e esse receptor já foram descritas (MINGUET et al., 2008; PONE et al., 2012). Além disso, sabe-se que a ativação de TLR4 inicia uma cascata de eventos de sinalização que promovem a ativação do complexo NF-kB e a indução de secreção de IL-6, levando à ativação de STAT3 (GREENHILL et al., 2011). Tanto a IL-6 quanto a STAT3 são fatores-chave de sobrevivência e proliferação de ASCs normais e malignas (KLEIN et al., 2003), sugerindo que a NS1 poderia estar exacerbando a ativação de IL-6 e STAT3 juntamente com a proliferação de ASCs. Reforçando essa hipótese, um estudo in vitro também relatou a capacidade da NS1 de direcionar a interação com STAT3 levando à indução significativa de TNFα e IL-6 (CHUA et al., 2005). Porém, mais uma vez, em nossas análises de dados públicos de transcriptoma não encontramos diferença na expressão de TLR4 entre os pacientes com DF e indivíduos saudáveis (Figura 16). Por outro lado, a expressão de IL-6 e STAT3 encontrava-se aumentada no primeiro grupo (Figura 16).

A IL-6 também foi descrita como uma das palavras mais frequentes em nossas buscas de mineração de dados textuais (**Tabela 4** e **Figura 11**). A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, que apresenta um repertório diversificado de funções fisiológicas que incluem a regulação da proliferação e diferenciação de células imunes (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). A desregulação da sinalização de IL-6 está associada a distúrbios inflamatórios e linfoproliferativos, tais como artrite reumatoide (SRIRANGAN; CHOY, 2010) e mielomas (HU et al., 2016). Ela foi inicialmente caracterizada como um fator capaz de que aumentar a produção de anticorpos em células B (HIRANO et al., 1985) e a sua superexpressão em camundongos foi associada com plasmocitose (aumento de ASCs na circulação), sugerindo que a IL-6 pode promover a diferenciação de células B em ASCs (SUEMATSU et al., 1989). Da mesma forma, camundongos deficientes em IL-6 apresentam níveis reduzidos de IgG1, IgG2a e IgG3 específicos para o antígeno após a imunização com antígeno T-dependente (KOPF et al., 1998). Outras evidências para um papel da IL-6 na produção de IgG vieram de experimentos usando um camundongo transgênico expressando uma forma truncada da gp130 (um transdutor de sinal da II-6). Estes camundongos são incapazes de ativar STAT3 após a exposição à IL-6 e mostraram níveis reduzidos da maioria dos isotipos de anticorpos após a imunização com um antígeno T-dependente (KUMANOGOH et al., 1997). Durante infecções virais, o papel da IL-6 foi descrito de maneira controversa. Enquanto vários estudos mostram um papel essencial da IL-6 em induzir uma resposta imune adequada (ERGÖNÜL et al., 2017; HARKER et al., 2011; KUO et al., 2009; LAUDER et al., 2013), outros associam essa citocina à exacerbação da doença. Estes últimos indicam que o aumento da IL-6 durante certas infecções virais pode promover a sobrevivência do vírus e/ ou exacerbação da doença clínica (HOU et al., 2014; PACHECO et al., 2015; ROLLENHAGEN; ASIN, 2011; VELAZQUEZ-SALINAS et al., 2018; WATTRANG et al., 2003) Em infecções pelo DENV, a presença de altos níveis de IL-6 no soro foi reportada em diversos estudos, sendo geralmente correlacionada com o acometimento de DHF (CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006; CHATURVEDI et al., 2000; HOBER et al., 1993; JUFFRIE et al., 2001; KANWAL et al., 2017; PINTO et al., 1999; PRIYADARSHINI et al., 2010). Curiosamente, um estudo medindo os níveis de citocinas em amostras de soros de pacientes mexicanos afetados por infecções primárias de Dengue, associou os altos níveis de IL-6 no soro com a DHF apenas em pacientes que foram infectados com o DENV2, mas não com o DENV1 (DE LA CRUZ HERNÁNDEZ et al., 2016). Como já mencionado, nas nossas análises de dados públicos de transcriptoma e expressão de IL-6 estava aumentada entre os pacientes com DF em relação indivíduos saudáveis (Figura 16). Assim, da mesma forma que a NS1, os níveis séricos de IL-6 parecem estar correlacionados com a gravidade da doença e, tendo em vista que a aumentada enumeração de ASCs na circulação sanguínea também associa-se com o desenvolvimeto de DHF

(GARCIA-BATES et al., 2013), é possível que o aumento da resposta humoral induzida pela NS1 e pela IL-6 corroborem para a patogenia da Dengue.

Como já mencionado, a ligação da IL-6 ao seu receptor resulta na ativação do transdutor de sinais e ativador da transcrição 3 (STAT3, do inglês Signal transducer and activator of transcription 3) (GREENHILL et al., 2011). Essa molécula também está descrita entre as palavras mais frequentes em nossas buscas de mineração de dados textuais (**Tabela 4** e **Figura 11**). Embora tenha sido inicialmente identificado como um fator de transcrição dependente de IL-6, sabe-se agora que o STAT3 é capaz de transduzir sinais para todas as citocinas da família IL-6 (IL-6, IL-11, IL-31, LIF, CNTF, CLC / CLF, NP, CT1, OSM) e da família IL-10 (IL-10, IL -19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26), bem como para os fatores de crescimento, IFNs, leptina, IL-21 e IL-27 (SCHINDLER; LEVY; DECKER, 2007), demonstrando a importância do STAT3 em mediar as respostas imunes. Os fatores STAT3 são classicamente ativados pela fosforilação de sua tirosina em resposta às Janus quinases (JAKs) e resultam na transcrição de uma série de genes relacionados à sobrevida, proliferação e diferenciação celular (KUCHIPUDI, 2015). No que diz respeito às células B, camundongos knockout condicionais mostraram que o STAT3 dessas células é necessário para a diferenciação em ASCs secretoras de IgG em parte, induzindo a expressão do Blimp1 (DIEHL et al., 2008; FORNEK et al., 2006). Ainda, o IRF4 também já foi descrito como alvo de ativação pelo STAT3 (BANDINI et al., 2018). Além disso, o STAT3 também demonstrou contribuir para a sobrevivência e expansão das células B de memória (AVERY et al., 2010). Sua superexpressão já foi descrita em casos de neoplasias de ASCs, deixando claro a sua importância da regulação das células B (CHONG; CHNG; DE MEL, 2019). Devido à sua alta capacidade de imunoregulação, o STAT3 é alvo de diversos vírus, principalmente daqueles associados a processos neoplásicos (KUNG; MECKES; RAAB-TRAUB, 2011; PERCARIO et al., 2003; SEN et al., 2012; TACKE et al., 2011; WARIS; HUH; SIDDIQUI, 2001). Da mesma forma, infecções pelo DENV já demonstram levar a um aumento da expressão da via JAK/STAT3, através de mecanismos dependentes de IFN (HO et al., 2005; TSAI et al., 2011). Além de promover a secreção de IL-6 via TLR4 (GREENHILL et al., 2011; MODHIRAN et al., 2015, 2017), a proteína NS1 do DENV também demonstrou interagir diretamente com o STAT3 (LIU; NG, 2008).

Outras duas interleucinas descritas entre as palavras mais frequentes em nossas buscas de mineração de dados textuais são as interleucinas 2 e 4 (IL-2 e IL-4

respectivamente; **Tabela 4** e **Figura 11**). Assim como a IL-6, aumentos nos níveis séricos de IL-4 parecem estar correlacionados com a gravidade da Dengue (ABHISHEK et al., 2017). Já a presença de altos níveis séricos de IL-2 parece estar relacionada com o acometimento da forma subclínica ou assintomática da doença (HATCH et al., 2011). Enquanto que a IL-2 é produzida durante respostas do tipo Th-1 e está associada com o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência de células T CD4+ e células T CD8+ (HATCH et al., 2011), a IL-4 é produzida por respostas do tipo Th-2 e está associada a regulação da produção de anticorpos, sobrevida de células B ativadas, inflamação e no desenvolvimento de respostas de células T efetora (NELMS et al., 1999). Em Dengue, a IL-4 tem sido correlacionada com a patogenicidade provocada por reações imunes do tipo Th-2, induzida por compostos salivares do mosquito (COX et al., 2012). Ainda, células dendríticas dérmicas CD14 + estimuladas com IL-4 mostram carga viral aumentada quando infectadas com DENV em relação à aquelas não estimuladas (SCHAEFFER et al., 2015). No que diz respeito a diferenciação das células B em ASCs, a IL-4 mostrou atuar de forma sinérgica ao o fator ativador de células B da família do fator de necrose tumoral (BAFF) para promover a ativação de células B, associado a um efeito protetor contra sinais apoptóticos anti-IgM, aumentando a sobrevida dessas células (GRANATO et al., 2014). Já a IL-2 produzida por células T parecem estar criticamente envolvidas no comprometimento das células B maduras com diferenciação de ASCs, potencializando a ativação de ERK e a subsequente repressão de BACH2 e IRF8, sustentando a expressão de BLIMP1 (LE GALLOU et al., 2012). Em nossas análises de dados públicos de transcriptoma e expressão de IL-4 estava diminuída entre os pacientes com DF em relação indivíduos saudáveis, enquanto que a expressão de IL-2 se apresentava inalterada (Figura 16). Embora seja em um contexto completamente diferente, a expressão de IL-4 foi descrita como presente somente nos momentos iniciais após quadros de acidente vascular cerebral, já não sendo mais detectada após o segundo dia, ainda que outros componentes da resposta imune estejam presentes (ZHAO et al., 2015). Da mesma forma, outro trabalho demonstrou que a expressão de IL-2 em camundongos tratados com o peptídeo antigênico MMC (do inglês Moth Cytochrome C) é rápida e transiente (SOJKA et al., 2004). Dessa forma, é possível que, apesar de ambas citocinas terem sido reportadas como aumentadas sericamente em pacientes com diferentes quadros de Dengue, o momento da coleta no caso dos

dados de transcriptoma, tenha sido tardio para a detecção de sua expressão no sangue total desses pacientes.

Outra molécula descrita entre as palavras mais frequentes em nossas buscas de mineração de dados textuais é a TP53 (**Tabela 4** e **Figura 11**). A TP53 ou apenas p53 é um fator de transcrição que regula uma grande variedade de genes, bloqueando o ciclo celular e induzindo apoptose, muito conhecido pelo seu papel na supressão de tumores (BRADY; ATTARDI, 2010). Como já mencionado, a sua ativação está correlacionada com a sinalização mediada por IFNs do tipo I (DE WEERD; NGUYEN, 2012; TAKAOKA et al., 2003). Ainda, a p53 ativada pode combinar diretamente com o fator regulador 9 (IRF9) da via do IFNs, aumentando os níveis de expressão dos genes relacionados ao IFN do tipo I e o efeito antiviral dos mesmos (MUÑOZ-FONTELA et al., 2008). Ambas, a subunidade p65 do NF-kB e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*), também são capazes de induzir a atividade de p53 por ligarem-se ao seu promotor (WU; LOZANO, 1994). Em Dengue, a p53 já foi associada à morte celular induzida pela infecção viral (NASIRUDEEN; LIU, 2009; NASIRUDEEN; WANG; LIU, 2008; THONGTAN; PANYIM; SMITH, 2004). Em contrapartida, a p53 também já demonstrou ser capaz de inibir a infecção viral justamente por ativar IFNs do tipo I (HU et al., 2017). Em nossas análises de dados públicos de transcriptoma a expressão de p53 estava aumentada entre os pacientes com DF em relação indivíduos saudáveis (Figura 16), sugerindo um aumento de apoptose celular ou já que não detectamos aumento da resposta de IFNs. Durante infecções virais, a morte celular apoptótica pode representar um mecanismo vital de limitar as respostas inflamatórias e outras respostas imunes (O'BRIEN, 1998). Ao desencadear apoptose, os vírus podem disseminar-se para as células vizinhas por meio da fagocitose, resultando em corpos apoptóticos, minimizando a ativação de respostas imunes (HAY; KANNOURAKIS, 2002).

Outra molécula também descrita entre as palavras mais frequentes em nossas buscas de mineração de dados textuais é o fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF-b1 ou TGF-β1; do inglês *transforming growth factor-beta 1*; **Tabela 4** e **Figura 11**). Trata-se de uma citocina com capacidades imunomodulatórioas, que pode ser secretada por diferentes tipos de leucócitos e células estromais (LI; FLAVELL, 2008). Em células T, o TGF-β1 inibe a proliferação, bem como a diferenciação dessas em células Th1 e células Th2 (BANCHEREAU; PASCUAL; O'GARRA, 2012). Ainda em células T, o TGF-β1 inibe o desenvolvimento de células Th1 inibindo as respostas

de sinalização IFN-y, envolvendo as vias as vias MEK / ERK e p38 MAP quinase no processo (PARK; LETTERIO; GORHAM, 2007). Ainda, o TGF-B1 também inibe a resposta imunológica excessiva promovendo a indução e a manutenção de células T reguladoras Foxp3+ (BANCHEREAU; PASCUAL; O'GARRA, 2012). Já no que diz respeito às células B, foi relatado que o TGF-β1 inibe a proliferação e a produção de anticorpos de células B em camundongos e humanos in vitro (KEHRL et al., 1989, 1991; SONODA et al., 1989). In vivo, o TGF-β1 é expresso na superfície de células T reguladoras Foxp3 + e também foi descrito como envolvido na inibição de células B por este subtipo celular (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001). Diversos trabalhos reportam o aumento de TGF-β após uma infecções virais, incluindo citomegalovírus (MICHELSON et al., 1994), hepatite B (YOO et al., 1996), hepatite C (PARADIS et al., 1996), HIV (KEKOW et al., 1990) e outros. Em Dengue, o seu papel é controverso. Enquanto um maior nível de expressão de TGF-<sup>β</sup>1 já foi descrito em pacientes assintomáticos, sugerindo um papel protetor para TGF-β1 na doença (YEO et al., 2014), outros estudos relataram uma associação entre maiores níveis séricos de TGF- $\beta$  e o acometimento de DHF, sugerindo um papel na gravidade da doença (AGARWAL et al., 2001; LIBRATY et al., 2002). Contrariando essas duas situações, em nossas análises de dados públicos de transcriptoma e expressão de TGF-\beta1 não apresentou diferença entre os pacientes com DF e os indivíduos saudáveis (Figura **16**). Outro estudo que avaliou essa citocina, embora tenha detectado o seu aumento durante a fase aguda da doença, demonstrou que o seu pico é atingido tardiamente, por volta do 11º dia após o acometimento dos sintomas (AZEREDO et al., 2006). Portanto, é possível, que no estudo que estamos utilizando como base, as alterações dessa citocina (para mais ou para menos) viriam a ocorrer em um momento posterior ao da coleta.

Por fim, a última palavra descrita entre as palavras mais frequentes em nossas buscas de mineração de dados textuais é a IghM ou região constante da cadeia pesada da imunoglobulina M (**Tabela 4** e **Figura 11**). As imunoglobulinas são as moléculas de reconhecimento de antígeno das células B. Uma molécula imunoglobulina é composta de 2 cadeias pesadas idênticas e 2 cadeias leves idênticas unidas por pontes dissulfeto, de forma que cada cadeia pesada esteja ligada à uma cadeia leve e as 2 cadeias pesadas estejam ligadas entre si. Cada cadeia pesada de imunoglobulinas possui uma região variada N-terminal (V) contendo o sítio de ligação ao antígeno e uma região constante C-terminal (C), codificada por um gene

114

individual da região C, que determina o isotipo do anticorpo e proporciona funções efetoras ou de sinalização (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Sabendo da importância da cadeia pesada da imunoglobulina para as respostas de células B, seria fácil dizer que termos achado a palavra "IghM" entre as palavras mais frequentes em nossas buscas de mineração de dados textuais (Tabela 4 e Figura 11) estaria relacionada com a massiva expansão de ASCs vista durante a infecção pelo vírus da Dengue (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012). Entretanto, é importante lembrar que esse dado refere-se às correlações textuais entre as palavras de busca inseridas, e não à uma maior expressão daquela molécula em si. Com isso, é esperado que quando se busque em um banco de dados a palavra "célula B" ou mesmo moléculas adjacentes ao BCR, esteja presente no texto a palavra imunoglobulina. Já em relação a Dengue, buscas textuais muitas vezes resultam trabalhos onde a detecção da doença foi feita mediante quantificação dos títulos de IgM específicos para o vírus (CHANGAL et al., 2016; CHIEN et al., 2018; NISALAK, 2015; RAMABHATTA et al., 2017), e daí, a alta incidência dessa palavra em nossas buscas.

Embora, até o momento, analisamos a expressão pontual de alguns genes, conhecer o perfil global de transcrição gênica do hospedeiro, em resposta à infecção, é uma importante ferramenta para investigar a complexa interação entre o patógeno e o hospedeiro (HOSSAIN; CHAKRABORTY, 2006). Com essa ferramenta, é possível determinar se os grupos de genes diferencialmente regulados são também aqueles mais significativamente importantes, bem como vias regulatórias transcricionais chaves em resposta à um determinado estímulo ou doença (BLANKLEY et al., 2014). Sendo assim, investigamos quais dos 7258 genes, disponíveis no dado público de transcriptoma (GEO Ref: GSE51808), estavam entre os 10 genes mais diferentemente expressos (para mais – *upregulated* – ou para menos - *downregulated*) entre indivíduos controle e pacientes infectados (**Tabela 5**).

A primeira coisa a nos chamar atenção foi a presença aumentada do *CD38*. Isso porque, já foi descrito que a assinatura transcricional observada em amostras de sangue total ou PBMCs em resposta a uma doença pode ser consequência das mudanças no número e proporção de tipos celulares, bem como nos seus transcritos (BLANKLEY et al., 2014). A presença do *CD38* entre os genes positivamente mais diferentemente expressos entre controle e infectados, particularmente entre os pacientes com DHF (**Tabela 5**), é um forte indicativo de que o número de plasmablastos encontra-se aumentado entre os pacientes infectados. Esta proteína atua como ectoenzima, catalisando a conversão de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD +) em nicotinamida, adenosina difosfato-ribose (ADPR) e ADPR cíclico, e é um importante marcador deste tipo celular. Esse aumento era esperado, pois, pacientes infectados pelo DENV apresentam um aumento exacerbado na frequência de plasmablastos circulantes, e este aumento era ainda maior em pacientes com formas graves da doença (GARCIA-BATES et al., 2013; THAI et al., 2011; WRAMMERT et al., 2012). Ainda, o CD38 parece estar envolvido na sinalização através do receptor de célula B (BCR) (DEAGLIO et al., 2003).

Em relação aos demais genes encontrados, observamos que dentre os mais diferentemente expressos entre controle e infectados, estão aqueles que participam de processos mitóticos (Tabela 5 e Figura 13). Sabe-se que em resposta a estímulos antigênicos, as células do sistema imune entram em sucessivas mitoses com o intuito de aumentarem o número de clones específicos para aquele antígeno (DAVIES et al., 1966). Dois genes encontrados por nós participam desse processo, como o BUB1 e o CEP55 (Tabela 5). Enquanto o BUB1 codifica uma serina/treonina quinase que possui um papel central durante a mitose, atuando como um checkpoint dacorreta ligação do fuso mitótico e do alinhamento cromossômico (BARON et al., 2016), o CEP55 codifica a proteína centrossomal essencial para funções celulares dependentes de centrossomas (local onde partem os microtúbulos do citoesqueleto), como a progressão do ciclo celular e a regulação da citocinese (ZHAO; SEKI; FANG, 2006). Neste mesmo contexto, há ainda genes relacionados com a replicação de DNA, como MCM10 e RRM2. O MCM10 codifica uma proteína essencial para a iniciação da replicação genômica eucariótica (DU; STAUFFER; EICHMAN, 2012) e o RRM2, uma das duas subunidades da enzima ribonucleotídeo redutase responsável por catalisar a formação de desoxirribonucleotídeos. Sua síntese é regulada de forma dependente ao ciclo de proliferação celular e o seu aumento foi correlacionado com o aumento na atividade de NF-kB (PRIYADARSHINI et al., 2010). Outro exemplo, o TYMS, codifica a timidilato sintetase que catalisa a metilação de desoxiuridilato para desoxitimidilato. Esta reação é crítica para manter os requisitos metabólicos essenciais de proliferação e crescimento celular. Sua proteína também demonstrou se ligar com alta afinidade ao RNA (RNA binding protein) e regular diretamente sua própria biossíntese por feedback autoregulatório de tradução (LIU et al., 2002).

