



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Isabela Cinquini Junqueira

**Participação de anticorpos anti-DENV na imunopatogênese da
dengue e produção de anticorpos monoclonais anti-flavivírus**

**Goiânia
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☐ Dissertação ☒ Tese ☐ Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Isabela Cinquini Junqueira

3. Título do trabalho

Participação de anticorpos anti-DENV na imunopatogênese da dengue e produção de anticorpos monoclonais anti-flavivírus

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Cinquini Junqueira, Usuário Externo**, em 05/01/2024, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celina Maria Turchi Martelli, Usuário Externo**, em 26/01/2024, às 08:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4298508** e o código CRC **59734D64**.

Isabela Cinquini Junqueira

Participação de anticorpos anti-DENV na imunopatogênese da dengue e produção de anticorpos monoclonais anti-flavivírus

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Área de concentração: Imunologia

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Celina Maria Turchi Martelli

Co-orientador (a): Prof^a. Dr^a. Lucimeire Antonelli da Silveira

Prof^a. Dr^a. Valeria Christina de Rezende Féres

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Junqueira, Isabela Cinquini

Participação de anticorpos anti-DENV na imunopatogênese da
dengue e produção de anticorpos monoclonais anti-flavivírus
[manuscrito] / Isabela Cinquini Junqueira. - 2018.

CXXI, 121 f.: il.

Orientador: Prof. Celina Maria Turchi Martelli; co-orientador
Lucimeire Antonelli da Silveira; co-orientador Valeria Christina de
Rezende Féres.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2018.
Bibliografia. Anexos.

1. Dengue. 2. imunopatogênese. 3. dengue grave. 4. anticorpos
monoclonais. 5. hibridoma. I. Martelli, Celina Maria Turchi , orient. II.
Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE ISABELA CINQUINI JUNQUEIRA - Aos sete dias do mês de novembro do ano de 2018 (07/11/2018), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. LUCIMEIRE ANTONELLI DA SILVEIRA, JOÃO BOSCO SIQUEIRA JÚNIOR, HELIOSWILTON SALES CAMPOS, TATSUYA NAGATA e ÂNGELA FERREIRA LOPES, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“PARTICIPAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-DENV NA IMUNOPATOGÊNESE DA DENGUE”** em nível de **DOCTORADO**, área de concentração em **IMUNOLOGIA**, de autoria de **ISABELA CINQUINI JUNQUEIRA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Coorientadora Profa. Dra. LUCIMEIRE ANTONELLI DA SILVEIRA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira

Prof. Dr. João Bosco Siqueira Júnior

Prof. Dr. Helioswilton Sales Campos

Prof. Dr. Tatsuya Nagata

Profa. Dra. Ângela Ferreira Lopes

Aprovado / Reprovado

Aprovada

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOCTORA EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **IMUNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, POLLYANA REZENDE AQUINO, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Participação de anticorpos anti-DENV na imunopatogênese da dengue e produção de anticorpos monoclonais anti-flavivírus

Profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira (IPTSP/UFG) Lucimeire Antonelli da Silveira

Prof. Dr. João Bosco Siqueira Júnior (IPTSP/UFG) João Bosco Siqueira Júnior

Prof. Dr. Helioswilton Sales Campos (IPTSP/UFG) Helioswilton Sales Campos

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (IPTSP/UFG) Tatsuya Nagata

Profa. Dra. Ângela Ferreira Lopes (FF/UFG) Ângela Ferreira Lopes

Secretário da Pós-Graduação: Pollyana Rezende Aquino

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Isabela Cinquini Junqueira

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Celina Maria Turchi Martelli

Co-orientador (a): Prof^a. Dr^a. Lucimeire Antonelli da Silveira

Prof^a. Dr^a. Valeria Christina de Rezende Féres

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Lucimeire Antonelli da Silveira

2. Prof. Dr. João Bosco Siqueira-Júnior

3. Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos

4. Prof. Dr. Tatsuya Nagata

5. Prof(a). Dr(a). Ângela Ferreira Lopes Teive e Argolo

Data: ____/____/____

Aos meus pais, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sustentar meu ânimo e determinação a cada novo dia.