Outro gene identificado dentre os genes positivamente mais diferentemente expressos entre controle e infectados foi o IFI27 (Tabela 5). Esse gene (também conhecida como ISG12 ou p27) pertence à uma família de pequenos genes induzidos por IFN de função pouco conhecida (SUOMELA et al., 2004). E como já mencionado, a primeira linha de defesa contra o DENV tem início com a produção de IFNs tipo I (FENSTERL; CHATTOPADHYAY; pelas células infectadas SEN, 2015). Curiosamente, o IFI27 também demonstrou ser um dos alvos transcricionais do IRF4 e fazer parte do perfil e assinatura molecular induzida por esse gene em linfomas de células B não-Hodgkin (WANG et al., 2014). Outro estudo também reportou que dos 17 genes com a expressão aumentada em PBMCs de pacientes com DF durante a fase aguda da doença, 8 genes eram genes relacionados com IFNs, incluindo o IFI27 (UBOL et al., 2008). Em nosso estudo, assim como o IFI27, o HMMR também foi identificado dentre os genes positivamente mais diferentemente expressos entre controle e infectados (Tabela 5). A expressão aumentada de HMMR (receptor de motilidade mediada por hialuronano) foi correlacionada como um importante fator antiapoptótico de significância prognóstica negativa em linfomas de células B. Esse receptor celular pode interagir com CD44, formando complexos que ativam sinais como ERK1/2 e BCRA1 e BCRA2, associados com a motilidade celular (NAGEL et al., 2010).

Sabendo que a resposta de a enumeração de ASCs é ainda maior nos pacientes com DHF do que naqueles com DF (THAI et al., 2011), avaliamos também quais genes estariam entre os 10 mais diferentemente expressos (para mais – *upregulated* – ou para menos - *downregulated*) entre os pacientes com DF e DHF (**Tabela 6**).

O primeiro deles descrito entre os positivamente mais diferentemente expressos é o *IGHG1* (**Tabela 6**). Este refere-se a região constante da cadeia pesada de IgG1. Títulos aumentados de IgG1 já foram reportados em pacientes com DHF em relação a pacientes com DF (KORAKA et al., 2001, 2003; THEIN et al., 1993). Embora nesses estudos a elevada presença de IgG1 tenha sido vista em infecções secundárias ao DENV, infecções primárias também apresentam esse perfil. Um estudo realizado com 200 pacientes na Índia, reportou que 74 deles apresentaram a forma mais grave da doença em uma infecção primária pelo vírus, e que nesses, os títulos de IgG1 eram maiores que nos pacientes com DF (BACHAL et al., 2015). Segundo os autores deste trabalho, esses dados sugerem que a resposta imune

117

aumentada, incluindo os anticorpos IgG1, estaria implicada na patogênese da DHF, uma vez que eles encontraram uma correlação significativa entre títulos aumentados de IgG e baixas contagens de plaquetas corrobora com esta hipótese (BACHAL et al., 2015). Entretanto, esse achado pode ser apenas consequência da resposta imune induzida pela infecção pelo DENV.

Outro gene reportado entre os positivamente mais diferentemente expressos é o *MOXD1* (**Tabela 6**). Este, conhecido como monooxigenase tipo DBH 1 ou monooxigenase X, é um homólogo a sequência da enzima dopamina β.-hidroxilase e membro da família de monooxigenases dependentes de cobre, importantes na modulação neuro-imune (CHAMBERS et al., 1998). Trata-se de uma enzima não secretada, que localiza-se por todo o retículo endoplasmático em células endócrinas ou não endócrinas (XIN; MAINS; EIPPER, 2004), cuja função ainda não foi bem estabelecida (SAHAR et al., 2011). Entretanto, camundongos deficientes de CD38, apresentam altas expressões de *MOXD1* e c-Myc (SAHAR et al., 2011).

O *DUSP5* também foi encontrado entre os genes positivamente mais diferentemente expressos entre os pacientes com DF e DHF (**Tabela 6**). Trata-se do gene da proteína fosfatase de dupla especificidade 5, com capacidade de remover grupos fosfato dos resíduos de serina/treonina e tirosina (KUTTY et al., 2017), cuja expressão é rapidamente induzida em resposta a estímulos mitogênicos e/ou de estresse, e parece inativando especificamente as MAPKs ERK1/2 (KEYSE, 2008). Sua presença já demonstrou ser necessária para a diferenciação de células B murinas em ASCs, inibindo a ativação de ERK mediada por BCR. Isso porque a constante sinalização do BCR através do ERK impede a diferenciação em ASCs por bloquear a expressão de Blimp1 (RUI et al., 2006). Embora não hajam artigos descrevendo o papel da DUSP5 durante infecções pelo DENV, já foi reportado que a atividade de ERK foi suprimida pela infecção pelo DENV-2 (CHANG et al., 2012). É possível que nesses casos, a DUSP5 tenha alguma contribuição. Coincidentemente, em nossas análises de dados públicos de transcriptoma, a expressão de ERK1/2 estava reduzida nos pacientes com DF em relação aos indivíduos saudáveis (**Figura 16**).

Um achado curioso entre os genes positivamente mais diferentemente expressos entre os pacientes com DF e DHF foi a presença do *DDX11L2* (**Tabela 6**). Isso porque, o *DDX11L2* é descrito no NCBI como um pseudogene (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=DDX11L2). Os pseudogenes já foram considerados como transcricionalmente inativos e sem função molecular específica.

No entanto, existem evidências que os RNAs não codificadores longos derivados de pseudogene (IncRNAs) podem ser importantes reguladores imunológicos (DENARO; MERLANO; LO NIGRO, 2019). Inclusive, os IncRNAs já foram descritos como importantes mediadores em vários processos imunológicos provocados pela vacinação (DE LIMA et al., 2019) e em infecções pelo DENV (WANG et al., 2017). Entretanto, até o momento, o papel do *DDX11L2* permanece desconhecido.

Por fim, o último gene entre os genes positivamente mais diferentemente expressos entre os pacientes com DF e DHF é o *SCIN* (**Tabela 6**). Este gene codifica a proteína destruidora de filamentos de actina dependente de Ca2+, conhecida como Scinderina (RODRÍGUEZ DEL CASTILLO; VITALE; TRIFARÓ, 1992). Essa proteína tem uma importante função reguladora na exocitose celular, afetando a organização da rede de microfilamentos abaixo da membrana plasmática (MARCU et al., 1996). Durante a infecção pelo DENV, as partículas virais maduras são liberadas das células hospedeiras por meio de exocitose (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). O aumento de *SCIN* nos pacientes com DHF em relação aos pacientes com DF, sugere que uma maior frequência de exocitose esteja ocorrendo nas células desses pacientes em consequência de uma maior replicação viral. De fato, a carga viral durante infecções pelo DENV já foi relacionada com a severidade da doença (POZO-AGUILAR et al., 2014; SOLBRIG; PERNG, 2015).

Com o intuito de melhor compreender o perfil de sinalização de alguns dos genes relacionados com a ativação de células B em Dengue avaliamos a assinatura transcricional de 95 genes participantes da sinalização *downstream* ao BCR em indivíduos saudáveis e pacientes com DF e DHF (**Figura 14**). Identificamos dois grupos de genes distintamente expressos entre eles. Esses dois grupos foram ontologicamente associados com atividades de proteínas quinase (**Figura 14 B e C**). A dualidade na resposta envolvendo proteínas quinases já foi brevemente discutida anteriormente neste trabalho. Por apresentarem diversas vezes funções opostas, não foi surpreendente o fato que genes dessa mesma família tenham sido descritos em ambos agrupamentos gênicos. Ainda, em concordância com o fenótipo de plasmablastos aumentados na Dengue, pacientes infectados pelo DENV apresentaram menores expressões do fator de transcrição Bcl6 (**Figura 14 B**) e maiores para IRF4 (**Figura 14 C**), essenciais para a diferenciação de linfócitos B em ASCs (NUTT et al., 2015). Embora essas análises tenham sido realizadas utilizando sangue total e não linfócitos B isolados, o agrupamento das amostras de DHF no canto

119

esquerdo do *heatmap*, seguido das amostras de DF na região central e dos controles no total oposto (**Figura 14**) reforçou a hipótese que as vias de sinalização referentes às células B se encontram desreguladas durante a infecção pelo DENV, de maneira ainda mais intensa nos pacientes com DHF que nos pacientes com a forma mais branda da doença.

Combinando os dados de mineração textual, literatura e dados públicos transcriptoma, nós esquematizamos uma via contendo hipotéticas moléculas que podem estar influenciando a diferenciação das células B em ASCs durante a infecção pelo DENV (Figura 16). Ao contrário do esperado, a grande maioria dessas moléculas apresentaram expressão semelhante entre os pacientes com DF e indivíduos saudáveis (Figura 16, quadrados cinza). Infelizmente, por tratarem-se de dados oriundos do sangue total e não de células B isoladas, nossa capacidade de avaliar o papel dessas moléculas intrinsicamente nas células B fica comprometido. Algumas das moléculas incluídas nessa via já foram discutidas anteriormente, a relação entre as demais e o seu hipotético papel na diferenciação de células B em ASCs durante a infecção pelo DENV estão contidos no Anexo 3. Entretanto, gostaríamos de chamar atenção para um dado em particular: a menor expressão de moléculas que respondem aos sinais de cálcio, como a já mencionada Calcineurina e as moléculas NFATC1, DOK3 e GRB2 (Figura 16). Esse achado é interessante pois o cálcio é um íon que embora atue como um segundo mensageiro na maioria dos tipos celulares (CRABTREE; SCHREIBER, 2009), seus sinais podem desencadear desfechos tão opostos quanto proliferação (PINTO et al., 2015) e apoptose celular (FENGLING et al., 2012). Em linfócitos B, particularmente, dependendo da duração e da intensidade da ativação do BCR, diferentes concentrações citosólicas de cálcio são acionadas, resultando na ativação de fatores de transcrição distintos (SCHARENBERG; HUMPHRIES; RAWLINGS, 2007). Enquanto que interações intensas e sustentadas do BCR resultariam na ativação dos fatores de transcrição NF-kB e NFAT, interações intensas porém breves parecem resultar na ativação de NF-kB somete (SCHARENBERG; HUMPHRIES; RAWLINGS, 2007). Por outro lado, interações fracas, mas continuadas do BCR, desencadeariam a ativação de NFAT apenas (SCHARENBERG; HUMPHRIES; RAWLINGS, 2007). Embora esses fatores de transcrição partilhem diversas propriedades, como domínios de ligação ao DNA e a rápida translocação para o núcleo após sua ativação, suas funções diferem notavelmente (SERFLING et al., 2004). Ao passo que os NFATs possuem atividade
pró-apoptótica e suportam a morte celular induzida por ativação (AICD) das células T e B, as proteínas NF-kB frequentemente exercem um forte efeito anti-apoptótico nos linfócitos e em outras células (SERFLING et al., 2004). Desequilíbrio entre as atividades de NF-kB e NFAT é frequentemente associado a processos oncológicos, e a depleção deste último já demonstrou promover hiper-reatividade em linfócitos B murinos, evidenciada por elevados títulos séricos de IgG1 e IgE, e pela expansão de ASCs (PENG et al., 2001). A hipótese do desequilíbrio entre a atividade de NF-kB e NFAT na massiva expansão de ASCs vista em Dengue é corroborada pelo conjunto de outros dois fatores: (I) citocinas induzidas durante a ativação do NF-kB promovem a ativação do STAT3 (GRIVENNIKOV; KARIN, 2010), uma molécula cuja hiperatividade também está diretamente correlacionada com neoplasias de ASCs (CHONG; CHNG; DE MEL, 2019); e (II) a calcineurina, molécula responsável ativação do NFAT, é também responsável pela regulação negativa da atividade de STAT3, de forma que diminuições na atividade da primeira levariam a um aumento na atividade da segunda (WOETMANN et al., 1999). Ainda, Simon-Loriere et al. (2017) descreveram em seu trabalho que 379 vias celulares estão diferentemente moduladas entre crianças assintomáticas e sintomáticas para Dengue. Dentre essas, a via "regulação da resposta imune mediada pelo fator nuclear de células T ativadas (NFAT) " foi a que apresentou maior ativação nos pacientes sintomáticos em relação aos assintomáticos, seguida da via "apoptose de linfócitos T mediada por cálcio". Por fim, ainda pensando no papel que o cálcio pode ter na modulação da diferenciação em ASCs, é possível que os quadros de hipocalcemia vistos em pacientes com Dengue (SHIVANTHAN; RAJAPAKSE, 2014) possam influenciar no influxo e disponibilidade de cálcio intracelular. Infelizmente, não tivemos como avaliar o papel do cálcio na diferenciação de células B em ASCs nesse trabalho, mas pretendemos fazê-lo em estudos futuros.

Uma vez tendo estabelecido os potenciais alvos de estudo, nosso próximo objetivo era coletar o sangue de pacientes infectados por DENV, até o 4º dia do aparecimento dos sintomas (momento onde as células B estariam em processo de diferenciação em ASCs), e avaliar a expressão gênica e proteica de alguns deles em células B isoladas do sangue desses pacientes. Entretanto, logo que obtivemos a aprovação do comitê de ética para iniciar a captação de pacientes, tivemos que enfrentar um imprevisto que, sem dúvidas, teve grande impacto no cronograma inicialmente proposto: o fechamento do pronto-socorro do Hospital Universitário da

USP, justamente durante o período tido como de maior incidência de Dengue em SP nos últimos anos. Esse ocorrido inviabilizou a captação de pacientes e m um momento crucial e nos obrigou a buscar um novo posto de coleta. Realizamos então, uma parceria com o Centro de Saúde Escola Samuel Barnsley Pessoa (CSEB) da FMUSP, mas esta nunca chegou a gerar captações, possivelmente por que nos anos seguintes a incidência de Dengue caiu drasticamente em SP, como demonstrado na Figura 2 (o que dificultou ainda mais a obtenção de amostras), e foi acompanhada do surto de febre amarela (o que pode ter mascarado alguns potenciais pacientes que eventualmente tenham procurado pelo CSEB). É digno de nota, que as tentativas de colaboração com outros pesquisadores que poderiam nos fornecer amostras de pacientes com Dengue previamente coletadas foram todas infrutíferas. Então, para não ficarmos parados por falta de pacientes, fomos obrigados a mudar a nossa abordagem para uma estratégia in vitro. Para isso, decidimos utilizar um modelo de diferenciação em ASCs proposto por Kwissa et al. (2014), onde células B isoladas eram co-cultivadas com monócitos previamente infectados com DENV por 48h. Após 6 dias de co-cultura, Kwissa et al. (2014) reportaram ter encontrado um aumento na população fenotípica de ASCs (CD20<sup>neg</sup> CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) resultante da estimulação das células B pelos fatores BAFF/APRIL e IL-10 secretados pelos monócitos CD14+ CD16+. Entretanto, apesar de diversas tentativas para reproduzir esse modelo, nós não obtivemos sucesso (Figuras 17-20), nem mesmo após utilizarmos a cepa de DENV adaptada DENV4 TVP/360.

A produção dos fatores BAFF/APRIL e IL-10 em resposta à infeção pareceu ser a principal característica indutora da diferenciação nesse modelo (KWISSA et al., 2014). Entretanto, embora o estímulo seja outro, um trabalho reportou que a expressão gênica de IL-10 foi baixa ou ausente em monócitos CD14+ CD16+ estimulados *in vitro* por LPS (FRANKENBERGER et al., 1996). Ainda, uma produção baixa ou ausente de IL-10 por monócitos CD14+ CD16+ também foi confirmada por outro grupo (MIZUNO et al., 2005). Ainda que não tenhamos avaliado a transcrição ou produção dessa citocina em nossas tentativas de reproduzir esse protocolo, é possível que a secreção da mesma não estivesse ocorrendo, prejudicando os sinais necessários para a indução da diferenciação de células B em ASCs. Em concordância com essa hipótese, outro trabalho avaliou os requisitos metabólicos necessários para diferenciação das células B em ASCs. Foi reportado que a estimulação isolada com

BAFF durante 3 dias não era o suficiente para induzir tal reprogramação nas células B (CARO-MALDONADO et al., 2014).

Por não conseguirmos reproduzir o modelo proposto por Kwissa et al. (2014), resolvemos tentar uma nova abordagem. A infecção de PBMCs por DENV, in vitro, demonstrou levar a detecção IgM no sobrenadante da cultura no 12º dia (CORREA et al., 2015). Tomamos este dado como um indicativo de que as células B presentes nas PBMCs apresentam a capacidade de se diferenciarem em ASCs mediante infecção por DENV, e testamos um protocolo parecido. De fato, a infecção de PBMCs por DENV foi capaz de induzir tanto o fenótipo (CD20<sup>neg</sup> CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>, **Figura 24**) quanto a função (produção de IgG, Figura 25) de ASCs após 7 dias de cultura. Embora Correa et al. (2015) tenham detectado a presença de anticorpos nos sobrenadantes das culturas, até o momento, essa parece ser a primeira caracterização celular (contendo fenótipo e função) da diferenciação em ASCs induzida por DENV in vitro. Ainda, em nossos experimentos a magnitude da diferenciação induzida pelo vírus foi semelhante à induzida por mitógenos (Figura 24 e 25), corroborando com a massiva expansão dessas células vista in vivo (GARCIA-BATES et al., 2013; WRAMMERT et al., 2012). Interessantemente, assim como proposto por Kwissa et al. (2014), as culturas infectadas por DENV apresentaram maior expressão de BAFF e de IL-10 (Figura 42), suportando a teoria de que essas moléculas estariam favorecendo a massiva expansão de ASCs na Dengue.

Questionamos, então, se a diferenciação estava ocorrendo de maneira semelhante para ambos estímulos dentro de uma mesma amostra, o que sugeriria uma pré-disposição à diferenciação ao invés de uma capacidade indutiva real do vírus. Para isso, realizamos um *heatmap* (**Figura 26**) contendo os dados normalizados (*z score*) da enumeração de ASCs vista no ELISPOT (**Figura 25**), agrupando as amostras conforme o perfil de resposta. Com isso, foi possível perceber que o fato de uma amostra responder em altas magnitudes ao mitógenos não significava responder em altas magnitudes ao vírus e vice e versa (**Figura 26**). Esse foi um forte indicativo de que a diferenciação induzida por cada um desses dois estímulos poderia estar sendo mediada por diferentes fatores em cada condição. Ainda, sabendo que a expansão de plasmablastos vista em Dengue é maior em infecções secundárias (THAI et al., 2011) e que isso é devido à uma resposta de memória induzida por reatividade cruzada entre os sorotipos de DENV (PRIYAMVADA et al., 2016), decidimos investigar se o que estávamos vendo era referente a um contato prévio do doador da

123

amostra com o vírus. E concluímos que não era (**Figura 27**). Das 13 amostras cujo soro do doador foi testado para IgG anti-DENV NS1 dos 4 sorotipos, apenas 3 apresentaram títulos positivos, e ainda assim, muito baixos (**Figura 27**). A baixa frequência de infecção prévia já era esperada por nós, uma vez que boa parte das amostras foram coletadas no Paraná, uma região com baixa incidência de Dengue (FARES et al., 2015). Dessa forma, em nosso trabalho, demonstramos que a diferenciação em ASCs vista após infecção de PBMCs *in vitro*, independia da presença de células B de memória.

Dois outros questionamentos surgiram depois disso: I) sabendo que, independentemente da idade, as mulheres tendem a apresentar respostas de anticorpos maiores que os homens, bem como níveis basais de imunoglobulina mais altos e maior número de células B após vacinações (KLEIN; FLANAGAN, 2016), estariam as amostras respondendo de maneira diferente devido ao sexo do doador? E II) sabendo que vacinas que fazem uso de vírus inativados, são capazes de induzir potentes respostas humorais (STAUFFER; EL-BACHA; DA POIAN, 2008), seria a integridade do vírus importante para a diferenciação em ASCs vista no nosso modelo? A resposta para a primeira pergunta foi não; independente do estímulo utilizado não encontramos diferença na magnitude de ASCs entre homens e mulheres (Figura 28 **A-B**). Além de influenciar a magnitude da resposta após vacinações, o sexo também foi descrito como capaz de influenciar a intensidade e a prevalência de infecções virais (KLEIN; FLANAGAN, 2016). Inclusive, em Dengue, a incidência das formas graves da doença parece ser maiores em mulheres do que em homens (ANDERS et al., 2011). A hipótese predominante para as diferenças imunológicas entre os sexos é que esteroides sexuais influenciem diretamente o funcionamento das células imunes. Enquanto que estrógenos parecem regular positivamente a secreção de citocinas próinflamatórias (por exemplo, IFNy) e as moléculas induzíveis a IFNy (óxido nítrico, NOS2 e COX2), andrógenos parecem suprimir estas respostas (ANSAR AHMED; KARPUZOGLU; KHAN, 2010). Muito provavelmente, não encontramos tais diferenças em nosso estudo, pois os estímulos hormonais provenientes das células endócrinas são inexistentes in vitro. Já a resposta para a segunda pergunta foi sim; a integridade do vírus é importante para a diferenciação em ASCs vista no nosso modelo (Figura **29 A-B**). As partículas inativadas por UV não foram capazes de induzir a mesma magnitude de resposta do que as partículas viáveis (Figura 29 A-B). De maneira semelhante, Correa et al. (2015) detectaram menores títulos de IgM no sobrenadante

de culturas estimuladas com partículas de DENV inativadas em relação às partículas íntegras após 12 dias de cultura. Outro trabalho também reportou que partículas de DENV inativadas por UV não são capazes de induzir a degranulação de mastócitos e a produção de quimiocinas da mesma forma que as partículas viáveis (CHU et al., 2017). Em geral, para que possam induzir respostas imunes apropriadas, vacinas que têm como base partículas virais inativadas, contam com a ajuda dos adjuvantes (SHI et al., 2018). De fato, partículas de DENV inativadas e inoculadas em camundongos na presença do adjuvante *alum*, foram capazes de induzir altos títulos de IgG (ZELLWEGER et al., 2014). Assim, a ausência de um indutor/potencializador da resposta imune tal qual um adjuvante, explica a incapacidade das partículas virais inativadas em induzir a mesma resposta que as partículas viáveis.

Outro ponto frequentemente associado à magnitude de respostas imunes é a carga viral (KWISSA et al., 2014; LELIGDOWICZ et al., 2010; NIVARTHI et al., 2019). A carga viral de DENV já foi relacionada com a magnitude da resposta de ASCs (NIVARTHI et al., 2019) e com a frequência sanguínea de monócitos CD14+ CD16+ (KWISSA et al., 2014). Em nossas análises, não conseguimos correlacionar a magnitude da diferenciação em ASCs com a carga viral, nem pelo método de titulação (Anexo 4), nem por PCR quantitativa (Anexo 5). Isso porque, não foram detectadas partículas infectivas no sobrenadante no dia 7 de cultura (Anexo 4), nem RNA viral no interior das células (Anexo 5). Silveira et al. (2018) relataram em seu trabalho a detecção de partículas infectivas de DENV no sobrenadante de culturas de células T infectadas em até 5 dias (*endpoint* experimental), bem como a presença do vírus no interior dessas células nesse mesmo período. Correa et al. (2015) por sua vez, detectaram a presença de partículas virais no interior de células B isoladas e infectadas por DENV, após 24h de infecção, entretanto, por PCR quantitativa. Entretanto, as partículas virais liberadas no sobrenadante dessas culturas não demonstraram apresentar capacidade infectiva, de modo que a carga viral no interior das células não aumentou com o passar do tempo (até 72h). Por diferirem no tempo de aferição da carga viral e até mesmo na metodologia utilizada, estabelecer uma comparação entre os nossos resultados e os apresentados por esses dois grupos fica difícil. É possível que a nossa detecção tenha sido prejudicada pelo tempo prolongado de nossas culturas (7 dias). Especialmente por nenhuma troca de meio de cultura ser feita durante esse período. Estudos estruturais de DENV revelando mudanças

estruturais irreversíveis (MODIS et al., 2004; ZHANG et al., 2013) baseadas em pH, suportam essa teoria.

Em seguida, tendo em vista que gostaríamos de investigar vias de sinalização nos linfócitos B, decidimos avaliar a capacidade dessas células, quando isoladas, em se diferenciarem mediante a presença do vírus. Entretanto, uma vez isoladas, as células B (CD19+) não foram capazes de se diferenciarem em ASCs após a infecção por DENV, independente do MOI utilizado (Figura 30 A-B). Em seu trabalho, Correa et al. (2015) também reportaram a incapacidade dessas células em secretarem anticorpos quando infectadas isoladamente. Tendo em vista que eles e o trabalho de Silveira et al. (2018) detectaram partículas virais no interior das células B, inclusive em células B isoladas de pacientes infectados, é possível pressupor que a simples entrada do vírus nessas células não é capaz de induzir a diferenciação. Isto sugere que fatores secretados e/ou o contato célula-célula proveniente das demais PBMCs sejam importantes para induzir essa diferenciação na presença do vírus. De fato, células B cultivadas no mesmo poço, porém sem contato direto com as demais contidas nas PBMCs (através de *transwells*) foram capazes de se diferenciarem em ASCs novamente (Figura 32 A-B). Entretanto, com uma menor magnitude que quando cultivadas em contato direto com as demais células (Figura 32 A-B). Em outras palavras, embora os fatores secretados pelas demais células do PBMC possam induzir a diferenciação das células B em ASCs, sem os sinais mediados pelo contato direto célula-célula, a magnitude da diferenciação é muito menor. Cabe ressaltar que esse fato não havia sido explorado até então por nenhum dos outros trabalhos demonstrando a diferenciação de células B mediante infecção por DENV in vitro. Respostas eficazes mediadas por anticorpos são, em geral, promovidas no centro germinativo. Nestes, as células T helper foliculares (FH) são críticas para a formação e manutenção dos mesmos, induzindo a proliferação, diferenciação e troca de isotipo de imunoglobulina nas células B, tanto pelo contato direto célula-célula, quanto pela secreção de citocinas (GATTO; BRINK, 2010). Um estudo recente constatou que o DENV poderia promover a formação de células Tfh *in vitro* e a subsequente produção de anticorpos (SPROKHOLT et al., 2017). Sendo assim, é possível que a perda do contato com as células T nos poços de transwell tenha sido o principal fator responsável pela diminuição da diferenciação em ASCs.

Em seguida, decidimos avaliar o metabolismo celular durante a diferenciação das células B em ASCs induzida por DENV por dois motivos: I) para que possam

exercer sua função efetora, após ativadas, as células B dão início a um intenso processo de reprogramação metabólica. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre as relações entre o metabolismo e como este suporta e até mesmo regula a maturação, ativação e diferenciação das células B (CARO-MALDONADO et al., 2014; WATERS et al., 2018); e II) pacientes com Dengue apresentam maior atividade da enzima Indoleamina 2,3-Dioxigenase (IDO), menores níveis de triptofano (TRP) e maiores níveis de quinurenina (KYN) no soro soros durante os dias febris da doença (BECERRA et al., 2009a), sugerindo que este metabolismo tem um papel na resposta imune mediada por DENV.

O TRP é um aminoácido essencial para a síntese proteica em todas as formas de vida. Além disso, é o percursor de importantes compostos biologicamente ativos, como a serotonina, a melatonina, a KYN, dentre outros (LE FLOC'H; OTTEN; MERLOT, 2011). A via da KYN é a principal via do metabolismo do TRP e participa de diversos processos biológicos, como na modulação do sistema nervoso central, imunoregulação, proteção à exposição ultravioleta etc. (WANG et al., 2015). Inclusive, está diretamente relacionada com a diferenciação de células T (METZ et al., 2014; MEZRICH et al., 2010). Nesta via, o TRP é oxidado constitutivamente pela triptofano 2, 3-dioxigenase (TDO) nas células hepáticas. Nos outros tipos de células, ele é catabolizado pela enzima IDO, induzível sob certas condições fisiopatológicas como estresse, inflamações e infecções (WANG et al., 2015). Após a sua síntese pela IDO, a KYN pode ser metabolizada por diversas outras enzimas, dando origens a compostos com propriedades anti-inflamatórias como o ácido quinurênico (KA, do inglês kynurenic acid) e o ácido antranílico (AA), ou com propriedades inflamatórias como ácido quinolínico (QA, do inglês quinolinic ácid), entre outros com as mais variadas atividades (WANG et al., 2015). Ao avaliarmos nos sobrenadantes das nossas culturas a quantidade de TRP e de seus metabólitos, constatamos que, contrariamente à estimulação por mitógenos, a infecção pelo DENV levou a um aumento no consumo de TRP (Figura 33 A), acompanhado de uma maior síntese de KYN (Figura 33 B) e aumento da expressão gênica de IDO (Figura 42). O que vai de acordo com o reportado no soro de pacientes infectados com DENV (BECERRA et al., 2009b). Ainda, dos metabólitos resultantes da degradação da KYN, houve tanto uma maior formação de QA (Figura 34 A) quanto de KA (Figura 34 B) nesse mesmo grupo.

Já é sabido que infecções virais são capazes de alterar o metabolismo das células hospedeiras (BARDELL, 1977; LEWIS; SCOTT, 1962; MAKINO; JENKIN, 1975). Entretanto, os mecanismos e as consequências das reprogramações metabólicas induzidas por vírus só começaram a ser estudados em detalhes na última década (GRADY et al., 2013; HEATON et al., 2010; JORDAN; RANDALL, 2017; MARTIN-ACEBES et al., 2014; THAI et al., 2015; YU; MAGUIRE; ALWINE, 2014). Curiosamente, algumas das alterações impostas por infecções virais refletem as mesmas alterações metabólicas observadas em células cancerígenas (THAI et al., 2014). Como por exemplo, o efeito Warburg: aumento do metabolismo glicolítico, mesmo na presença de oxigênio, ainda que esse seja menos eficiente para a produção de ATP do que o metabolismo oxidativo (WARBURG; WIND; NEGELEIN, 1927). Além disso, outras alterações metabólicas associadas à tumorigênese e à rápida proliferação celular também são observadas em infecções virais, como a aumentada biossíntese de nucleotídeos e de lipídeos (HEATON et al., 2010; HEATON; RANDALL, 2010; THAI et al., 2014). Inclusive, estudos metabólicos realizados no soro de pacientes infectados pelo DENV revelaram alterações no metabolismo lipídico, em particular nos glicerofosfolipídios e esfingolipídios importantes componentes das membranas celulares (CUI et al., 2013; KHEDR et al., 2016; VOGE et al., 2016) - diretamente associadas com o aumento da permeabilidade endotelial (HUANG et al., 2005). Ainda, embora vários vírus regulem o consumo de nutrientes essenciais como glicose e glutamina e convirjam em vias metabólicas semelhantes de anabolismo, as mudanças metabólicas induzidas por cada vírus podem variar mesmo dentro da mesma família viral ou da célula hospedeira (THAKER; CH'NG; CHRISTOFK, 2019).

Particularmente em relação ao metabolismo do TRP, diversas infecções virais já demonstraram resultar em aumento da atividade de IDO e, quando avaliado, acompanhada de aumento na síntese de KYN. Entre essas, aquelas tidas como crônicas, causadas pelo HIV (BYAKWAGA et al., 2014; JENABIAN et al., 2015), vírus da hepatite B (COZZI et al., 2006), vírus da hepatite C (COZZI et al., 2006), vírus da herpes (REINHARD, 1998) e vírus Epstein-Barr (SONG et al., 2011), bem como aquelas tidas como agudas, causadas pelo vírus da influenza, vírus da encefalite japonesa (ADHYA et al., 2013; YEUNG et al., 2012), vírus do oeste do Nilo (YEUNG et al., 2012), vírus Zika (SUN et al., 2017) e, é claro, DENV (BECERRA et al., 2009a; FIALHO et al., 2017).

Em Dengue, além dos já reportados menores níveis de TRP e maiores níveis de KYN séricos (BECERRA et al., 2009a), avaliações das populações de monócitos circulantes CD14+ CD16+ no sangue de pacientes infectados, relataram uma presença intensa de oxido nítrico sintases (iNOS) e IDO intracelular nessas células (FIALHO et al., 2017). Essa população IDO+ CD14+ CD16+ também foi correlacionada com a concentração de IL-10 circulante (FIALHO et al., 2017), um achado interessante, uma vez que Kwissa et al. (2014) reportaram que esse é um importante fator indutor da diferenciação das ASCs em DENV. Em nosso trabalho a quantificação de KYN nas amostras infectadas com DENV apresentou uma correlação positiva com a enumeração de ASCs vista (Figura 35). Esse fato sugere que, ainda que a diferenciação das células B em ASCs aconteça na mesma magnitude entre o tratamento de PBMCs com mitógenos e a infecção por DENV (Figuras 25 e 26), ela varia metabolicamente entre esses dois estímulos. E mais, que a via do TRP parece estar envolvida de alguma forma nessa diferenciação. De fato, assim como em Dengue, aumento nas concentrações séricas de KYN já foram reportados em outras condições com massiva expansão de ASCs, como casos de mielomas (MARIANI et al., 2013; STEINER et al., 2018). Da mesma forma, pacientes com HIV apresentam tanto aumentos séricos de KYN quanto hiperglobulinemia (um indicativo de ativação anormal das células B), ambas sendo revertidas após terapia anti-retroviral (BYAKWAGA et al., 2014; NOTERMANS et al., 2001).

Embora possa ser questionado se esse achado é causa ou consequência da diferenciação das células B em ASCs, é sabido que, secundário a ativação de IDO, o esgotamento do TRP pode atuar como um potente sinal regulador de vias moleculares de resposta ao estresse, como por exemplo, através da ativação da quinase de não-desreprimível controle geral 2 (GCN2, do inglês General Control Nonderepressible 2) (HINNEBUSCH et al., 2005). Ao detectar a privação desse aminoácido no meio, a GCN2 fosforila o fator de iniciação da tradução eucariótica 2a (eIF2a, do inglês Eukaryotic translation Initiation Factor 2a), ativando-o (FOUGERAY et al., 2012). O elF2α, além de induzir a autofagia (FOUGERAY et al., 2012) – já mencionado anteriormente como capaz de impulsionar a diferenciação de células B em ASCs (ARNOLD et al., 2016) - tem como alvo o fator transcricional Blimp1 (BARNES et al., 2009), essencial na diferenciação das células B em ASCs. O Blimp1 por sua vez, atua como um agente de feedback negativo, reprimindo a expressão de IDO (BARNES et al., 2009). Utilizando dados públicos de transcriptoma, nós

detectamos que tanto a expressão de GCN2 (codificada pelo gene *EIF2AK4*) quanto a expressão de eIF2 $\alpha$  (codificado pelos genes *EIFS1-3*) está aumentada em pacientes com Dengue em relação aos indivíduos saudáveis (**Figura 37**). Ainda, já foi demonstrado que o desenvolvimento e a função das ASCs são comprometidas com a fosforilação deficiente de eIF2 $\alpha$  (MIELKE et al., 2011). Com isso, é possível que as alterações no metabolismo do TRP vistas em Dengue, possam estar colaborando para a diferenciação das células B em ASCs.

Ainda, a KYN é um ligante do receptor aril hidrocarboneto (AhR, do inglês *Aryl hydrocarbon receptor*) (NGUYEN et al., 2014). Embora esse já tenha sido descrito como um importante imunossupressor (NGUYEN et al., 2014), capaz de bloquear a diferenciação das células B em ASCs (VAIDYANATHAN et al., 2017), em nossas análises de dados públicos de transcriptoma, sua expressão estava diluída nos pacientes infectados em relação aos controles (**Figura 37**). Outro grupo também reportou menores expressões de AhR em pacientes com Dengue (OLIVEIRA et al., 2018). Curiosamente, uma proteína do vírus Epstein-Barr, a EBNA3, foi descrita como capaz de interagir com o AhR, levando a sua ativação (KASHUBA et al., 2006), demonstrado, assim, a habilidade de certos vírus em modular a mesma. Entretanto, se o DENV é capaz de interferir antagonicamente com o AhR, ainda não foi descrito.

Embora outros vírus tenham sido descritos como capazes de induzir o metabolismo do TRP em KYN, não há relatos que esses induzam uma diferenciação massiva em ASCs como o DENV. Em nosso estudo, culturas de PBMCs infectadas por dois diferentes isolados clínicos de ZIKV e a cepa vacinal da YFV, de fato não foram capazes de alcançar as magnitudes de diferenciação obtidas nas infecções pelo DENV (**Figura 38 A**). Estas, também não apresentaram qualquer correlação entre a produção de KYN e a enumeração de ASCs, diferentemente do DENV (**Figura 38 B**-**E**). É possível que nestas, a quantidade de KYN gerada seja inferior a aquelas geradas durante a infecção pelo DENV. Em concordância com essa hipótese, infecções pelo vírus Epstein-Barr induzem ativações de IDO muito inferiores à aquelas vistas em tumores (LIU et al., 2014).

Em nosso trabalho nós tentamos avaliar o perfil de expressão de genes relacionados com a diferenciação de células B em ASCs em células B (CD19+) isoladas de pacientes infectados pelo DENV (**Figuras 44** a **46**). Entretanto, não detectamos nem a expressão dos fatores de transcrição chaves para a diferenciação *IRF4* e *PRDM1* (**Figura 44**), nem de genes descritos na literatura como mais

expressos durante a Dengue, como *STAT3* e *SYK* (**Figura 45**). Esses achados sugerem que nessas amostras as ASCs não estavam presentes após o isolamento por citometria de fluxo. Exitem duas possibilidades para isto: a primeira, e mais provável, é que o congelamento tenha impactado na viabilidade das ASCs e estas tenham sido descartadas durante o processo de isolamento (por não estarem viáveis). A perda da viabilidade em mais de mais de 70% ASCs viáveis após o congelamento já foi demonstrada (KYU et al., 2009). Isso, somado ao fato de termos iniciado nossos ensaios com um número relativamente baixo de PBMCs, pode explicar a completa ausência de expressão de alguns genes testados e a menor expressão de outros nos pacientes com Dengue em relação aos indivíduos controle. A segunda hipótese é que o momento de coleta dessas amostras tenha sido anterior a presença dessas células na circulação.

Por fim, apesar das limitações, nosso trabalho trouxe novas percepções sobre como a resposta imune humoral é regulada durante a infecção pelo DENV, particularmente sobre como o metabolismo e a sinalização das células B estão conectados nesse processo. Ainda, este trabalho abre perspectivas para uma série de estudos futuros direcionados à melhor compreensão dos mecanismos aqui descritos.

#### 7. CONCLUSÕES



Figura 48 – Principais fatores hipoteticamente envolvidos na diferenciação de células B em ASCs durante a infecção pelo vírus da Dengue abordados nesse trabalho. Principais resultados encontrados nesse trabalho. Dados em vermelho foram avaliados *in vitro*. Dados em preto foram avaliados *in silico*. Setas indicam indução. Linhas seguidas de barra indicam repressão.

A utilização de ferramentas *in silico* foi fundamental para o *screening* de moléculas potencialemente envolvidas no processo de massiva diferenciação de células B em ASCs durante infecção pelo DENV.

A construção de uma hipotética via de diferenciação de células B em ASCs durante infecção pelo DENV, combinando dados públicos de transcriptoma, demonstrou que moléculas relacionadas a via do STAT3, sejam *upstream* (IL-10 e IL-6) ou *downstream* (IRF4 e BLIMP1 – chave no processo de diferenciação em ASCs), apresentam sua expressão aumentada nos indivíduos com DF. Ainda, moléculas que respondem aos sinais de cálcio, como a Calcineurina (também responsável por modular negativamente o STAT3) e as moléculas NFATC1, DOK3 e GRB2 apresentaram sua expressão reduzida nos pacientes infectados. Já moléculas encontradas *in silico* por mineração de dados textuais também possuem grande associação com a ativação da via NF-kB/STAT3.