À minha família pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida e segurança de ter sempre em vocês, um porto seguro.

À Christina Rodrigues, pelas trocas de experiência, palavras e incentivo e sabedoria, mas, acima de tudo, por ter se tornado mais que uma amiga.

Aos amigos de sempre e alguns mais recentes, pela alegria de poder contar com vocês em minha vida.

À professora Lucimeire Antonelli da Silveira pela confiança e ensinamentos.

Às professoras Valéria Christina de Rezende Féres e Celina Maria Turchi Martelli pela oportunidade e auxílio nesse trabalho.

À FAPEG, CnPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ANEXOS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	Xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia.....	1
1.2 História natural da doença.....	4
1.3 Manifestações clínicas.....	5
1.4 Partícula Viral.....	7
1.5 Vacina da dengue.....	9
1.6 Resposta Imune contra o vírus e imunopatogênese.....	11
1.6.1 Imunidade inata.....	11
1.6.2 Imunidade celular.....	12
1.6.3 Imunidade humoral e fenômeno ADE.....	15
1.6.4 Fenômeno de Autoimunidade.....	17
1.6.5 Anticorpos Neutralizantes.....	17
1.7 Subclasses de IgG.....	20
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25

3.2 Objetivos específicos.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Artigo 1.....	27
4.2 Artigo2.....	46
4.3 Patente.....	63
5 DISCUSSÃO.....	85
6 CONCLUSÕES.....	89
7 REFERÊNCIAS.....	90
ANEXO A – Parecer do comitê de ética.....	118
ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo.....	119

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ANEXOS

FIGURAS

- Figura 1: Média do número de casos de dengue notificados entre os anos de 2010 a 2016. 1
- Figura 2: Número de casos notificados de dengue no Brasil ao longo dos anos. 3
- Figura 3: Participação de anticorpos anti-DENV na imunopatogênese da dengue. 88

Artigo 1

- Figure 1: Serum IgG1 and IgG3 and DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 amount in dengue different clinical forms, during acute phase. 35
- Figure 2: DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 antibodies in dengue different clinical forms, during critical phase. 36
- Figure 3: Serum IgG1 and IgG3 and DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 amount in dengue different clinical forms, during convalescent phase. 37
- Figure 4: Serum IgG1 and IgG3 and DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 amount in dengue different clinical forms, during late convalescent phase. 38

Artigo 2

- Figura 1: Correlação entre quantidade de IgG com a contagem de plaquetas/leucocitos na fase aguda e de convalescência da infecção. 53
- Figura 2: Correlação entre quantidade de IgM com a contagem de plaquetas/leucocitos na fase aguda da infecção. 54
- Figura 3: Correlação entre a quantidade de NS1 com o TAP na fase aguda da 55

infecção.

Patente

Figura 1:Ensaio de SNRP₅₀ com ZIKV e com os anticorpos produzidos pelos 68
hibridomas 2D4E3, 2D4F3, 2D4D2.

Figura 2:Ensaio de SNRP₅₀ com DENV-1 e com os anticorpos produzidos pelos 68
hibridomas 2D4E3, 2D4F3, 2D4D2.

Figura 3:Ensaio de SNRP₅₀ com DENV-2 e com os anticorpos produzidos pelos 69
hibridomas 2D4F3, 2D4D2

Figura 4:Ensaio de SNRP₅₀ com DENV-3 e com os anticorpos produzidos pelos 70
hibridomas 2D4E3, 2D4F3, 2D4D2

Figura 5: Titulação dos anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4F3, 2D4E3, 71
2D4D2.

Figura 6: Curva de crescimento celular dos hibridomas 2D4E3, 2D4F3, 2D4D2. 79

Figura 7: Curva de viabilidade dos hibridomas 2D4E3, 2D4F3, 2D4D2. 80

Figura 8: Cinética de produção de anticorpos dos hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 81
2D4D2.

TABELAS

Artigo 1

Table 1: Patients characteristics: gender, age and clinical manifestation. 32

Table 2: Antibodies levels in Dengue Fever samples. 34

Table 3: Antibodies levels in Dengue with complication samples. 34

Table 4: Antibodies levels in Dengue Hemorrhagic Fever samples.	35
---	----

Artigo 2

Tabela 1: Características da população de estudo: distribuição por gênero, idade e formas clínicas da dengue.	50
---	----

Tabela 2: Quantidade de leucócitos, plaquetas, IgG, IgM, proteína NS1 e medida do TAP entre as diferentes formas clínicas da dengue na fase aguda da doença.	51
--	----

Tabela 3: Quantidade de leucócitos, plaquetas, IgG e medida do TAP entre as diferentes formas clínicas da dengue na fase de convalescência da doença.	52
---	----

Tabela 4: Correlação entre imunoglobulinas e plaquetas/leucócitos na fase aguda da infecção, nas diferentes formas clínicas da dengue.	56
--	----

Patente

Tabela 1: Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto aos isótipos de cadeia leve e pesada.	75
--	----

Tabela 2: Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto à especificidade.	76
--	----

Tabela 3: Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto à capacidade de ligação ao DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.	77
--	----

Tabela 4: Estabilidade do hibridoma quanto à capacidade de produção de anticorpos durante o tempo em cultura.	78
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCC – do inglês “*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*”; Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos

ADE- do inglês “*antibody-dependent enhancement*”; Amplificação da infecção mediada por anticorpos

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

ATCC- do inglês “*American Type culture collection*”; Coleção Americana de Tipos de cultura

CEPRACO- Centro de Produção de anticorpos do Centro-Oeste

CYD-TDV- Dengvaxia

DC- Dengue clássica

DCC- Dengue com complicações

DEMEM- do inglês “*Dulbecco Modified Eagle’s medium*”; meio de cultura Dulbecco modificado

DG – Dengue grave

DO- Densidade óptica

DAS- Dengue com sinais de alarme

ED – Domínios do envelope

ELISA- Ensaio imunoenzimático

FC – Fragmento cristalizável

FcγR- Receptor Fc gama

FcRs- receptores Fc

FD- Febre do dengue

FHD- Febre hemorrágica do dengue

FT- Fator tecidual

g- gravidade

HPRT- hipoxantina-fosforribosil transferase

ICAM –Molécula de adesão intracelular

IFN – Interferon

IgG – imunoglobulina G

IgM –imunoglobulina M

IL- Interleucina

INIP- Instituto Nacional da Propriedade Industrial

IPTSP/UFG- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ Universidade Federal de Goiás