Células B presentes nas PBMCs são capazes de se diferenciarem em ASCs (com aquisição de fenótipo e função) mediante tratamento com mitógenos ou infecção pelo DENV em mesma magnitude. Essa diferenciação não está correlacionada com a exposição prévia ao vírus por parte dos doadores das amostras e não parece ter associação com o sexo dos mesmos. Ainda, para que a diferenciação possa ocorrer nessa magnitude, a viabilidade viral é importante, uma vez que a inativação do vírus por UV-prejudica a mesma. Entretanto, não conseguimos estabelecer uma correlação entre a diferenciação e a carga viral, uma vez que esta foi indetectável no sétimo dia de cultura.

Por outro lado, quando isoladas, as células B não são capazes de se diferenciarem em ASCs após infecção pelo DENV, independente do MOI utilizado. Esse estado pode ser parcialmente revertido quando as células B são cultivadas na presença de fatores secretados pelas demais células das PBMCs infectadas. Porém, sem o contato célula-célula, a magnitude da resposta é prejudicada.

PBMCs infectadas por DENV apresentam aumentada expressão de IL-10 e BAFF em relação ao controle e as culturas estimuladas com mitógenos, suportando a hipótese da literatura de que essas moléculas estariam colaborando com a massiva expansão de ASCs em Dengue.

Assim como visto em pacientes, culturas de PBMCs infectadas por DENV apresentam um maior consumo de triptofano, associado a maior expressão de IDO e maior síntese de quinurenina. Ainda, as concentrações de quinurenina estão positivamente correlacionadas com a enumeração de ASCs nessa cultura. Em contrapartida, o tratamento dessas células com mitógenos não induz esse mesmo perfil metabólico. Esses dados sugerem que não apenas o metabolismo do triptofano participe diretamente da indução da diferenciação das células B em ASCs durante a Dengue, mas também que a diferenciação em ASCs pode ocorrer por vias metabólicas distintas.

Por fim, outros flavivírus que induzem baixa resposta de ASCs *in vivo*, como o ZIKV e a cepa vacinal da YFV não induziram a mesma magnitude de diferenciação das células B em ASCs *in vitro* como a vista com o DENV. Tão pouco apresentaram correlação entre a enumeração de ASCs e a síntese de quinurenina. Suportando dessa forma, a hipótese da literatura de que essa seja uma característica exclusiva do DENV.

133

# 8. ASPECTOS ÉTICOS

### CAAE Nº: 68875417.9.0000.0067

Brazil			
Correction of the second se	Informe o E-mail	Informe a Senha	LOGIN
		Esqueceu a senha?	<u>Cadastre-se</u> v
cê está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalha DETALHAR PROJETO DE PESQUISA	n Projeto de Pesquisa		
- DADOS DO PROJETO DE PESQUISA			
Título Público: Sinalização de linfócitos B derivados de pac Pesquisador Responsável: EDUARDO LANI VOLPE DA S Contato Público: EDUARDO LANI VOLPE DA SILVERA Condições de saúde ou problemas estudados: Descritores CID - Gerais: Descritores CID - Gerais: Descritores CID - da Intervenção: Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 13/12/2017	cientes infectados com o vírus da Dengue SILVEIRA	C	COORDENADOR
- DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
Nome da Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêutica Cidade: SÃO PAÚLO	is da Universidade de São Paulo		
- DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA			
Comité de Ética Responsável: 87 - USP - Faculdade de C Enderepo: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112 Telefone: (11)3091-3622 E-mail: ceptcf@usp.br	iências Farmacêuticas da Universidade de São 2	Paulo - FCF/USP	
- CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PES	SQUISA		
- CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE I	PESQUISA		
Nome: Hospital Universitário da Universidade de São Paul Cidade: SÃO PAULO	lo		
Voltar			
DATACHC F	ste sistema foi desenvolvido para o navegador N	<b>tozilla Firefox.</b> Conselho	sus <b>"</b> ta- M

Para o manuseio e descarte das amostras de sangue dos pacientes envolvidos na pesquisa, foram utilizadas as normas de biossegurança e descarte de resíduos biológicos infectantes adotados pela FCF/USP.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHISHEK, K. S. et al. Association of interleukin-2, -4 and -10 with dengue severity. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 66–69, 1 jan. 2017.

ACKERMANN, J. A. et al. Syk Tyrosine Kinase Is Critical for B Cell Antibody Responses and Memory B Cell Survival. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 10, p. 4650–4656, 15 maio 2015.

ADHYA, D. et al. Histone deacetylase inhibition by Japanese encephalitis virus in monocyte/macrophages: A novel viral immune evasion strategy. **Immunobiology**, v. 218, n. 10, p. 1235–1247, out. 2013.

AGARWAL et al. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 80, n. 3, p. 143–149, 25 dez. 2001.

AHMED, N. H.; BROOR, S. Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase. **Journal of vector borne diseases**, v. 51, n. 3, p. 194–9, set. 2014.

ALINIKULA, J. et al. Alternate pathways for Bcl6-mediated regulation of B cell to plasma cell differentiation. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 8, p. 2404–2413, ago. 2011.

ALLMAN, D. M.; CANCRO, M. P. **pERKing up the BLIMP in plasma cell differentiationScience Signaling**, 19 abr. 2011.

ALLONSO, D. et al. Assessing Positivity and Circulating Levels of NS1 in Samples from a 2012 Dengue Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113634, 20 nov. 2014.

ANDERS, K. L. et al. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 1, p. 127–34, jan. 2011.

ANDERSON, S. J.; LAWTON, A. R. LPS augments human B-cell differentiation by direct stimulation of PWM-responsive B cells. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 44, n. 3, p. 259–271, set. 1987.

ANSAR AHMED, S.; KARPUZOGLU, E.; KHAN, D. Effects of sex steroids on innate and adaptive immunity. In: **Sex Hormones and Immunity to Infection**. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. p. 19–51.

APPANNA, R. et al. Cross-Reactive T-Cell Responses to the Nonstructural Regions of Dengue Viruses among Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Patients in Malaysia. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 8, p. 969–977, 1 ago. 2007.

ARNOLD, J. et al. Autophagy is dispensable for B-cell development but essential for humoral autoimmune responses. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 5, p. 853–864, 1 maio 2016.

AVERY, D. T. et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 1, p. 155–71, 18 jan. 2010.

AVIRUTNAN, P. et al. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to

chemokine production, complement activation, and apoptosis. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), v. 161, n. 11, p. 6338–46, 1 dez. 1998.

AZEREDO, E. L. et al. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 437–449, 2006.

BACHAL, R. et al. Higher levels of dengue-virus-specific IgG and IgA during predefervescence associated with primary dengue hemorrhagic fever. **Archives of Virology**, v. 160, n. 10, p. 2435–2443, 30 out. 2015.

BAI, D.; UENO, L.; VOGT, P. K. Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 12, p. 2863–2870, 15 dez. 2009.

BANCHEREAU, J.; LEBECQUE, S.; LIU, W. Immunobiology of Dendritic Cells Vaccine Adjuvants View project Cell tracking by MRI View project. **Article in Annual Review of Immunology**, 2000.

BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V.; O'GARRA, A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. **Nature immunology**, v. 13, n. 10, p. 925–31, out. 2012.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245–252, 1998.

BANDINI, C. et al. IRF4 mediates the oncogenic effects of STAT3 in anaplastic large cell lymphomas. **Cancers**, v. 10, n. 1, 18 jan. 2018.

BARDELL, D. Glucose uptake and lactic acid production of adenovirus type 5-infected HEp-2 cells cultured under exponential growth and stationary phase conditions. **Microbios**, v. 20, n. 81–82, p. 139–44, 1977.

BARDINA, S. V. et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antiflavivirus immunity. **Science**, v. 356, n. 6334, p. 175–180, 14 abr. 2017.

BARNES, N. A. et al. Amino Acid Deprivation Links BLIMP-1 to the Immunomodulatory Enzyme Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5768–5777, 1 nov. 2009.

BARON, A. P. et al. Probing the catalytic functions of Bub1 kinase using the small molecule inhibitors BAY-320 and BAY-524. **eLife**, v. 5, 17 fev. 2016.

BARWICK, B. G. et al. Plasma cell differentiation is coupled to division-dependent DNA hypomethylation and gene regulation. **Nature Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1216–1225, 8 out. 2016.

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, 2009a.

BECERRA, A. et al. Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. **The Journal of general virology**, v. 90, n. Pt 4, p. 810–7, abr. 2009b.

BELLADONNA, M. L. et al. Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 8, p. 5194–8, 15 out. 2008.

BENHAMRON, S. et al. mTOR Activation Promotes Plasma Cell Differentiation and

Bypasses XBP-1 for Immunoglobulin Secretion. **Molecular and Cellular Biology**, v. 35, n. 1, p. 153–166, 1 jan. 2015.

BENNETT, S. N. et al. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 4, p. 811–8, abr. 2010.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 7 abr. 2013.

BLANKLEY, S. et al. The application of transcriptional blood signatures to enhance our understanding of the host response to infection: the example of tuberculosis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 369, n. 1645, p. 20130427, 2014.

BON, A. LE et al. Cutting Edge: Enhancement of Antibody Responses Through Direct Stimulation of B and T Cells by Type I IFN. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 4, p. 2074–2078, 15 fev. 2006.

BORGES, M. B. et al. Detection of post-vaccination enhanced dengue virus infection in macaques: An improved model for early assessment of dengue vaccines. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007721, 1 abr. 2019.

BRADY, C. A.; ATTARDI, L. D. p53 at a glanceJournal of Cell Science, 1 ago. 2010.

BRAUN, D.; CARAMALHO, I.; DEMENGEOT, J. IFN- $\alpha/\beta$  enhances BCR-dependent B cell responses. **International Immunology**, v. 14, n. 4, p. 411–419, 1 abr. 2002.

BRIÈRE, F. et al. Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. **The Journal of clinical investigation**, v. 94, n. 1, p. 97–104, jul. 1994.

BYAKWAGA, H. et al. The kynurenine pathway of tryptophan catabolism, CD4+ T-cell recovery, and mortality among HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 3, p. 383–91, 1 ago. 2014.

CAI, B. et al. FOSL1 inhibits type i interferon responses to malaria and viral infections by blocking TBK1 and TRAF3/ TRIF interactions. **mBio**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2017.

CALAMITO, M. et al. Akt1 and Akt2 promote peripheral B-cell maturation and survival. **Blood**, v. 115, n. 20, p. 4043–50, 20 maio 2010.

CARO-MALDONADO, A. et al. Metabolic Reprogramming Is Required for Antibody Production That Is Suppressed in Anergic but Exaggerated in Chronically BAFF-Exposed B Cells. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3626–3636, 15 abr. 2014.

CARTER, M. J. et al. The Antibody-Secreting Cell Response to Infection: Kinetics and Clinical Applications. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 630, 1 jun. 2017.

CHAKRAVARTI, A.; KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 1, p. 25–30, jan. 2006.

CHAMBERS, K. J. et al. Identification and cloning of a sequence homologue of dopamine  $\beta$ -hydroxylase. **Gene**, v. 218, n. 1–2, p. 111–120, 18 set. 1998.

CHANG, T. H. et al. Dengue virus serotype 2 blocks extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- $\kappa$ B activation to downregulate cytokine production. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 22 ago. 2012.

CHANGAL, K. H. et al. Differentiating Secondary From Primary Dengue Using IgG to IgM Ratio in Early Dengue. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.

CHATURVEDI, U. C. et al. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 183–8, jul. 2000.

CHEADLE, C. et al. Analysis of microarray data using Z score transformation. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 73–81, 2003.

CHEN, H.-H. et al. AR-12 suppresses dengue virus replication by down-regulation of PI3K/AKT and GRP78. **Antiviral research**, v. 142, p. 158–168, 2017.

CHIEN, Y.-W. et al. Prolonged persistence of IgM against dengue virus detected by commonly used commercial assays. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 156, 2018.

CHONG, P. S. Y.; CHNG, W. J.; DE MEL, S. **STAT3: A promising therapeutic target** in multiple myelomaCancersMDPI AG, , 1 maio 2019.

CHU, Y. et al. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. **Blood**, v. 117, n. 7, p. 2227–2236, 17 fev. 2011.

CHU, Y. T. et al. Antibodies against nonstructural protein 1 protect mice from dengue virus-induced mast cell activation. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 5, p. 602–614, 1 maio 2017.

CHUA, J. J.-E. et al. Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3 $\beta$  protein. **Virus Research**, v. 112, n. 1–2, p. 85–94, 1 set. 2005.

COFFRE, M.; KORALOV, S. B. miRNAs in B Cell Development and Lymphomagenesis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 8, p. 721–736, ago. 2017.

COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 853–859, 15 jan. 2005.

COLPITTS, T. M. et al. Dengue Virus Capsid Protein Binds Core Histones and Inhibits Nucleosome Formation in Human Liver Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24365, 1 set. 2011.

CORO, E. S.; CHANG, W. L. W.; BAUMGARTH, N. Type I IFN Receptor Signals Directly Stimulate Local B Cells Early following Influenza Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 7, p. 4343–4351, 1 abr. 2006.

CORREA, A. R. V. et al. Dengue virus directly stimulates Polyclonal B cell activation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.

COX, J. et al. Mosquito Bite Delivery of Dengue Virus Enhances Immunogenicity and Pathogenesis in Humanized Mice. **Journal of Virology**, v. 86, n. 14, p. 7637–7649, 15 jul. 2012.

COZZI, A. et al. Low serum tryptophan levels, reduced macrophage IDO activity and high frequency of psychopathology in HCV patients. **Journal of viral hepatitis**, v. 13, n. 6, p. 402–8, jun. 2006.

CRABTREE, G. R.; SCHREIBER, S. L. SnapShot: Ca2+-calcineurin-NFAT signaling. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 210, 210.e1, 10 jul. 2009.

CROTTY, S. Follicular Helper CD4 T Cells (T FH ). Annual Review of Immunology,

v. 29, n. 1, p. 621–663, 23 abr. 2011.

CUI, L. et al. Serum Metabolome and Lipidome Changes in Adult Patients with Primary Dengue Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

CUI, L. et al. Serum Metabolomics Reveals Serotonin as a Predictor of Severe Dengue in the Early Phase of Dengue Fever. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004607, 7 abr. 2016.

DAVIES, A. J. et al. The mitotic response of thymus-derived cells to antigenic stimulus. **Transplantation**, v. 4, n. 4, p. 438–51, jul. 1966.

DAWSON, C. W. et al. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway to Promote Cell Survival and Induce Actin Filament Remodeling<sup>\*</sup>. 2002.

DAY, C. J. et al. Gene array identification of osteoclast genes: Differential inhibition of osteoclastogenesis by cyclosporin A and granulocyte macrophage colony stimulating factorJournal of Cellular Biochemistry, 2004.

DE KRUIF, M. D. et al. Differential gene expression changes in children with severe dengue virus infections. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 4, p. e215, 9 abr. 2008.

DE LA CRUZ HERNÁNDEZ, S. I. et al. Primary dengue virus infections induce differential cytokine production in Mexican patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 161–167, 1 mar. 2016.

DE LIMA, D. S. et al. Long noncoding RNAs are involved in multiple immunological pathways in response to vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201822046, 9 ago. 2019.

DE SILVA, N. S.; KLEIN, U. Dynamics of B cells in germinal centres. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 137–148, 6 mar. 2015.

DE WEERD, N. A.; NGUYEN, T. The interferons and their receptors-distribution and regulation. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 5, p. 483–491, 1 maio 2012.

DEAGLIO, S. et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 2146–2155, 15 set. 2003.

DEJNIRATTISAI, W. et al. A Complex Interplay among Virus, Dendritic Cells, T Cells, and Cytokines in Dengue Virus Infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 5865–5874, 1 nov. 2008.

DEJNIRATTISAI, W. et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. **Nature Immunology**, v. 16, n. 2, p. 170–177, 15 fev. 2015.

DENARO, N.; MERLANO, M. C.; LO NIGRO, C. Long noncoding RNAs as regulators of cancer immunityMolecular OncologyJohn Wiley and Sons Ltd., , 1 jan. 2019.

DEVIGNOT, S. et al. Genome-Wide Expression Profiling Deciphers Host Responses Altered during Dengue Shock Syndrome and Reveals the Role of Innate Immunity in Severe Dengue. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11671, 20 jul. 2010.

DICK, G. W. A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DIEHL, S. A. et al. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 Is coordinated with BCL6

down-regulation to control human plasma cell differentiation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 7, p. 4805–15, 1 abr. 2008.

DONALD, C. L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, 5 out. 2016.

DU, W.; STAUFFER, M. E.; EICHMAN, B. F. Structural biology of replication initiation factor Mcm10. **Sub-cellular biochemistry**, v. 62, p. 197–216, 2012.

DUFORT, F. J. et al. Glucose-dependent de novo lipogenesis in B lymphocytes: a requirement for atp-citrate lyase in lipopolysaccharide-induced differentiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 10, p. 7011–24, 7 mar. 2014.

DUMONT, N. et al. Increased secretion of hyperimmune antibodies following lipopolysaccharide stimulation of CD40-activated human B cells in vitro. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 588–95, abr. 2009.

EL SAHILI, A.; LESCAR, J. Dengue Virus Non-Structural Protein 5. **Viruses**, v. 9, n. 4, p. 91, 24 abr. 2017.

ELLEBEDY, A. H. et al. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. **Nature Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1226–1234, 15 out. 2016.

ERGÖNÜL, Ö. et al. Cytokine response in crimean-congo hemorrhagic fever virus infection. **Journal of medical virology**, v. 89, n. 10, p. 1707–1713, 2017.

ESFANDIAREI, M. et al. Protein Kinase B/Akt Regulates Coxsackievirus B3 Replication through a Mechanism Which Is Not Caspase Dependent. **Journal of Virology**, v. 78, n. 8, p. 4289–4298, 15 abr. 2004.

FARES, R. C. G. et al. **Epidemiological Scenario of Dengue in BrazilBioMed Research International**Hindawi Limited, , 2015.

FENGLING, M. et al. Influx of extracellular calcium participates in rituximab-enhanced ionizing radiation-induced apoptosis in Raji cells. **Toxicology letters**, v. 209, n. 3, p. 221–6, 25 mar. 2012.

FENSTERL, V.; CHATTOPADHYAY, S.; SEN, G. C. No Love Lost Between Viruses and Interferons. **Annual Review of Virology**, v. 2, n. 1, p. 549–572, 9 nov. 2015.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. **Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using** and Abusing the Host CellCell Host and Microbe, 23 abr. 2009.

FERRAZ, F. O. et al. Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 41–46, 1 set. 2013.

FIALHO, L. G. et al. Induced nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2,3dioxygenase (IDO) detection in circulating monocyte subsets from Brazilian patients with Dengue-4 virus. **Virology Reports**, v. 7, p. 9–19, 1 jun. 2017.

FIETTA, P.; COSTA, E.; DELSANTE, G. Interleukins (ILs), a fascinating family of cytokines. Part I: ILs from IL-1 to IL-19. **Theoretical biology forum**, v. 107, n. 1–2, p. 13–45, 2014.

FORNEK, J. L. et al. Critical role for Stat3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1085–91, 1 fev. 2006.

FOUGERAY, S. et al. Tryptophan Depletion and the Kinase GCN2 Mediate IFN-y-

Induced Autophagy. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2954–2964, 15 set. 2012.

FRANKENBERGER, M. et al. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 373–7, 1 jan. 1996.

FREDERICK, J. P. et al. Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 6, p. 2546–59, mar. 2004.

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.

GATTO, D.; BRINK, R. The germinal center reactionJournal of Allergy and Clinical Immunology, nov. 2010.

GENESTIER, L. et al. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 12, p. 7779–86, 15 jun. 2007.

GOMES, A. V. B. T. et al. Demethylation profile of the TNF- $\alpha$  promoter gene is associated with high expression of this cytokine in *Dengue virus* patients. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 8, p. 1297–1302, ago. 2016.