Kb –Kilobase

L15- Leibovitz

LT – linfócitos/células T

LTC- Linfócitos T citolíticos

LT CD4+ - Linfócitos/células T CD4+

LT CD8- Linfócitos/células T CD8+

M – Molar

Mabs- do inglês “*monoclonal antibody*”; anticorpo monoclonal

MCP-1 – proteína quimioatrativa de monócitos

NK- Células natural killers

nm - Nanômetros

NS- Proteína não estrutural

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde

OPD – ortofenildiamina

PAI-1 – inibidor da ativação do plasminogênio

PBS – Tampão fosfato-salino

PEG- polietilenoglicol

PH – Potencial hidrogeniônico

prM- Precursora da proteína M

proteína C – Proteína do core

proteína E- Proteína do envelope

proteína M – proteína de membrana

R²- coeficiente de determinação

RNA- Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

SFB- Soro Fetal Bovino

SNRP – reação de soroneutralização com redução de placas

SCD- Síndrome do choque do dengue

TGF – Fator de crescimento transformador

TNF – Fator de necrose tumoral

VCAM – Molécula de adesão celular-vascular

VEGF- Fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

A dengue é uma doença viral com diferentes manifestações clínicas, cujos sintomas podem variar desde uma infecção branda até uma síndrome mais grave, caracterizada por distúrbios hematológicos que colocam em risco a vida do paciente. Diversos mecanismos são propostos com envolvimento na gravidade da dengue, entre eles, os fenômenos ADE (“antibody dependent enhancement”) e da autoimunidade induzida pelo vírus. De acordo com a teoria do ADE, em infecções secundárias pelo DENV, anticorpos heterólogos falhariam em neutralizar o vírus e formariam imunocomplexos DENV-anticorpos que se ligariam às células que expressam receptores Fc γ , facilitando a internalização e replicação viral, com consequente agravamento da doença. Já a teoria da autoimunidade induzida pelo DENV sugere que anticorpos anti-partícula viral reagiriam com componentes do organismo hospedeiro, devido à mimetismo molecular entre plaquetas, células endoteliais e moléculas do sistema coagulatório com proteínas virais, tendo como consequência a depleção destes constituintes celulares, contribuindo para o aumento da permeabilidade capilar e/ou trombocitopenia característicos da doença. Além da busca pela compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da dengue é necessário também o desenvolvimento de uma terapia antiviral específica. Até o momento, o tratamento dos pacientes com a doença restringe-se ao alívio dos sintomas e cuidados de suporte. Uma estratégia de tratamento seria a utilização de anticorpos monoclonais na imunoterapia. Sendo assim, nosso trabalho se propôs ao estudo destes dois distintos mecanismos possivelmente envolvidos na imunopatogênese da dengue, através da análise, em pacientes com as diferentes formas clínicas da dengue, do perfil de anticorpos IgG-DENV específicos e IgG1 e IgG3 séricos e DENV-específicos e da correlação entre a contagem de plaquetas e leucócitos com a concentração de anticorpos IgG e IgM DENV-específicos. Além disso, propusemos a produção de um anticorpo anti-flavivírus. Nossos resultados apontam para o possível envolvimento de anticorpos em diferentes mecanismos da imunopatogênese da dengue e sugerem o acompanhamento da cinética destes anticorpos para sinalização de um prognóstico menos favorável da doença. A dosagem de IgG DENV-específica, um dos biomarcadores de gravidade apontados neste estudo, requer na técnica padronizada a utilização de anticorpos anti-flavivírus na fase sólida do ensaio imunoenzimático. Os

anticorpos anti-flavivírus produzidos neste estudo demonstraram potencial de serem empregados futuramente para este fim ou em uma perspectiva de terapia humana.

Palavras-chave: anticorpo monoclonal, resposta humoral, flavivírus, dengue grave

ABSTRACT

Dengue is a viral disease with different clinical manifestations, which symptoms vary from a mild infection to a more severe syndrome characterized by haematological disorders that can endanger patient's life. Several mechanisms are proposed to be involved in dengue severity, among them, the antibody dependent enhancement (ADE) and virus-induced autoimmunity phenomena. According to ADE theory, in DENV secondary infections, heterologous antibodies would fail in neutralizing the virus and form DENV-immunocomplexes that bind to Fc γ receptors bearing-cells, facilitating viral internalization and replication, with consequent disease aggravation. The DENV-induced autoimmunity theory suggests that antibodies against viral particles would react with components of host organism due to molecular mimicry between platelets, endothelial cells and molecules of the coagulatory system with viral proteins, resulting in these cells depletion, contributing with the increase in capillary permeability and/or thrombocytopenia that are typical in this disease. In addition to the search for understanding the mechanisms involved in dengue pathogenesis it is also necessary the development of a specific antiviral therapy. To date, patients' treatment is restricted to the relief of symptoms and supportive care. A possible treatment strategy would be the utilization of monoclonal antibodies in immunotherapy. Therefore, with this work, we proposed to study these two distinct mechanisms possibly involved in dengue immunopathogenesis, through the analysis of the profile of IgG DENV-specific antibodies and serum/DENV-specific IgG1 and IgG3 and the correlation between platelet and leukocyte counts with DENV-specific IgG and IgM antibodies concentration in patients with dengue different clinical manifestations. Furthermore, we proposed the production of an anti-flavivirus monoclonal antibody. Our results point to a possible involvement of antibodies in different mechanisms of dengue immunopathogenesis and suggest monitoring these antibodies kinetics for signaling a less favorable prognosis for the disease. DENV-specific IgG dosage, one of the severity biomarkers revealed in this study, requires in the immunoenzymatic-standardized assay the addition of anti-flavivirus antibodies in the solid phase. The anti-flavivirus antibodies produced in this study demonstrated a potential employment for this purpose or in a future human therapy.

Keywords: monoclonal antibody, humoral response, flavivirus, severe dengue

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A dengue é uma doença endêmica em mais de 128 países de climas tropicais e subtropicais na região do Pacífico ocidental, Ásia, oeste do Mediterrâneo, América do Sul e Central e África, sendo a América, Ásia e o Pacífico ocidental, as regiões mais seriamente afetadas (Figura 1). Estima-se que aproximadamente 390 milhões de infecções ocorram a cada ano e que cerca de 3,9 bilhões de indivíduos, ou seja, aproximadamente metade da população mundial, habitem áreas onde há risco de transmissão (BRADY et al., 2012; BHATT et al., 2013).

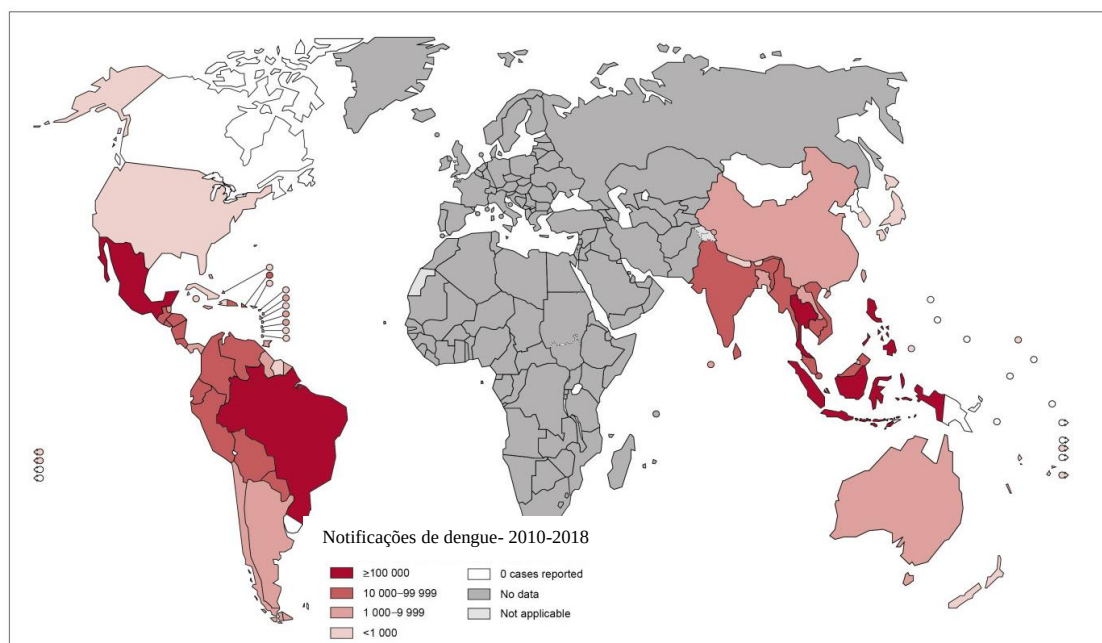


Figura 1: Média do número de casos de dengue notificados entre os anos de 2010 a 2016 (WHO, 2016, com modificações).

Desde a Segunda Guerra Mundial a dengue é um problema de saúde pública no sudeste Asiático, com a maior incidência da doença ocorrendo no Vietnã, Tailândia e nas Filipinas (OOI; GUBLER, 2009; NISALAK et al., 2003). Além disso, a maioria dos casos de Febre hemorrágica da dengue (FHD) também ocorre na Ásia, onde a doença é a principal causa de hospitalizações e óbitos entre crianças (STIASNY et al., 2011).

A região das Américas é responsável pela maior parte das notificações de dengue à Organização Mundial de Saúde (OMS), e o Brasil, o país com maior número de casos do continente. No entanto, a Ásia e o Pacífico Ocidental permanecem sendo os responsáveis pelo maior volume de óbitos (SAN MARTÍN et al., 2010; BRADY et al., 2012; BHATT et al., 2013).