GOMES, A. L. V et al. Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e11267, 23 jun. 2010.

GRADY, S. L. et al. Argininosuccinate synthetase 1 depletion produces a metabolic state conducive to herpes simplex virus 1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 51, p. E5006–E5015, 17 dez. 2013.

GRAMMATIKOS, A. P. et al. Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Regulates Systemic Lupus Erythematosus (SLE) T Cell Signaling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 27 ago. 2013.

GRANATO, A. et al. IL-4 Regulates Bim Expression and Promotes B Cell Maturation in Synergy with BAFF Conferring Resistance to Cell Death at Negative Selection Checkpoints. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5761–5775, 15 jun. 2014.

GREEN, A. M. et al. Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 6, p. 1148–1160, 20 mar. 2014.

GREENHILL, C. J. et al. IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 2, p. 1199–208, 15 jan. 2011.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 1, p. 11–9, fev. 2010.

GRÖTSCH, B. et al. The AP-1 transcription factor Fra1 inhibits follicular B cell differentiation into plasma cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 11, p. 2199–2212, 2014.

GUBLER, D. J. et al. Virological surveillance for dengue haemorrhagic fever in Indonesia using the mosquito inoculation technique. **Bulletin of the World Health** 

#### **Organization**, v. 57, n. 6, p. 931–936, 1979.

GUÉRY, J. C.; ADORINI, L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 154, n. 2, p. 536–44, 15 jan. 1995.

GUO, M. et al. EZH2 Represses the B Cell Transcriptional Program and Regulates Antibody-Secreting Cell Metabolism and Antibody Production. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 200, n. 3, p. 1039–1052, 2018.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. S12, p. S7–S16, dez. 2010.

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 infectionArchives of Virology, jul. 2013.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 31 jan. 2015.

HALSTEAD, S. B.; PORTERFIELD, J. S.; O'ROURKE, E. J. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 4, p. 638–642, 1980.

HARKER, J. A. et al. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. **Science**, v. 334, n. 6057, p. 825–829, 11 nov. 2011.

HATCH, S. et al. Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 9, p. 1282–1291, 1 maio 2011.

HAY, S.; KANNOURAKIS, G. A time to kill: Viral manipulation of the cell death programJournal of General VirologySociety for General Microbiology, , 2002.

HE, D. et al. Aberrant gene promoter methylation of p16, FHIT, CRBP1, WWOX, and DLC-1 in Epstein–Barr virus-associated gastric carcinomas. **Medical Oncology**, v. 32, n. 4, p. 92, 27 abr. 2015.

HE, X.-S. et al. Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. **Journal of immunological methods**, v. 365, n. 1–2, p. 67–75, 28 fev. 2011.

HE, Y. et al. Subversion of Cell Signaling Pathways by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein via Interaction with Grb2 and P85 Phosphatidylinositol 3-Kinase Downloaded from. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 76, n. 18, p. 9207–9217, 2002.

HEALTHMAP.DengueMap.Disponívelem:<https://www.healthmap.org/dengue/pt/>.Acesso em: 7 ago. 2019.

HEATON, N. S. et al. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 40, p. 17345–17350, 5 out. 2010.

HEATON, N. S.; RANDALL, G. Dengue Virus-Induced Autophagy Regulates Lipid Metabolism. **Cell Host & Microbe**, v. 8, n. 5, p. 422–432, 18 nov. 2010.

HEER, A. K. et al. TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cell responses without regulating effector T cell responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**,

v. 178, n. 4, p. 2182–91, 15 fev. 2007.

HEINE, G. et al. Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 6, p. 1615–1621, 2014.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 1, 8 mar. 2017.

HEISE, N. et al. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF-κB transcription factor subunits. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 10, p. 2103–2118, 2014.

HINNEBUSCH, A. G. et al. TRANSLATIONAL REGULATION OF GCN4 AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEASTSuppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 407–450, 2005.

HIRANO, T. et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 16, p. 5490–5494, 1985.

HISCOTT, J.; KWON, H.; GÉNIN, P. Hostile takeovers: Viral appropriation of the **NF-kB pathwayJournal of Clinical Investigation**The American Society for Clinical Investigation, , 2001.

HO, L.-J. et al. Infection of Human Dendritic Cells by Dengue Virus Causes Cell Maturation and Cytokine Production. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1499–1506, 1 fev. 2001.

HO, L.-J. et al. Dengue Virus Type 2 Antagonizes IFN- $\alpha$  but Not IFN- $\gamma$  Antiviral Effect via Down-Regulating Tyk2-STAT Signaling in the Human Dendritic Cell. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 8163–8172, 15 jun. 2005.

HOBER, D. et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 3, p. 324–331, 1993.

HOFFMANN, A.; BALTIMORE, D. Circuitry of nuclear factor κB signalingImmunological Reviews, abr. 2006.

HOSSAIN, H.; CHAKRABORTY, T. [Microarray-based transcriptome analyses in infectious diseases. A new diagnostic method]. **Der Internist**, v. 47 Suppl 1, p. S6, S8-13, jun. 2006.

HOU, W. et al. Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function. **Journal of virology**, v. 88, n. 15, p. 8479–89, ago. 2014.

HU, J. et al. Interleukin-6 Drives Multiple Myeloma Progression By up-Regulating of CD147/Emmprin Expression. **Blood**, v. 128, n. 22, 2016.

HU, Y. L. et al. The inhibiting effect of the transcription factor p53 on dengue virus infection by activating the type I interferon. **Oncotarget**, v. 8, n. 15, p. 25151–25157, 2017.

HUANG, F. et al. Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: role of PKCalpha and RhoA cross talk. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 289, n. 2, p. L176-85, ago. 2005.

IGARASHI, K. et al. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. **Immunological Reviews**, v. 261, n. 1, p. 116–125, set. 2014.

IGARASHI, K.; OCHIAI, K.; MUTO, A. Architecture and Dynamics of the Transcription Factor Network that Regulates B-to-Plasma Cell Differentiation. **Journal of Biochemistry**, v. 141, n. 6, p. 783–789, 27 mar. 2007.

INFANTINO, S. et al. The tyrosine kinase Lyn limits the cytokine responsiveness of plasma cells to restrict their accumulation in mice. **Science Signaling**, v. 7, n. 338, 12 ago. 2014.

J.M., G.; W.W., O. Dengue fever mimicking plasma cell leukemia. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, v. 127, n. 8, p. 1026–1027, 2003.

JELLUSOVA, J.; RICKERT, R. C. A Brake for B Cell Proliferation. **BioEssays**, v. 39, n. 11, p. 1700079, 1 nov. 2017.

JENABIAN, M.-A. et al. Immunosuppressive Tryptophan Catabolism and Gut Mucosal Dysfunction Following Early HIV Infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 212, n. 3, p. 355–66, 1 ago. 2015.

JESSIE, K. et al. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 15 abr. 2004.

JOHN, S. A. et al. Ets-1 regulates plasma cell differentiation by interfering with the activity of the transcription factor blimp-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 2, p. 951–962, 11 jan. 2008.

JORDAN, T. X.; RANDALL, G. Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis To Stimulate a Proviral Lipophagy. **Journal of Virology**, v. 91, n. 11, 1 jun. 2017.

JUFFRIE, M. et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 1, p. 70–5, jul. 2001.

KAILEH, M.; SEN, R. **NF-κB function in B lymphocytesImmunological Reviews**, mar. 2012.

KALLIES, A. et al. Initiation of Plasma-Cell Differentiation Is Independent of the Transcription Factor Blimp-1. **Immunity**, v. 26, n. 5, p. 555–566, maio 2007.

KANE, L. P. et al. Induction of NF-κB by the Akt/PKB kinase. **Current Biology**, v. 9, n. 11, p. 601–604, 3 jun. 1999.

KANWAL, F. et al. Interleukin-6: A promising disease severity index for dengue virus infection Asian Pacific Journal of Tropical Disease. **Asian Pac J Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. 266–269, 2017.

KASHUBA, E. V. et al. Regulation of transactivation function of the aryl hydrocarbon receptor by the Epstein-Barr virus-encoded EBNA-3 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 1215–1223, 13 jan. 2006.

KEHRL, J. H. et al. Further studies of the role of transforming growth factor-beta in human B cell function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 143, n. 6, p. 1868–74, 15 set. 1989.

KEHRL, J. H. et al. Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146,

n. 11, p. 4016–23, 1 jun. 1991.

KEKOW, J. et al. Transforming growth factor  $\beta$  and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 21, p. 8321–8325, 1990.

KELSALL, B. L. et al. Dendritic cells at the host-pathogen interface. **Nature Immunology**, v. 3, n. 8, p. 699–702, ago. 2002.

KENNETH J. LIVAKA; SCHMITTGENB; THOMAS. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2-\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

KEYSE, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancerCancer and Metastasis Reviews, jun. 2008.

KHADKA, S. et al. A Physical Interaction Network of Dengue Virus and Human Proteins\* 

S Downloaded from. 2011.

KHEDR, A. et al. Phospholipidomic identification of potential serum biomarkers in dengue fever, hepatitis B and hepatitis C using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1009–1010, p. 44–54, 15 jan. 2016.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–14, 20 jul. 2016.

KIEFER, K. et al. Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. **Immunology and cell biology**, v. 90, n. 5, p. 498–504, maio 2012.

KIKUCHI, H. et al. GCN5 is essential for IRF-4 gene expression followed by transcriptional activation of Blimp-1 in immature B cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 3, p. 399–404, mar. 2014.

KIM, H. et al. Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 8, p. 2940–2954, 1 ago. 2012.

KIM, N. S. et al. Chimeric vaccine stimulation of human dendritic cell indoleamine 2, 3dioxygenase occurs via the non-canonical NF-kB pathway. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2016.

KLEIN, B. et al. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. **International journal of hematology**, v. 78, n. 2, p. 106–13, ago. 2003.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Publishing Group**, v. 16, 2016.

KOPANTZEV, Y. et al. IL-6 mediated activation of STAT3 bypasses Janus kinases in terminally differentiated B lineage cells. **Oncogene**, v. 21, n. 44, p. 6791–800, 3 out. 2002.

KOPF, M. et al. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 10, p. 1895–1906, 16 nov. 1998.

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. 4332–8, dez. 2001.

KORAKA, P. et al. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. **Journal of medical virology**, v. 70, n. 1, p. 91–8, maio 2003.

KOSMO, M. A.; GALE, R. P. Plasma cell leukemia. **Seminars in hematology**, v. 24, n. 3, p. 202–8, jul. 1987.

KRSTIĆ, J. et al. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: Implications in tumorigenesis and cancer progression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

KUCHIPUDI, S. V. The Complex Role of STAT3 in Viral InfectionsJournal of Immunology ResearchHindawi Publishing Corporation, , 2015.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–25, 8 mar. 2002.

KULIS, M. et al. Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. **Nature Genetics**, v. 47, n. 7, p. 746–756, 8 jul. 2015.

KUMANOGOH, A. et al. Impairment of antigen-specific antibody production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of gp130. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2478–2482, 18 mar. 1997.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, 14 jan. 2011.

KUNG, C.-P.; MECKES, D. G.; RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr virus LMP1 activates EGFR, STAT3, and ERK through effects on PKCdelta. **Journal of virology**, v. 85, n. 9, p. 4399–408, maio 2011.

KUO, T.-M. et al. HBV replication is significantly reduced by IL-6. Journal of biomedical science, v. 16, p. 41, 20 abr. 2009.

KUTTY, R. G. et al. Dual specificity phosphatase 5-substrate interaction: A mechanistic perspective. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 4, p. 1449–1461, 1 out. 2017.

KUTUBUDDIN, M. et al. Recognition of helper T cell epitopes in envelope (E) glycoprotein of japanese encephalitis, West Nile and Dengue viruses. **Molecular Immunology**, v. 28, n. 1–2, p. 149–154, jan. 1991.

KWISSA, M. et al. Dengue virus infection induces expansion of a CD14+CD16+monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. **Cell Host and Microbe**, v. 16, n. 1, p. 115–127, 2014.

KYU, S. Y. et al. Frequencies of human influenza-specific antibody secreting cells or plasmablasts post vaccination from fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 340, n. 1, p. 42–47, 1 jan. 2009.

LAUDER, S. N. et al. Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology. **European journal of immunology**, v. 43, n. 10, p. 2613–25, out. 2013.

LE FLOC'H, N.; OTTEN, W.; MERLOT, E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applicationsAmino Acids, nov. 2011.

LE GALLOU, S. et al. IL-2 Requirement for Human Plasma Cell Generation: Coupling Differentiation and Proliferation by Enhancing MAPK–ERK Signaling. **The Journal of** 

Immunology, v. 189, n. 1, p. 161–173, 1 jul. 2012.

LEE, C.-J.; LIAO, C.-L.; LIN, Y.-L. Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8388–8399, 1 jul. 2005.

LELIGDOWICZ, A. et al. Direct Relationship between Virus Load and Systemic Immune Activation in HIV-2 Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 1, p. 114–122, jan. 2010.

LEWIS, V. J.; SCOTT, L. V. Nutritional requirements for the production of herpes simplex virus. I. Influence of glucose and glutamine of herpes simplex virus production by HeLa cells. **Journal of bacteriology**, v. 83, p. 475–82, mar. 1962.

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. TGF-β: A Master of All T Cell TradesCell, 8 ago. 2008.

LIANG, Z. et al. Activation of Toll-like receptor 3 impairs the dengue virus serotype 2 replication through induction of IFN- $\beta$  in cultured hepatoma cells. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23346, 2011.

LIBRATY, D. H. et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 9, p. 1213–21, 1 maio 2002.

LIN, J.-C. et al. Dengue Viral Protease Interaction with NF- $\kappa$ B Inhibitor  $\alpha/\beta$  Results in Endothelial Cell Apoptosis and Hemorrhage Development. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 3, p. 1258–1267, 1 ago. 2014.

LIN, Y. et al. p38 MAPK mediates epithelial-mesenchymal transition by regulating p38IP and Snail in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 60, p. 81–9, 2016.

LIU, E. W. Y.; NG, M. L. The Role of Dengue NS1, Through the Modulation of STAT3 Signaling, in the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. e294, dez. 2008.

LIU, J. et al. Thymidylate synthase as a translational regulator of cellular gene expressionBiochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 18 jul. 2002.

LIU, W. et al. Epstein-Barr virus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocyte-derived macrophages through p38/mitogen-activated protein kinase and NF-κB pathways: impairment in T cell functions. **Journal of virology**, v. 88, n. 12, p. 6660–71, jun. 2014.

LOPES, T. R. R. et al. **Dengue in Brazil in 2017: What happened?Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, , 2018.

LUO, W. et al. A Balance between B Cell Receptor and Inhibitory Receptor Signaling Controls Plasma Cell Differentiation by Maintaining Optimal Ets1 Levels. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 2, p. 909–920, 15 jul. 2014.

MA, C. S. et al. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 7, p. 1241–1253, 2 jul. 2012.

MAKINO, S.; JENKIN, H. M. Effect of fatty acids on growth of Japanese encephalitis virus cultivated in BHK-21 cells and phospholipid metabolism of the infected cells. **Journal of virology**, v. 15, n. 3, p. 515–25, mar. 1975.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. **AKT/PKB Signaling: Navigating DownstreamCell**, 29 jun. 2007.

MARCU, M. G. et al. Recombinant scinderin, an F-actin severing protein, increases calcium-induced release of serotonin from permeabilized platelets, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 20–4, 1 jan. 1996.

MARIANI, E. et al. Metabolomics identifies plasma biomarkers of multiple myeloma development and progression. **Bone Abstracts**, 1 maio 2013.

MARIANNEAU, P. et al. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. **Journal of virology**, v. 71, n. 4, p. 3244–9, abr. 1997.

MARTIN-ACEBES, M. A. et al. The Composition of West Nile Virus Lipid Envelope Unveils a Role of Sphingolipid Metabolism in Flavivirus Biogenesis. **Journal of Virology**, v. 88, n. 20, p. 12041–12054, 15 out. 2014.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564–581, 1 out. 2009.

MATHEW, A. et al. B-Cell Responses During Primary and Secondary Dengue Virus Infections in Humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 10, p. 1514–1522, 15 nov. 2011.

MATSUSHITA, N. et al. Regulation of B cell differentiation by the ubiquitin-binding protein TAX1BP1. **Scientific Reports**, v. 6, 12 ago. 2016.

MCLEAN, J. E. et al. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 25, p. 22147–22159, 24 jun. 2011.

MENDONÇA, F. DE A.; SOUZA, A. V. E; DUTRA, D. DE A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, v. 21, n. 3, p. 257–269, dez. 2009.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, out. 2010.

METZ, R. et al. IDO2 is critical for IDO1-mediated T-cell regulation and exerts a nonredundant function in inflammation. **International immunology**, v. 26, n. 7, p. 357– 67, jul. 2014.

MEZRICH, J. D. et al. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 6, p. 3190–8, 15 set. 2010.

MICHELSON, S. et al. Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 5730–5737, 1994.

MIDGLEY, C. M. et al. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 1, p. 410–21, jan. 2011.

MIELKE, N. et al. Eukaryotic initiation factor  $2\alpha$  phosphorylation is required for B-cell maturation and function in mice. **Haematologica**, v. 96, n. 9, p. 1261–1268, set. 2011.

MINGUET, S. et al. Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 9, p. 2475–2487, set. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue : diagnóstico e manejo clínico : adulto e criança [recurso eletrônico]. [s.l: s.n.].

MITA, Y. et al. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. **Immunology letters**, v. 81, n. 1, p. 71–5, 1 abr. 2002.

MIZUNO, K. et al. Selective expansion of CD16highCCR2- subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. **Clinical and experimental immunology**, v. 142, n. 3, p. 461–70, dez. 2005.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 304ra142-304ra142, 9 set. 2015.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. **Immunology and Cell Biology**, v. 95, n. 5, p. 491–495, maio 2017.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313–9, 22 jan. 2004.

MOENS, L.; TANGYE, S. G. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.

MORESCO, E. M. Y.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current Biology**, v. 21, n. 13, p. R488–R493, 12 jul. 2011.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, jan. 2005.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl\_2, p. S89–S95, 1 mar. 2017.

MUÑOZ-FONTELA, C. et al. Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 8, p. 1929–38, 4 ago. 2008.

MURASE, S. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) degradation by proteasome controls a developmental switch in neurotrophin dependence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 28, p. 20151–20161, 12 jul. 2013.

NAGEL, S. et al. Coexpression of CD44 variant isoforms and receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM, CD168) is an International Prognostic Index and C-MYC gene status-independent predictor of poor outcome in diffuse large B-cell lymphomas. **Experimental hematology**, v. 38, n. 1, p. 38–45, jan. 2010.

NAIR, P.; SOMASUNDARAM, K.; KRISHNA, S. Activated Notch1 Inhibits p53-Induced Apoptosis and Sustains Transformation by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-Dependent Pathway. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 77, n. 12, p. 7106–7112, 2003.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surfacebound transforming growth factor beta. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 5, p. 629–44, 3 set. 2001. NAKAYAMA-HOSOYA, K. et al. Epigenetic Repression of Interleukin 2 Expression in Senescent CD4 <sup>+</sup> T Cells During Chronic HIV Type 1 Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 1, p. 28–39, 1 jan. 2015.

NASIRUDEEN, A. M. A. et al. RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, p. e926, 4 jan. 2011.

NASIRUDEEN, A. M. A.; LIU, D. X. Gene expression profiling by microarray analysis reveals an important role for caspase-1 in dengue virus-induced p53-mediated apoptosis. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 6, p. 1069–81, jun. 2009.

NASIRUDEEN, A. M. A.; WANG, L.; LIU, D. X. Induction of p53-dependent and mitochondria-mediated cell death pathway by dengue virus infection of human and animal cells. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 10–11, p. 1124–1132, ago. 2008.

NELMS, K. et al. THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. **Annual Review of Immunology**, v. 17, n. 1, p. 701–738, abr. 1999.

NERA, K.-P. et al. Loss of Pax5 Promotes Plasma Cell Differentiation. **Immunity**, v. 24, n. 3, p. 283–293, mar. 2006.