Em contraste com a distribuição etária da FHD nos países Asiáticos, nos quais ocorre principalmente em crianças (RICO-HESSE et al., 1997; PERIAGO; GUZMÁN, 2007), dengue e FHD nas Américas afetam mais comumente adultos (SAN MARTÍN et al., 2010).

Nos últimos anos, o continente Americano tem apresentado um aumento exponencial no número de casos de dengue. Em 2015, foram notificados o maior número de casos da doença, excedendo 1 milhão de notificações, com uma incidência média de 198 casos/100 mil habitantes. Neste mesmo ano, o cone Sul contribuiu com 87% dos casos da América e o Brasil, sozinho, foi responsável por 85% dos casos do continente, com uma incidência de 507,9 casos de dengue/ 100 mil habitantes (PAHO 2018). Apesar deste aumento histórico, o número de casos de doença grave (2.824) e óbitos (459) se mantiveram, em 2015, abaixo do que foi observado em 2014, ano em que foram notificados o segundo maior número de casos de dengue da história. As sub-regiões das Américas que apresentaram maior número de casos graves foram a Norte e Central, contribuindo com mais da metade dos casos do continente. No entanto, o cone Sul apresentou o maior número de casos fatais, 82% dos casos (378 óbitos), todos ocorridos no Brasil (PAHO, 2018).

Todos os quatro sorotipos do DENV circulam na região da América Latina e Caribe. Acredita-se que isto tem contribuído para este aumento que vem ocorrendo ultimamente no número de populações afetadas e epidemias pela dengue na região. Também acredita-se que a co-circulação de diferentes sorotipos pode estar associada com o aumento da prevalência de casos mais graves de dengue (CASTAÑEDA et al., 2017; GOMES et al., 2017).

A primeira epidemia de dengue no Brasil data de 1982 em Boa Vista, Roraima (OSANAI et al., 1983). A partir de 1986, epidemias explosivas ocorreram em grandes centros urbanos das cinco regiões do país (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986; NOGUEIRA et al., 1993; VASCONCELOS et al.,

1995). A partir de 1994, uma nova tendência foi observada com a rápida dispersão do vetor no território nacional e a expansão da doença para os municípios do interior.

No Brasil a dengue apresenta ciclos epidêmicos a cada 3-5 anos com concomitante aumento dos casos de FHD e óbitos. Outra tendência, com o passar dos anos e a consolidação da doença na região, foi a elevação dos picos de incidência, ou seja, aumento do número de casos (Figura 2). Além disso, no Brasil também é possível se observar um padrão sazonal do vírus, no qual a maioria dos casos se concentram na primeira metade do ano, com o pico nos meses de março e abril (SAN MARTÍN et al., 2010) época de chuva e temperaturas mais elevadas.

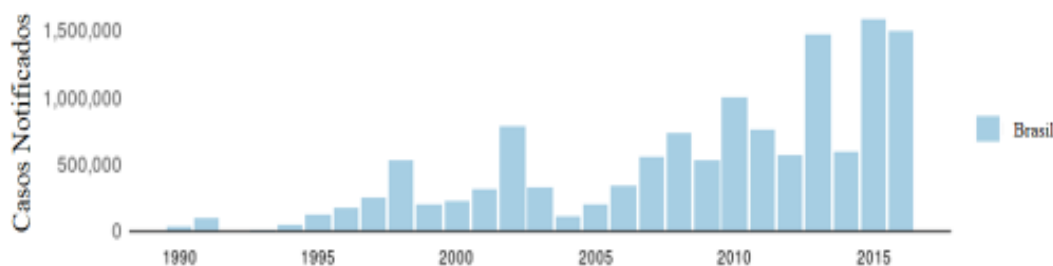


Figura 2: Número de casos notificados de dengue no Brasil ao longo dos anos (WHO, 2016, modificado)

A dengue, no Brasil, é uma doença de notificação compulsória de casos suspeitos. Dados de soroprevalência revelam subnotificação dos casos, principalmente os sintomáticos brandos e com sintomatologia inespecífica. De acordo com estudos realizados em Recife, estima-se que somente 10% das infecções são notificadas (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011). Outro estudo, conduzido em Belo Horizonte entre os anos de 1996-2006, constatou que o número de casos soropositivos para dengue era 2,5 vezes superior ao de casos notificados (PESSANHA et al., 2010). Assim, deduz-se que, apesar de alarmantes, os dados de incidência de casos de dengue no Brasil são subestimados.