NERA, K.-P.; KYLÄNIEMI, M. K.; LASSILA, O. Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 82, n. 3, p. 225–234, set. 2015.

NG, C. S.; KATO, H.; FUJITA, T. Recognition of viruses in the cytoplasm by RLRs and other helicases--how conformational changes, mitochondrial dynamics and ubiquitination control innate immune responses. **International Immunology**, v. 24, n. 12, p. 739–749, 1 dez. 2012.

NGUYEN, N. T. et al. Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: Recent advances in autoimmune disease research. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, 2014.

NISALAK, A. LABORATORY DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS INFECTIONS. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 46 Suppl 1, p. 55–76, 2015.

NIVARTHI, U. K. et al. Longitudinal analysis of acute and convalescent B cell responses in a human primary dengue serotype 2 infection model. **EBioMedicine**, v. 41, p. 465–478, 1 mar. 2019.

NOTERMANS, D. W. et al. Potent antiretroviral therapy initiates normalization of hypergammaglobulinemia and a decline in HIV type 1-specific antibody responses. **AIDS research and human retroviruses**, v. 17, n. 11, p. 1003–8, 20 jul. 2001.

NUTT, S. L. et al. The generation of antibody-secreting plasma cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 3, p. 160–71, mar. 2015.

O'BRIEN, V. Viruses and apoptosis. **The Journal of general virology**, v. 79 ( Pt 8), p. 1833–45, ago. 1998.

OCHIAI, K. et al. Transcriptional Regulation of Germinal Center B and Plasma Cell Fates by Dynamical Control of IRF4. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 918–929, 23 maio 2013.

OLIVEIRA, M. et al. Joint ancestry and association test indicate two distinct pathogenic pathways involved in classical dengue fever and dengue shock syndrome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, 15 fev. 2018.

OPITZ, C. A. et al. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-d-

tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. PLoS ONE, v. 6, n. 5, 2011.

ORABONA, C. et al. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 52, p. 20828–20833, 30 dez. 2008.

OTERO, D. C.; OMORI, S. A.; RICKERT, R. C. CD19-dependent activation of Akt kinase in B-lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1474–1478, 12 jan. 2001.

OU, X. et al. Adaptor protein DOK3 promotes plasma cell differentiation by regulating the expression of programmed cell death 1 ligands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 31, p. 11431–11436, 5 ago. 2014.

PACHECO, J. M. et al. Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in the Nasopharynx of Cattle; Tissue-Specific Distribution and Local Cytokine Expression. **PIoS one**, v. 10, n. 5, p. e0125698, 2015.

PANTOJA, P. et al. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by preexisting immunity to dengue virus. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15674, 23 ago. 2017.

PARADIS, V. et al. Histological features predictive of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 12, p. 998–1004, 1996.

PARK, I. K.; LETTERIO, J. J.; GORHAM, J. D. TGF- $\beta$ 1 inhibition of IFN- $\gamma$ -induced signaling and Th1 gene expression in CD4+ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 13, p. 3283–3290, jul. 2007.

PENG, S. L. et al. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. **Immunity**, v. 14, n. 1, p. 13–20, 2001.

PERCARIO, Z. et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef activates STAT3 in primary human monocyte/macrophages through the release of soluble factors: involvement of Nef domains interacting with the cell endocytotic machinery. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, n. 5, p. 821–32, nov. 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e – 45, 1 maio 2001.

PICAUD, S. et al. Promiscuous targeting of bromodomains by bromosporine identifies BET proteins as master regulators of primary transcription response in leukemia. **Science Advances**, v. 2, n. 10, 1 out. 2016.

PIERSON, T. The flavivirus lifecycle. [s.l: s.n.].

PINTO, L. M. O. et al. Increased Pro-inflammatory Cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) and Anti-inflammatory Compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian Patients during Exanthematic Dengue Fever. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 387–394, 1999.

PINTO, M. C. X. et al. Calcium signaling and cell proliferation. **Cellular signalling**, v. 27, n. 11, p. 2139–49, nov. 2015.

POHL, T. et al. The combined absence of NF-κB1 and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4514–4519, 2 abr. 2002.

PONE, E. J. et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-κB pathway. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 767, 3 jan. 2012.

POPPER, S. J. et al. Temporal Dynamics of the Transcriptional Response to Dengue Virus Infection in Nicaraguan Children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. e1966, 20 dez. 2012.

POZO-AGUILAR, J. O. et al. Evaluation of host and viral factors associated with severe dengue based on the 2009 WHO classification. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, 2014.

PRIDANS, C. et al. Identification of Pax5 Target Genes in Early B Cell Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1719–1728, 1 fev. 2008.

PRIYADARSHINI, D. et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: A facility-based study. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 14 jan. 2010.

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.

PUERTA-GUARDO, H. et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. **The Journal of general virology**, v. 91, n. Pt 2, p. 394–403, fev. 2010.

PUNNONEN, J. et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3730–3734, 15 abr. 1993.

QUÁCH, T. D. et al. Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations, Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 3, p. 1060–1069, 1 fev. 2016.

RAMABHATTA, S. et al. The Clinical and Serological Profile of Pediatric Dengue. **Indian journal of pediatrics**, v. 84, n. 12, p. 897–901, dez. 2017.

RANGASWAMY, U. S.; SPECK, S. H. Murine Gammaherpesvirus M2 Protein Induction of IRF4 via the NFAT Pathway Leads to IL-10 Expression in B Cells. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, jan. 2014.

REIMOLD, A. M. et al. Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 2, p. 393–401, 1 fev. 1996.

REINHARD, J. F. Altered tryptophan metabolism in mice with herpes simplex virus encephalitis: increases in spinal cord quinolinic acid. **Neurochemical research**, v. 23, n. 5, p. 661–5, maio 1998.

RESTREPO, B. N. et al. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama in infants with and without dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 6–10, fev. 2008.

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 ago. 2010.

RODRÍGUEZ DEL CASTILLO, A.; VITALE, M. L.; TRIFARÓ, J. M. Ca2+ and pH determine the interaction of chromaffin cell scinderin with phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5,-biphosphate and its cellular distribution during nicotinic-

receptor stimulation and protein kinase C activation. **Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 4, p. 797–810, 1992.

ROLLENHAGEN, C.; ASIN, S. N. Enhanced HIV-1 replication in ex vivo ectocervical tissues from post-menopausal women correlates with increased inflammatory responses. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 6, p. 671–81, nov. 2011.

ROMASHKOVA, J. A.; MAKAROV, S. S. NF-κB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 86–90, 2 set. 1999.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532–543, 15 ago. 2011.

ROTHOEFT, T. et al. Structure and duration of contact between dendritic cells and T cells are controlled by T cell activation state. **European journal of immunology**, v. 36, n. 12, p. 3105–17, dez. 2006.

ROY, K. et al. A Regulatory Circuit Controlling the Dynamics of NFκB cRel Transitions B Cells from Proliferation to Plasma Cell Differentiation. **Immunity**, v. 50, n. 3, p. 616-628.e6, 19 mar. 2019.

ROY, P.; SARKAR, U. A.; BASAK, S. **The NF-κB activating pathways in multiple myelomaBiomedicines**MDPI AG, , 1 jun. 2018.

RUI, L. et al. ERK Signaling Is a Molecular Switch Integrating Opposing Inputs from B Cell Receptor and T Cell Cytokines to Control TLR4-Driven Plasma Cell Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 8, p. 5337–5346, 15 out. 2006.

SAHAR, S. et al. Altered behavioral and metabolic circadian rhythms in mice with disrupted NAD+ oscillation. **Aging**, v. 3, n. 8, p. 794–802, 2011.

SARIOL, C. A.; NOGUEIRA, M. L.; VASILAKIS, N. A Tale of Two Viruses: Does Heterologous Flavivirus Immunity Enhance Zika Disease?Trends in MicrobiologyElsevier Ltd, , 1 mar. 2018.

SCHAEFFER, E. et al. Dermal CD14 + dendritic cell and macrophage infection by dengue virus is stimulated by interleukin-4. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1743–1751, 18 jul. 2015.

SCHAFFNER, F.; MATHIS, A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1271–1280, dez. 2014.

SCHARENBERG, A. M.; HUMPHRIES, L. A.; RAWLINGS, D. J. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 10, p. 778–89, out. 2007.

SCHAUMANN, D. H. S. et al. VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 7, p. 1606–1612, 2007.

SCHEBESTA, A. et al. Transcription Factor Pax5 Activates the Chromatin of Key Genes Involved in B Cell Signaling, Adhesion, Migration, and Immune Function. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 49–63, jul. 2007.

SCHINDLER, C.; LEVY, D. E.; DECKER, T. JAK-STAT signaling: From interferons to cytokinesJournal of Biological Chemistry, 13 jul. 2007.

SCHMIDLIN, H. et al. Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1804–1812, 1 set. 2008.

SCHWEIGHOFFER, E. et al. TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK. **The Journal of experimental medicine**, v. 214, n. 5, p. 1269–1280, 1 maio 2017.

SCIAMMAS, R. et al. Graded Expression of Interferon Regulatory Factor-4 Coordinates Isotype Switching with Plasma Cell Differentiation. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 225–236, ago. 2006.

SCIAMMAS, R. et al. An incoherent regulatory network architecture that orchestrates B cell diversification in response to antigen signaling. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 495, 24 jan. 2011.

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 dez. 2015.

SEN, N. et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and survivin induction by varicella-zoster virus promote replication and skin pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 2, p. 600–5, 10 jan. 2012.

SERFLING, E. et al. NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 7, p. 1166–70, jul. 2004.

SHAFFER, A. . et al. XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation. **Immunity**, v. 21, n. 1, p. 81–93, jul. 2004.

SHAFFER, A. L. et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. **Immunity**, v. 17, n. 1, p. 51–62, 2002.

SHI, W. et al. Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. **Nature Immunology**, v. 16, n. 6, p. 663–673, 20 jun. 2015.

SHI, W. et al. Comparison of immunogenicity, efficacy and transcriptome changes of inactivated rabies virus vaccine with different adjuvants. **Vaccine**, v. 36, n. 33, p. 5020–5029, 2018.

SHIH, W.-L. et al. Hepatitis B Virus X Protein Inhibits Transforming Growth Factorinduced Apoptosis through the Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway\*. 2000.

SHINNERS, N. P. et al. Bruton's Tyrosine Kinase Mediates NF-κB Activation and B Cell Survival by B Cell-Activating Factor Receptor of the TNF-R Family. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3872–3880, 15 set. 2007.

SHIVANTHAN, M.; RAJAPAKSE, S. Dengue and Calcium. International Journal of Critical Illness and Injury Science, v. 4, n. 4, p. 314, 2014.

SHOKHIREV, M. N. et al. A multi-scale approach reveals that NF-κB cR el enforces a B-cell decision to divide . **Molecular Systems Biology**, v. 11, n. 2, p. 783, fev. 2015.

SILVEIRA, G. F. et al. Human T lymphocytes are permissive for dengue virus replication. **Journal of Virology**, p. JVI.02181-17, 7 mar. 2018.

SIMMONS, C. P. et al. Early T-Cell Responses to Dengue Virus Epitopes in Vietnamese Adults with Secondary Dengue Virus Infections. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5665–5675, 1 maio 2005.

SIMMONS, C. P. et al. Patterns of Host Genome–Wide Gene Transcript Abundance in the Peripheral Blood of Patients with Acute Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 8, p. 1097–1107, 15 abr. 2007.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423–1432, 12 abr. 2012.

SIMMONS, M. et al. Development and Validation of a Quantitative, One-Step, Multiplex, Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Dengue and Chikungunya Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1766–1773, jul. 2016.

SIMON-LORIÈRE, E. et al. Increased adaptive immune responses and proper feedback regulation protect against clinical dengue. **Science translational medicine**, v. 9, n. 405, 30 ago. 2017.

SOJKA, D. K. et al. IL-2 Secretion by CD4 + T Cells In Vivo Is Rapid, Transient, and Influenced by TCR-Specific Competition . **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 6136–6143, 15 maio 2004.

SOLBRIG, M. V.; PERNG, G. C. Current neurological observations and complications of dengue virus infectionCurrent Neurology and Neuroscience ReportsCurrent Medicine Group LLC 1, , 1 jun. 2015.

SONG, H. et al. IDO metabolite produced by EBV-transformed B cells inhibits surface expression of NKG2D in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. **Immunology letters**, v. 136, n. 2, p. 187–93, maio 2011.

SONODA, E. et al. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 4, p. 1415–20, 1 out. 1989.

SPROKHOLT, J. K. et al. RIG-I-like receptor activation by dengue virus drives follicular T helper cell formation and antibody production. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2017.

SRIKIATKHACHORN, A.; MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 563–574, 11 jul. 2017.

SRIRANGAN, S.; CHOY, E. H. The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritisTherapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, 2010.

STAUFFER, F.; EL-BACHA, T.; DA POIAN, A. Advances in the Development of Inactivated Virus Vaccines. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 291–296, 18 abr. 2008.

STEINER, N. et al. The metabolomic plasma profile of myeloma patients is considerably different from healthy subjects and reveals potential new therapeutic targets. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2018.

STONE, S. L. et al. T-bet Transcription Factor Promotes Antibody-Secreting Cell Differentiation by Limiting the Inflammatory Effects of IFN-γ on B Cells. **Immunity**, v. 50, n. 5, p. 1172- 1187.e7, 21 maio 2019.

SUEMATSU, S. et al. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 19, p. 7547–7551, 1989.

SUN, X. et al. Transcriptional Changes during Naturally Acquired Zika Virus Infection

Render Dendritic Cells Highly Conducive to Viral Replication. **Cell reports**, v. 21, n. 12, p. 3471–3482, 19 dez. 2017.

SUOMELA, S. et al. Interferon  $\alpha$ -inducible protein 27 (IFI27) is upregulated in psoriatic skin and certain epithelial cancers. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 3, p. 717–721, 2004.

SUZUKI, Y. et al. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. **Lung Cancer**, v. 67, n. 3, p. 361–365, mar. 2010.

SVS. Boletim epidemiológico: Dengue. [s.l: s.n.].

TACKE, R. S. et al. Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes/macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10847–55, 25 mar. 2011.

TAKAOKA, A. et al. Integration of interferon- $\alpha/\beta$  signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. **Nature**, v. 424, n. 6948, p. 516–523, 31 jul. 2003.

TALMAGE, D. A. et al. Phosphorylation of middle T by pp60c-src: a switch for binding of phosphatidylinositol 3-kinase and optimal tumorigenesis. **Cell**, v. 59, n. 1, p. 55–65, 6 out. 1989.

TAMBYAH, P. A. et al. microRNA expression in blood of dengue patients. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 53, n. 4, p. 466–476, 2015.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. II-6 in inflammation, Immunity, And disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, 1 out. 2014.

TAVARES, R. M. et al. The Ubiquitin Modifying Enzyme A20 Restricts B Cell Survival and Prevents Autoimmunity. **Immunity**, v. 33, n. 2, p. 181–191, ago. 2010.

TEETS, F. D. et al. Origin of the dengue virus outbreak in Martin County, Florida, USA 2013. **Virology Reports**, v. 1–2, p. 2–8, mar. 2014.

TERZIAN, A. C. B. et al. Viral load and cytokine response profile does not support antibody-dependent enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-infected patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 8, p. 1260–1265, 1 out. 2017.

THAI, K. T. D. et al. High incidence of peripheral blood plasmacytosis in patients with dengue virus infection. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v. 17, n. 12, p. 1823–8, dez. 2011.

THAI, M. et al. Adenovirus E4ORF1-Induced MYC Activation Promotes Host Cell Anabolic Glucose Metabolism and Virus Replication. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 694–701, 1 abr. 2014.

THAI, M. et al. MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8873, 12 dez. 2015.

THAKER, S. K.; CH'NG, J.; CHRISTOFK, H. R. Viral hijacking of cellular metabolism. **BMC Biology**, v. 17, n. 1, p. 59, 18 dez. 2019.

THEIN, S. et al. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. **Journal of medical virology**, v. 40, n. 2, p. 102–6, jun. 1993.

THONGTAN, T.; PANYIM, S.; SMITH, D. R. Apoptosis in dengue virus infected liver cell lines HepG2 and Hep3B. **Journal of medical virology**, v. 72, n. 3, p. 436–44, mar. 2004.
TONTULAWAT, P. et al. Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, antidengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 42, n. 3, p. 570– 8, maio 2011.

TSAI, Y.-T. et al. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication *in vitro*. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 604–615, abr. 2009.

TSAI, Y.-T. et al. Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway is crucial in chemokine production from hepatocytes infected by dengue virus. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 236, n. 10, p. 1156–65, out. 2011.

TUNYAPLIN, C. et al. Direct Repression of *prdm1* by Bcl-6 Inhibits Plasmacytic Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 1158–1165, 15 jul. 2004.

TURTON, K. B. et al. Ratios of four STAT3 splice variants in human eosinophils and diffuse large B cell lymphoma cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 18 maio 2015.

UBOL, S. et al. Differences in Global Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicate a Significant Role of the Innate Responses in Progression of Dengue Fever but Not Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 10, p. 1459–1467, 15 maio 2008.

UBOL, S.; HALSTEAD, S. B. How Innate Immune Mechanisms Contribute to Antibody-Enhanced Viral Infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 12, p. 1829– 1835, 1 dez. 2010.

VAIDYANATHAN, B. et al. The aryl hydrocarbon receptor controls cell-fate decisions in B cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 1, p. 197–208, 2017.

VELAZQUEZ-SALINAS, L. et al. Increased Virulence of an Epidemic Strain of Vesicular Stomatitis Virus Is Associated With Interference of the Innate Response in Pigs. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1891, 2018.

VOGE, N. V. et al. Metabolomics-Based Discovery of Small Molecule Biomarkers in Serum Associated with Dengue Virus Infections and Disease Outcomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 25 fev. 2016.

WAHALA, W. M. P. B.; DE SILVA, A. M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374–2395, 25 nov. 2011.

WANG, L. et al. Gene expression profiling identifies IRF4-Associated molecular signatures in hematological malignancies. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 1 set. 2014.

WANG, Q. et al. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 20, p. 1116–43, 1 jun. 2015.

WANG, X.-J. et al. The Differential Expression and Possible Function of Long Noncoding RNAs in Liver Cells Infected by Dengue Virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 6, p. 1904–1912, dez. 2017.

WANG, X. et al. Effects and relationship of ERK1 and ERK2 in interleukin-1β-induced alterations in MMP3, MMP13, type II collagen and aggrecan expression in human chondrocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 27, n. 4, p. 583–589, abr. 2011.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. **The Journal of General Physiology**, v. 8, n. 6, p. 519–530, 7 mar. 1927.

WARIS, G.; HUH, K. W.; SIDDIQUI, A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 22, p. 7721–30, nov. 2001.

WATERS, L. R. et al. Initial B Cell Activation Induces Metabolic Reprogramming and Mitochondrial Remodeling. **iScience**, v. 5, p. 99–109, 27 jul. 2018.

WATTRANG, E. et al. Experimental infection of ponies with equine influenza A2 (H3N8) virus strains of different pathogenicity elicits varying interferon and interleukin-6 responses. **Viral immunology**, v. 16, n. 1, p. 57–67, 2003.

WHO. Global strategy for Dengue prevention and control 2012-2020. [s.l: s.n.].

WHO. **Fact sheet: Dengue and Severe Dengue.** Disponível em: <a href="http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>">http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/</a>. Acesso em: 31 ago. 2019.

WOETMANN, A. et al. Inhibition of protein phosphatase 2A induces serine/threonine phosphorylation, subcellular redistribution, and functional inhibition of STAT3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 19, p. 10620–5, 14 set. 1999.

WRAMMERT, J. et al. Rapid and Massive Virus-Specific Plasmablast Responses during Acute Dengue Virus Infection in Humans. **Journal of Virology**, v. 86, n. 6, p. 2911–2918, 2012.

WRIGHT, K. L. et al. Lymphoma Cells I-Binding Factor 1/Blimp-1 Transcription in PU.1 Regulates Positive Regulatory Domain. 2019.

WU, H.; LOZANO, G. NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 31, p. 20067–74, 5 ago. 1994.

XIN, X.; MAINS, R. E.; EIPPER, B. A. Monooxygenase X, a member of the copperdependent monooxygenase family localized to the endoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 48159–48167, 12 nov. 2004.

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

YANG, T. C. et al. Proteomic analysis for Type I interferon antagonism of Japanese encephalitis virus NS5 protein. **Proteomics**, v. 13, n. 23–24, p. 3442–3456, dez. 2013.

YEO, A. S. L. et al. Lack of clinical manifestations in asymptomatic dengue infection is attributed to broad down-regulation and selective up-regulation of host defence response genes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 11 abr. 2014.

YEUNG, A. W. S. et al. Flavivirus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocyte-derived macrophages via tumor necrosis factor and NF- B. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 4, p. 657–666, 1 abr. 2012.

YOO, Y. DO et al. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator: Role in HBV pathogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 2, p. 388–395, 15 jan. 1996.

YU, Y.; MAGUIRE, T. G.; ALWINE, J. C. ChREBP, a glucose-responsive transcriptional factor, enhances glucose metabolism to support biosynthesis in human cytomegalovirus-infected cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 5, p. 1951–1956, 4 fev. 2014.

ZAN, H.; CASALI, P. Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody

Response. Frontiers in immunology, v. 6, p. 631, 2015.

ZELLWEGER, R. M. et al. CD8 + T Cells Prevent Antigen-Induced Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Disease in Mice . **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 8, p. 4117–4124, 15 out. 2014.

ZHANG, X. et al. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 6795–9, 23 abr. 2013.

ZHAO, W.; SEKI, A.; FANG, G. Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. **Molecular biology of the cell**, v. 17, n. 9, p. 3881–96, set. 2006.

ZHAO, X. et al. Neuronal interleukin-4 as a modulator of microglial pathways and ischemic brain damage. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 32, p. 11281–11291, 12 ago. 2015.

# Histórico do aluno no Doutorado (Ficha do aluno)

02/09/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



9130 = 0154427/3 = Vivian Bonezi	
Email:	vivianbonezi@usp.br
Data de Nascimento:	27/07/1987
Cédula de Identidade:	RG - 44,292,441-0 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Centro Universitário São Camilo - São Paulo - Brasil - 2010
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015
Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	06/07/2015
Início da Contagem de Prazo:	06/07/2015
Data Limite para o Depósito:	04/11/2019
Orientador:	Prof(a), Dr(a), Rosario Dominguez Crespo Hirata - 06/07/2015 até 31/01/2017, Email: rosariohirata@usp.br
Orientador:	Prof(a), Dr(a), Eduardo Lani Volpe da Silveira - 01/02/2017 até o presente, Email: eduardosilveira@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 06/07/2015
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 06/07/2019 até 03/11/2019
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 04/09/2017
Data do Depósito do Trabalho: Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 06/07/2015 Prorrogação em 16/05/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018), Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019 Impresso em: 02/09/2019 12:05:43

#### 02/09/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO

### 9136 - 8154427/3 - Vivian Bonezi

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred,	Freq.	Conc,	Exc.	Situação
BMB5824- 1/2	RNA em suas Múltiplas Funções (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/08/2015	12/10/2015	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5766- 4/2	Tópicos em Análises Clínicas IV	04/08/2015	16/11/2015	15	1	100	А	Ν	Concluída
MAG5002- 1/1	Genética Molecular Humana e Genômica (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	14/08/2015	26/11/2015	120	8	86	А	Ν	Concluída
MCM5749- 4/3	Temas Avançados em Transplante Renal (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	08/09/2015	12/10/2015	75	5	100	Α	N	Concluída
BMB5827- 1/1	Aspectos Atuais da Fisiopatologia Renal (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/10/2015	29/10/2015	30	2	91	A	N	Concluída
FBC5792- 3/3	Tópicos em Análises Clínicas III	08/03/2016	20/06/2016	15	1	100	А	Ν	Concluída
ODO5700- 3/2	Docência Universilária e Estralégias de Ensino- Aprendizagem (Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo)	08/08/2016	28/11/2016	75	5	86	A	N	Concluída
BIF5794- 2/1	Sinalização Celular (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	05/09/2017	13/11/2017	120	0	-	-	Ν	Matrícula cancelada
FBC5734- 3/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	20/08/2018	26/08/2018	30	2	100	А	Ν	Concluída
FBC5710- 8/1	Vacinas e Adjuvantes	19/11/2018	09/12/2018	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimo	Créditos obtidos	
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	38
Estágios:			
Tota :	0	20	38

Créditos Atribuídos à Tese: 167

#### Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019 Impresso em: 02/09/2019 12:05:43

# ANEXO 2 Currículo Lattes

### Vivian Bonezi



Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6217088119598311 Última atualização do currículo em 03/09/2019

Doutoranda pelo pelo Programa de Pós Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) da Universidade de São Paulo (USP), no departamento de Análises Clínicas, com ênfase em Imunologia de linfócitos B no contexto de infecções pelo vírus da Dengue (em andamento - início em 2015). Mestre em Ciências pelo Programa de Pós Graduação de Farmácia (Análises Clínicas) - USP, na área de Análises Clínicas, onde era membro do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico e trabalhava com expressão gênica e microRNAs (2015). Possui graduação em Farmácia Generalista pelo Centro Universitário São Camilo (2010), onde já organizou e ministrou o curso "Farmacogenômica: a individualização da terapêutica", com a duração de 5 semanas (2017). Já atuou como monitora nas disciplinas de Fisiopatologia (2014), Fisiologia do Sistema Hematopoético (2016) e Imunodiagnóstico (2018), através do Programa de Aprimoramento de Ensino (PAE), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, onde pôde adquirir experiências em didática e em metodologias ativas de ensino (incluindo TBL). Foi membro da Comissão Organizadora do International Symposium on Pathophysiology and Toxicology & Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas, por dois anos consecutivos (2015 e 2016), e representante discente junto à Comissão Coordenadora do Programa de Pós Graduação (2015-2016). (Texto informado pelo autor)

### Identificação

Nome	Vivian Bonezi🗇
Nome em citações bibliográficas	BONEZI, V.
Endereco	

Formação acadêmica/titulação

2015	Doutorado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 7).
	Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
	Título: Avaliação da sinalização intracelular em células B humanas após infecção pelo vírus da
	Dengue,
	Orientador: 🧐 Eduardo Lani Volpi da Silveira.
	Grande área: Ciências da Saúde
	Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.
	Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Biologia e Fisiologia dos Microorganismos / Especialidade: Virologia.
2013 - 2015	Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7).
	Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
	Título: Relação entre o perfil de expressão de genes envolvidos na farmacodinâmica de
	imunossupressores e de microRNAs reguladores, com a resposta terapêutica em
	transplantados renais, Ano de Obtenção: 2015.
	Orientador: 🥺 Rosario Domingues Crespo Hirata.
	Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
	Palavras-chave: Farmacogenômica; Expressão gênica; miRNA; Imunossupressores;
	Transplante renal.
	Grande área: Ciências da Saúde
	Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.
	Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.
2006 - 2010	Graduação em Farmácia.
	Centro Universitário São Camilo, USC, Brasil.
	Título: DPOC e Asma: Protocolo de Atenção Farmacêutica.
	Orientador: Válter Luiz da Costa Júnior.

### Formação Complementar

2017 - 2017

2012 - 2013

Docência no Ensino Superior: Uma primeira Aproximação. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Programa de Atualização Profissional. (Carga horária: 400h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

### Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vinculo institucional	
2018 - 2018	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor
Outras informações	Monitoria acadêmica vinculada ao Programa de Aprimoramento de Ensino na disciplina
	Imunodiagnóstico
Vínculo institucional	
2016 - 2016	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6
Outras informações	Monitoria acadêmica vinculada ao Programa de Aprimoramento de Ensino na disciplina
	Fisiologia do Sistema Hematopoético
Vínculo institucional	
2014 - 2014	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6
Outras informações	Monitoria acadêmica vinculada ao Programa de Aprimoramento de Ensino na disciplina
	Fisiopatologia III

CordCell - Centro de Terapia Celular, CORDCELL, Brasil.

Vínculo institucional	
2010 - 2012	Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Gestão Laboratorial, Carga horária: 50,
	Regime: Dedicação exclusiva.
Outras informações	Experiência em atividades de criopreservação de células tronco hematopoiéticas, sejam elas provenientes do sangue de cordão umbilical e placentário, de coletas de stem cell periférico ou de coletas de medula óssea em centros cirúrgicos. Desenvolvimento nas áreas de gestão de processos e pessoas, sistema da qualidade, certificações e acreditações.

Centro Universitário São Camilo, USC, Brasil.

Vínculo institucional	
2017 - 2017	Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 4
Outras informações	Organizou e ministrou o curso "Farmacogenômica: a individualização da terapêutica"
Vínculo institucional	
2009 - 2009	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 8
Outras informações	Monitoria acadêmica na disciplina de Cosmetologia, incluindo prática laboratorial.

### Projetos de pesquisa

2017 - Atual

. ...

Avaliação da sinalização intracelular em células B humanas após infecção pelo vírus da Dengue

Descrição: O agente causador da Dengue é um vírus da família Flaviviridae que é transmitido pelo mosquitos vetores Aedes aegypti ou Aedes albopictus aos humanos. Este vírus causa um gigantesco impacto anualmente na saúde pública das áreas endêmicas de infecção (países tropicais). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 50-100 milhões de infecções são detectadas anualmente em mais de 100 países tropicais no mundo. Entre estes países, está o Brasil que apresenta praticamente uma nova epidemia dessa infecção a cada ano. Em 2015, houve um aumento significativo no número de casos confirmados em relação a 2014. Há 4 diferentes sorotipos do vírus da Dengue (DENV-1, -2, -3 e -4), os quais possuem uma certa diversidade quanto às seqüências de proteínas. Após a infecção primária, ocorre a produção de anticorpos que, na sua maioria, reagem cruzadamente com os diferentes sorotipos, mas não são neutralizantes contra eles, mas somente contra o próprio sorotipo. Inicialmente, essa resposta humoral não é efetiva, já que é detectada no soro

	normalmente após o declínio da viremia. Apesar disso, a resposta celular que suporta a produção de anticorpos é extremamente alta e específica. Pacientes infectados pelo vírus da Dengue apresentam um grande aumento na freqüência de plasmablastos (células secretoras de anticorpos de vida curta) na circulação durante os primeiros 7 dias após o desenvolvimento de sintomas. A grande maioria destes plasmablastos é específica a epítopos do envelope viral. Além disso, pacientes que apresentam dengue grave (hemorrágica) têm uma maior magnitude de resposta de plasmablastos específicos que os pacientes com Dengue moderada. Curiosamente, a quantidade de plasmablastos cinudos desta resposta equivale a mais de 50% de todas as células B circulantes no sangue. Essa representatividade é muito maior que a observada durante respostas imunes induzidas contra outros flavivírus (vacina da febre amarela) ou outros vírus (gripe), as quais não atingem 10% de média. Assim, como a infecção pelo vírus da Dengue é capaz de induzir uma resposta tão alta de plasmablastos? Para responder essa pergunta, estamos abordando quais vias de sinalização são ativadas (e alteradas) durante esta resposta de células B durante esta infecção viral para gerar tantas células, utilizando abordagens in silico, in vitro e amostras de pacientes infectados pelo vírus. Ainda, estamos investigando o papel do metabolismo do triptofano na imunoregulação desse processo
2015 - 2016	Integrantes: Vivian Bonezi - Coordenador / Eduardo Lani Volpi da Silveira - Integrante. miRNoma exossomal urinário como fonte de biomarcadores potenciais de nefropatia do enxerto renal Situação: Desativado; Natureza: Pesquisa.
2013 - Atual	Integrantes: Vivian Bonezi - Integrante / Rosario Domingues Crespo Hirata - Coordenador / Mario Hiroyuki Hirata - Integrante / alvaro Cerda - Integrante / Patrícia de Cassia Salgado - Integrante / Cristina Fajardo - Integrante / Helio Tedesco Silva Junior - Integrante / Claudia Rosso Felipe - Integrante / Sonia de Qauteli Doi - Integrante. Relação entre o perfil de expressão de genes envolvidos na farmacodinâmica de imunossupressores e de microRNAs reguladores, com a resposta terapêutica em transplantados renais Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
	Integrantes: Vivian Bonezi - Integrante / Cristina Moreno Fajardo - Integrante / Rosario Domingues Crespo Hirata - Coordenador / Mario Hiroyuki Hirata - Integrante / alvaro Cerda - Integrante / Patrícia de Cassia Salgado - Integrante / Cristina Fajardo - Integrante / Helio Tedesco Silva Junior - Integrante / José Osmar Medina Pestana - Integrante / Claudia Rosso Felipe - Integrante / Nagilla Oliveira - Integrante / Sonia de Qauteli Doi - Integrante / Fabiana Dalla Vecchia Gengivir - Integrante.
Áreas de atuação	
1. 2. 3.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
Idiomas	
Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Prêmios e títulos	
2015	Menção Honrosa entre os trabalhos científicos apresentados na forma oral, XVIII Congresso Farmacêutico de São Paulo e X Seminário Internacional de Ciências Farmacêuticas.
Produções	

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

- GENVIGIR, F. D. V. ; NISHIKAWA, A. M. ; SALGADO, P. C. ; SALAZAR, A. B. C. ; BONEZI, V. ; FELIPE, C. R. ; SILVA JUNIOR, H. T. ; PESTANA, J. O. M. ; DOI, S. Q. ; HIRATA, M. H. ; HIRATA, R. D. C. . Influência de polimorfismos nos genes ABCC2 e ABCG2 em parâmetros farmacocinéticos e na segurança do tratamento com tacrolimo e micofenolato de sódio em transplantados renais. In: 43º Congresso da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2016, São Paulo. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2016. v. 48. p. 45-45.
- 2. BONEZI, V.; SALGADO, P. C.; CERDA, A.; HIRATA, M. H.; FELIPE, C. R.; OLIVEIRA, N.; SILVA JUNIOR, H. T.; PESTANA, J. O. M.; FAJARDO, C. M.; GENVIGIR, F. D. V.; DOI, S. Q.; HIRATA, R. D. C. Association of PPP3CA, FKBP5 and FKBP1B mRNA expression in leucocytes with tacrolimus blood levels in kidney transplant recipients. In: XVIII Congresso Farmacêutico de São Paulo, 2015, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. v. 51. p. 104-104.
- 3. SALGADO, P. C. ; GENVIGIR, F. D. V. ; CERDA, A. ; BONEZI, V. ; FELIPE, C. R. ; SILVA JUNIOR, H. T. ; PESTANA, J. O. M. ; DOI, S. Q. ; HIRATA, M. H. ; HIRATA, R. D. C. . Influence of CYP3A5 and PPP3CA polymorphisms on tacrolimus response in the Brazilian kidney transplant recipients. In: XVIII Congresso Farmacêutico de São Paulo, 2015, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. v. 51. p. 109-109.
- 4. BASTOS, G. M. ; LEITE, G. G. S. ; SILVA, J. L. ; SANTOS, J. G. ; BONEZI, V. ; FAJARDO, C. M. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . HspX protein of Mycobacterium tuberculosis enhances the IL-1b mRNA expression and cytokine secretion in macrophage-like THP-1 cultures. In: 23rd European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2013, Berlin. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2013.
- 5. BASTOS, G. M. ; LEITE, G. G. S. ; SILVA, J. L. ; FAJARDO, C. M. ; SANTOS, J. G. ; BONEZI, V. ; FREITAS, K. V. ; MYATA, M. ; SOUZA, W. A. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . PROTEÍNA HSPX DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ALTERA A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A SÍNTESE DE COMPONENTES DA PAREDE CELULAR. In: XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos - SP. XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.

#### Apresentações de Trabalho

- LOS, B. ; FREITAS, R. C. C. ; BORTOLIN, R. H. ; HERNANDEZ, C. D. ; BORGES, J. B. ; BONEZI, V. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . mRNA-microRNA integrated analysis in Familial Hypercholesterolemia using Watson platform and microarray datasets. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 2. BONEZI, V.. Palestra: Dengue Avanços e desafios. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- BONEZI, V.; LIMA, D. S.; BURGER, M.; PEREIRA, L.; FERREIRA, L. C. S.; CORTEZ, M.; NAKAYA, H. T. I.; SILVEIRA, E. L. V.
   B cell signalling on antibody secreting cell differentiation in vitro and in dengue patients. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 4. BONEZI, V.; LIMA, D. S.; BURGER, M.; FAJARDO, C. M.; PEREIRA, L.; FERREIRA, L. C. S.; CORTEZ, M.; NAKAYA, H. T. I.; SILVEIRA, E. L. V. B cell signalling on antibody secreting cell differentiation in vitro and in dengue patients. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 5. BONEZI, V.; LIMA, D. S.; BURGER, M.; FAJARDO, C. M.; PEREIRA, L.; FERREIRA, L. C. S.; CORTEZ, M.; NAKAYA, H. T. I.; SILVEIRA, E. L. V. B cell signalling on antibody - secreting cell differentiation in vitro and in dengue patients. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 6. BONEZI, V.; LIMA, D. S.; BURGMAN, M.; FAJARDO, C. M.; PEREIRA, L.; FERREIRA, L. C. S.; CORTEZ, M.; NAKAYA, H. T. I.; SILVEIRA, E. L. V. B cell signalling on antibody secreting cell differentiation in vitro and in dengue patients. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 7. BONEZI, V.; LIMA, D. S.; BURGER, M.; FERREIRA, L. C. S.; CORTEZ, M.; NAKAYA, H. T. I.; SILVEIRA, E. L. V. B cell signalling on antibody secreting cell differentiation in vitro and in dengue patients. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- SANTOS, M. A.; OLIVEIRA, R.; MORAES, T.; BONEZI, V.; CERDA, A.; SALAZAR, A. B. C.; FAJARDO, C. M.; HIRATA, R. D. C. . Relationship of polymorphisms in the perilipine1, visfatin, resistin and ghrelin genes with the response to the nutritional orientation program for the reduction of body weight. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Demais tipos de produção técnica

1. BONEZI, V.; COSTA, V. L. . Farmacogenômica: a individualização da terapêutica. 2017. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

#### Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

#### Trabalhos de conclusão de curso de graduação

 BORDIGNON, J.; BONEZI, V.; GRECA, A. C. S.. Participação em banca de Theo Duarte dos Santos Goldenberg. Análise in vitro do papel antiviral da naringenina contra o vírus da Febre Amarela. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Pontificia Universidade Católica do Paraná.

#### **Eventos**

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

- 1. II Jornada Acadêmica de Farmácia e Biomedicina Integrando Conhecimentos.Dengue Avancos e desafios, 2018, (Outra).
- I Workshop on Arbovirus Research.B cell signalling on antibody secreting cell differentiation in vitro and in dengue patients. 2018. (Outra).
- São Paulo School of Advanced Science on Vaccines. B cell signalling on antibody secreting cell differentiation in vitro and in dengue patients, 2018, (Outra).
- 4. VIII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas (SIMPAC) ans III International Symposium on Pathophysiology and
- Toxicology (ISPAT).B cell signalling on antibody-secreting cell differentiation in vitro and in Dengue patients. 2018. (Simpósio).
   XXII I Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.B cell signalling on antibody secreting cell differentiation in vitro and in dengue patients. 2018. (Outra).
- XVI Simpósio de Biossegurança e Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino em. 2017. (Simpósio).
   XV Simpósio de Biossegurança e Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino em Pesquisa. 2016. (Simpósio).
- XVIII Congresso Farmacêutico de São Paulo. Association of PPP3CA, FKBP5 and FKBP1B mRNA expression in leucocytes with tacrolimus blood levels in kidney transplant recipients. 2015. (Congresso).
- XIII Simpósio de Biossegurança e Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino em Pesquisa. 2014. (Simpósio).
- 10. Seminários da Comissão de Pesquisa Do sequenciamento de nova ga geração à PCR digital. 2013. (Seminário).
- 11. XII Simpósio de Biossegurança e Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino em Pesquisa. 2013. (Simpósio).
- 12. XVII Congresso Paulista de Farmacêiticos CRF-SP. 2013. (Congresso).
- 13. XI Simpósio de Biossegurança e Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino em Pesquisa. 2012. (Simpósio).
- 14. VI Semana de Farmácia do Centro Universitário São Camilo. 2008. (Seminário).
- 15. Ciclo de Estudos em Farmacoterapia do Centro Universitário São Camilo. 2007. (Encontro).
- 16. V Semana de Farmácia. 2007. (Seminário).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

- BONEZI, V.. II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology & VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas. 2016. (Congresso).
- BONEZI, V.. I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology & VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas. 2015. (Congresso).
- 3. BONEZI, V.. XIV Campanha de Diabetes e Hipertensão da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP. 2014. (Outro).
- 4. BONEZI, V.. XIII Campanha de Diabetes e Hipertensão da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP. 2013. (Outro).
- 5. BONEZI, V.. VII Semana de Assistência Farmacêutica. 2009. (Outro).

### Educação e Popularização de C & T

Cursos de curta duração ministrados

 BONEZI, V.; COSTA, V. L. . Farmacogenômica: a individualização da terapêutica. 2017. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 13/09/2019 às 17:48:28

Imprimir currículo

buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4680186J6

5/5

# Descrição das relações entre moléculas incluídas na hipotética via de diferenciação de células B em plasmablastos durante infecção pelo DENV (Figura 16)

Molécula(s)	Associação	Referência
ERK1 BLIMP1	<ul> <li>Células B murinas deficientes de ERK demonstraram-se incapazes de gerar ASCs afetivamente.</li> <li>Intensas ativações de ERK foram necessárias para iniciar a produção de BLIMP1</li> </ul>	(ALLMAN; CANCRO, 2011)
TAX1BP1 ERK1 BLIMP1	<ul> <li>TAX1BP1 restringe a ativação de ERK e a expressão de BLIMP1</li> <li>Camundongos deficientes de TAX1BP1 apresentam reduzida formação de centros germinativos e menores títulos de anticorpos antígeno-específicos</li> </ul>	(MATSUSHITA et al., 2016)
A20 NF-KB	<ul> <li>A20 demonstrou ser essencial para controlar os sinais indutores de ativação do NF-KB</li> <li>Camundongos deficientes de A20 em suas células B apresentam aumentados números de células B de centros germinativos, autoanticorpos e depósitos de glomerulares de imunoglobulinas</li> <li>Células B deficientes de A20 são hiper-responsivas a múltiplos estímulos e apresentam exagerada resposta de NF-KB</li> </ul>	(TAVARES et al., 2010)
A20	<ul> <li>Células B deficientes de A20 apresentam menores limiares de ativação e aumentada proliferação e sobrevida, de maneira gene-dose-dependente</li> </ul>	(CHU et al., 2011)
LYN IL-6	<ul> <li>LYN é um regulador chave na sobrevida e sinalização de ASCs limitando sua acumulação e autoimunidade</li> <li>Camundongos deficientes de LYN apresentam maiores números de ASCs</li> <li>LYN previne em ASCs sinais excessivos em resposta a IL- 6</li> </ul>	(INFANTINO et al., 2014)
ETS1	Células B deficientes de ETS1 apresentam propensão intrínseca a se diferenciarem em ASCs	(LUO et al., 2014)
BAFF BTK IKK NF-KB	<ul> <li>A perda de BTK resulta em defectivas ativações mediadas por BAFF e NF-KB</li> <li>Camundongos deficientes de BTK apresentam menor sobrevida em suas células B e menor capacidade de resposta humoral.</li> </ul>	(SHINNERS et al., 2007)
ETS1 BLIMP1	<ul> <li>ETS1 regula a diferenciação em ASCs interferindo com a atividade transcricional de BLIMP1</li> </ul>	(JOHN et al., 2008)
NFATC1 NFATC2	<ul> <li>Células B duplamente deficientes de NFATC1 e NFATC2 são hiper-reativas</li> <li>Camundongos deficientes de NFC1 e NFATC2 em suas células B apresentam elevados títulos de IgG1 e IgE, bem como maior expansão de ASCs</li> </ul>	(PENG et al., 2001)
Ca2+ CALCINEURINA STAT3	<ul> <li>Calcineurina é uma serina/treonina fosfatase dependente de Ca2+/calmodulina que desfosforila NFATC1, STAT3 e STAT6</li> </ul>	(YANG et al., 2013)
CALCINEURINA STAT3	Calcineurina efetivamente promove a degradação proteica de STAT3	(MURASE, 2013)
IL-10	<ul> <li>A sinalização de IL-10 promove a diferenciação de células B em secretoras de Ig-M ou Ig-G</li> </ul>	(HEINE et al., 2014)

Molécula(s)	Associação	Referência
IL-6 STAT3 JAK	IL-6 media a ativação de STAT3 através de JAK em células B	(KOPANTZEV et al., 2002)
DOK3	Camundongos deficientes de DOK3 apresentam menores títulos de IgG1-antígeno específico em relação aos selvagens	(OU et al., 2014)
GCN5	<ul> <li>Ensaios de imunopreciptação da cromatina demonstraram que a GCN5 se liga ao gene da IRF4, favorecendo sua transcrição</li> </ul>	(KIKUCHI et al., 2014)
EZH2	<ul> <li>Células B deficientes de EZH2 apresentam diminuída proliferação e inapropriada manutenção de vias inflamatórias</li> <li>ASCs deficientes de EZH2 apresentam inapropriada manutenção da expressão de fatores de transcrição da linhagem de células B e de genes reprimidos por BLIMP1</li> </ul>	(GUO et al., 2018)
SYK TLR4	<ul> <li>Sinais de TLR4 em linfócitos B são transmitidos via BCR e SYK</li> </ul>	(SCHWEIGHOFFER et al., 2017)
P38 GCN5	<ul> <li>Ensaios de imunopreciptação revelaram que P38I9 (molécula adjacente ao P38) se liga ao complexo STAGA do GCN5</li> </ul>	(LIN et al., 2016)
NFAT IRF4 IL-10	<ul> <li>A indução de IRF4 por NFAT leva à expressão de IL-10 em células B</li> </ul>	(RANGASWAMY; SPECK, 2014)
FRA1 BLIMP1 FOS	<ul> <li>A deleção específica de FRA1 em células B resulta em aumentada diferenciação em ASCs e exacerbada resposta de anticorpos</li> <li>FRA1 reprime a expressão de BLIMP1 e interfere com a interação dos membros de ativação AP-1 (como FOS) na região promotora de BLIMP1</li> </ul>	(GRÖTSCH et al., 2014)
BLIMP C-MYC PAX5	BLIMP1 reprime a transcrição de C-MYC e PAX5	(SHAFFER et al., 2002)
NF-KB IDO	<ul> <li>Ensaios de imunoprecipitação cromatina em células dendríticas demonstraram que a subunidade RelB do NF-KB se ligam às sequências consenso ao NF-κB presentes no promotor de IDO1, induzindo sua expressão</li> </ul>	(KIM et al., 2016)
PI3K AKT NS4	<ul> <li>A DENV NS4A demonstrou ser a responsável pela proteção contra a morte celular, induzindo autofagia de maneira dependente de PI3K</li> </ul>	(MCLEAN et al., 2011)
TAX1BP1 NS4A	<ul> <li>Análises utilizando o sistema de duplo-híbrido de levedura reportaram a interação direta entre DENV NS4A e TAX1BP1. A resultante dessa interação não foi descrita</li> </ul>	(KHADKA et al., 2011)
AKT PI3K NF-KB	<ul> <li>Akt regula a atividade transcricional NF-KB, induzindo a fosforilação e a subsequente degradação do seu inibidor IkB.</li> <li>NFkB é importante para a transformação oncogénica induzida por Akt ou PI3K</li> </ul>	(BAI; UENO; VOGT, 2009)
IL-2 ERK BLIMP1 BCL6	<ul> <li>A IL-2 produzida por células T ativou a via ERK em um nível limiar que desencadeou, além da indução da progressão do ciclo celular, a geração de ASCs.</li> <li>A expressão de BACH2 e IRF8 foi regulada negativamente através da via de sinalização MEK-ERK em células B iniciadas por IL-2.</li> <li>A IL-2 reforçou a repressão mútua entre BCL6 e BLIMP1</li> </ul>	(LE GALLOU et al., 2012)
IL-4 BAFF	<ul> <li>A IL-4 e o BAFF fortemente sinergizam para promover a maturação das células B</li> <li>A IL-4 também diminuiu a morte celular mediada por BCR</li> </ul>	(GRANATO et al., 2014)
P53 IFN-B	<ul> <li>O tratamento de fibroblastos com IFN-b aumentou a expressão gênica e proteica de p53 de maneira dose- depoendente</li> </ul>	(TAKAOKA et al., 2003)
IFN-B P53	<ul> <li>a p53 ativada pode combinar diretamente com o fator regulador 9 (IRF9) da via do interferon, o que aumenta o nível de expressão dos genes relacionados ao interferon e o efeito antiviral</li> </ul>	(MUÑOZ-FONTELA et al., 2008)
NF-KB P53	A subunidade p65 do NF-kB, é capaz de induzir a atividade de p53 por ligar-se ao seu promotor	(WU; LOZANO, 1994)

Molécula(s)	Associação	Referência
IDO P38 JNK	P38 e JNK estão envolvidos na indução de IDO1	(OPITZ et al., 2011)
TGF-B AKT NF-KB P38 ERK1/2 JNK	<ul> <li>Os receptores de TGF-β também podem ativar as vias de sinalização não-Smad, como ERK1,2, p38, JNK e NF-kB</li> </ul>	(KRSTIĆ et al., 2015)
TGF-B C-MYC	O proto-oncogene c-myc é reprimido pelo TGF-beta	(FREDERICK et al., 2004)
SOCS3 IDO	<ul> <li>A SOCS3 se ligara à IDO, sinalizando o complexo IDO / SOCS3 para a ubiquitinação e subsequente degradação proteasomal</li> </ul>	(ORABONA et al., 2008)
TGF-B IDO	<ul> <li>O TGF-beta induz à expressão de IDO e transforma células dendríticas de imunogênicas em células tolerogênicas</li> </ul>	(BELLADONNA et al., 2008)
TGF-B IFN-Y	<ul> <li>Vias induzidas por TGF-β1 são importantes para os efeitos inibitórios de TGF-β1 nas respostas de IFN-γ em células T</li> </ul>	(PARK; LETTERIO; GORHAM, 2007)
ERK1/2 BLIMP1	<ul> <li>A constante sinalização do BCR, através do ERK, impede a diferenciação em ASCs por bloquear a expressão de Blimp1</li> </ul>	(RUI et al., 2006)
NS1 TLR4	<ul> <li>A proteína NS1 do DENV é capaz de ativar diretamente receptores do tipo TLR4</li> </ul>	(MODHIRAN et al., 2015, 2017)
IRF4 STAT3	<ul> <li>Triagens de genes modulados por STAT3 identificaram o IRF4</li> </ul>	(BANDINI et al., 2018)
BLIMP1 STAT3 BCL6	<ul> <li>O STAT3 demonstrou diretamente induzir o aumento da expressão de BLIMP1, independente da expressão de BLC6</li> </ul>	(SCHMIDLIN et al., 2008)
IL6 IL10 STAT3 JAK	<ul> <li>A via de sinalização do STAT3 pode ser ativada por uma série de citocinas, entre elas a IL10 e a IL6. O engajamentos dessas com seus receptores resulta na fosforilação de JAKs que, em consequência, fosforilam o STAT3, ativando-o.</li> </ul>	(SCHINDLER; LEVY; DECKER, 2007)
EIF2α	<ul> <li>O desenvolvimento e a função das ASCs são comprometidas com a fosforilação deficiente de eIF2α</li> </ul>	(MIELKE et al., 2011)
EIF2α GCN2	<ul> <li>O esgotamento do TRP no meio ativa a GCN2, fosforilando e ativando a EIF2α</li> </ul>	(FOUGERAY et al., 2012)
IDO EIF2α BLIMP1	<ul> <li>A depleção de triptofano mediada por IDO leva a ativação de EIF2 α</li> <li>A EIF2α tem como alvo o fator transcricional Blimp1</li> <li>Blimp1 se liga ao promotor de IDO e reprime sua resposta</li> </ul>	(BARNES et al., 2009)
IL6 IDO JAK STAT3	IL-6 induz expressão de IDO1 através da via JAK / STAT	(KIM et al., 2012)
NS1 STAT3	A DENV NS1 mostrou ser capaz de interagir com STAT3	(LIU; NG, 2008)

# Detecção de partículas infectivas no sobrenadante das culturas por titulação

AMOSTRA	TÍTULO VIRAL (FFU/mL)	AMOSTRA	TÍTULO VIRAL (FFU/mL)
PBMC + DV-3 #1	-	PBMC + ZIKA PE243 #16	3,20E+03
PBMC + DV-3 #2	-	PBMC + ZIKA MR766 #1	5,00E+02
PBMC + DV-3 #3	-	PBMC + ZIKA MR766 #2	4,00E+02
PBMC + DV-4 TVP #1	-	PBMC + ZIKA MR766 #3	5,00E+02
PBMC + DV-4 TVP #2	-	PBMC + ZIKA MR766 #4	2,50E+03
PBMC + DV-4 TVP #3	-	PBMC + ZIKA MR766 #5	1,75E+03
PBMC + DV-4 TVP #4	1,20E+01	PBMC + ZIKA MR766 #6	2,30E+03
PBMC + DV-4 TVP #5	-	PBMC + ZIKA MR766 #7	2,60E+03
PBMC + DV-4 TVP #6	-	PBMC + ZIKA MR766 #12	3,80E+03
PBMC + DV-4 TVP #7	-	PBMC + ZIKA MR766 #13	1,30E+04
PBMC + DV-4 TVP #8	2,10E+02	PBMC + ZIKA MR766 #14	1,65E+03
PBMC + DV-4 TVP #9	-	PBMC + ZIKA MR766 #15	4,38E+03
PBMC + DV-4 TVP #10	-	PBMC + ZIKA MR766 #16	2,10E+04
PBMC + DV-4 TVP #11	-	PBMC + YFV 17DD #1	-
PBMC + DV-4 TVP #12	-	PBMC + YFV 17DD #2	-
PBMC + DV-4 TVP #13	-	PBMC + YFV 17DD #3	-
PBMC + DV-4 TVP #14	-	PBMC + YFV 17DD #4	-
PBMC + DV-4 TVP #15	-	PBMC + YFV 17DD #5	-
PBMC + DV-4 TVP #16	1,20E+01	PBMC + YFV 17DD #6	-
PBMC + DV-4 422 #4	-	PBMC + YFV 17DD #7	-
PBMC + DV-4 422 #5	-	PBMC Mock #1	-
PBMC + DV-4 422 #6	-	PBMC Mock #2	-
PBMC + DV-4 422 #7	-	PBMC Mock #3	-
PBMC + DV-4 422 #12	-	PBMC Mock #4	-
PBMC + DV-4 422 #13	-	PBMC Mock #5	-
PBMC + DV-4 422 #14	-	PBMC Mock #6	-
PBMC + DV-4 422 #15	-	PBMC Mock #7	-
PBMC + DV-4 422 #16	-	PBMC Mock #8	-
PBMC + ZIKA PE243 #1	-	PBMC Mock #9	-
PBMC + ZIKA PE243 #2	-	PBMC Mock #10	-
PBMC + ZIKA PE243 #3	-	PBMC Mock #11	-
PBMC + ZIKA PE243 #4	3,60E+03	PBMC Mock #12	-
PBMC + ZIKA PE243 #5	2.10E+02	PBMC Mock #13	-
PBMC + ZIKA PE243 #6	1.20E+03	PBMC Mock #14	-
PBMC + ZIKA PF243 #7	2.20E+03	PBMC Mock #15	
PBMC + 7IKA PF243 #12	5.00E+02	PBMC Mock #16	_
PBMC + 7IKA PE243 #13	1 30F±03	PBMC + Mit #1	_
PRMC + 7IKA DE2/3 #13	5 75E±02		
	3,73ETU2		-
PDIVIC + ZINA PE243 #15	2,00E+02		-

AMOSTRA	TÍTULO VIRAL (FFU/mL)	AMOSTRA	TÍTULO VIRAL (FFU/mL)
PBMC + Mit #4	-	PBMC + TVP inativado #14	-
PBMC + Mit #5	-	PBMC + TVP inativado #15	-
PBMC + Mit #6	-	PBMC + TVP inativado #16	-
PBMC + Mit #7	-	Controle positivo dia 1 (DENV4 TVP	2,30E+06
PBMC + Mit #8	-	PBMC + B + TVP moi 10 #4	-
PBMC + Mit #9	-	B + TVP moi 10 #6	-
PBMC + Mit #10	-	B + TVP moi 10 #7	-
PBMC + Mit #11	-	B + TVP moi 1 #4	-
PBMC + Mit #12	-	B + TVP moi 1 #5	-
PBMC + Mit #13	-	B + TVP moi 1 #6	-
PBMC + Mit #14	-	B + TVP moi 1 #7	-
PBMC + Mit #15	-	B + mo + TVP #8	-
PBMC + Mit #16	-	B + mo + TVP #9	-
PBMC + <b>TVP</b> inativado #8	-	B + mo + TVP #10	-
PBMC + TVP inativado #9	-	B + mo + TVP #11	-
PBMC + <b>TVP</b> inativado #10	-	PBMC + TVP #17	-
PBMC + <b>TVP</b> inativado #11	-	PBMC + TVP #18	-
PBMC + <b>TVP</b> inativado #12	-	PBMC + TVP #0	-
PBMC + <b>TVP</b> inativado #13	-	Controle positivo dia 2 (DENV4 TVP)	3,75E+06

Detecção de RNA viral no interior das células por PCR quantitativa



Detectção de RNA viral no interior de PBMCs infectadas com DENV4 TVP/360 (MOI:10). PBMCs humanas foram isoladas através de centrifugação em gradiente de histopaque e mantidas em cultura por 7 dias após infecção pelo vírus da Dengue sorotipo 4, cepa TVP/360 (DENV4 TVP/360), MOI:10, durante 1 hora, seguido de remoção do inóculo viral e lavagem das células. Após 7 dias, essas células foram recuperadas e o RNA foi extraído utilizando o reagente de TRIzol<sup>™</sup> Reagent (Invitrogen). Após a síntese do DNA complementar, as análises de expressão gênica foram realizadas através de reações em cadeia em tempo real e a carga viral estimada com base em um controle positivo de FFU conhecido. FFU: unidades formadoras de foco.





Esquema representativo das vias de metabolismo do triptofano, incluindo seus principais metabólitos e enzimas. As setas indicam conversão de uma molécula em outra. Os números posicionados ao lado das setas indicam as enzimas responsáveis por esta conversão. A nomenclatura das enzimas endicadas pelos números está disponibilizada na parte inferior da figura. As linhas pontilhadas delimitam as moléculas envolvidas nas três principais vias de metabolismo do triptofano: via da quinurenina, via da serotonina e via da triptamina. Os metabólitos avaliados neste trabalho foram destacados em negrito.



Metabólitos do triptofano que não apresentaram diferença (p>0,05) na sua quantificação entre os diferentes tratamentos

Análise quantitativa dos metabólitos do triptofano no sobrenadante de culturas de PBMCs estimuladas por mitógenos ou infectadas por DENV4 TVP/360. O sobrenadante de culturas de PBMCs estimuladas com mitógenos ou infectadas por DENV4 TVP/360 (MOI:10) após 7 dias foi avaliado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo LC-MS/MS. Dados apresentados na forma de valores individuais da área do pico (círculos; n=19) e mediana (linha) e estatisticamente comparados de forma pareada por teste Friedman e pós teste Dunn's. A linha pontilhada de cada gráfico representa a quantificação daquele metabólito em um meio de cultura mantido nas mesmas condições experimentais, entretanto, sem a presença de nenhuma célula (branco). SER: serotonina; TRY: triptamina; XA: ácido xanturênico; IAA: ácido indoleacético. Mock: grupo estimulado com o sobrenadante de culturas de células de mosquito C6/36 não infectadas; equivalente ao veículo dos modelos de infecção.