No ano de 2018, até a semana epidemiológica 23, a região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos prováveis de dengue (60.445 casos, 37,5%) em relação ao total de casos do Brasil. Em seguida, vieram as regiões Sudeste (30,6%),

Nordeste (23,7%), Norte (6,7%) e Sul (1,4%). Neste período, a região Centro-Oeste apresentou também a maior taxa de incidência de casos prováveis de dengue (380,7 casos/100 mil habitantes) seguida pela região Nordeste (66,8 casos/100 mil habitantes). Entre as Unidades da Federação, destacou-se Goiás, com 762,2 casos/100 mil habitantes. Entre os municípios do país com as maiores incidências de dengue registradas até esta semana epidemiológica, segundo estrato populacional acima de 1 milhão de habitantes, destacou-se Goiânia-GO, com 725,1 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2018).

Como observado, na cidade de Goiânia/GO existe uma intensa circulação do vírus da dengue. A prevalência de anticorpos específicos para este vírus na população da cidade no ano de 2002 foi de 37,3% (SIQUEIRA-JÚNIOR et al., 2008). Estudo posterior realizado durante a epidemia de 2012-2013, durante a qual houve a introdução do DENV-4 no estado, observou-se que apenas 15% da população de estudo apresentava uma resposta monotípica, enquanto que para 85%, a resposta desenvolvida era multítípica (ARGOLO et al., 2016).

1.2 História Natural da doença

O vírus da dengue possui um período de incubação de cerca de 4-7 dias, após o qual se segue o início abrupto da doença, (CDC, 2012) que pode ser dividida em 3 fases: febril, crítica e de recuperação (WHO, 2012).

A fase febril tem duração de 5-7 dias e se caracteriza por febre alta, dor retro-orbital, dor de cabeça, atalgia, mialgia, mal-estar, náuseas e vômitos (KALAYANAROOJ et al., 1997; WHO, 2012). Em muitos pacientes, a fase febril é seguida da fase de recuperação. A principal alteração laboratorial neste período é a diminuição progressiva no número de plaquetas.

A fase crítica tem início a qualquer momento entre o 3º-7º dia a partir do início da febre e prolonga-se por 24-48 horas. O marcador fisiopatológico deste estágio é o aumento da permeabilidade capilar com extravasamento de fluidos (STEPHENSON, 2005). A febre caracteristicamente diminui no início deste período. O choque pode ocorrer por dois motivos nesta fase, devido a um sangramento interno e ao aumento do extravasamento de fluidos sem a reposição adequada (WHO, 2012).

A fase seguinte à crítica é a fase de recuperação, compreendendo um período de 48-72 horas após a fase anterior. Nesse momento, os fluidos extravasados retornam para o compartimento intravascular (WHO, 2012) e, caso não tenha ocorrido administração correta de fluidos, o paciente pode desenvolver falência cardíaca e edema pulmonar (PREMARATNA et al., 2011). Óbitos podem ocorrer tanto por excesso de fluidos quanto por hemorragia ou extravasamento de plasma. Uma vez que ocorra correta reposição de líquidos, a recuperação é rápida.

Na fase de convalescência, um exantema eritematoso e com prurido pode ser observado em alguns pacientes. Neste período o número de plaquetas sobe rapidamente (NIMMANNITYA, 1987; WHO, 2012).

1.3 Manifestações clínicas

A infecção com um dos 4 sorotipos do DENV pode ser silenciosa, uma febre indiferenciada ou uma doença branda conhecida como febre do dengue (FD). A infecção também pode evoluir para uma síndrome mais grave conhecida como febre hemorrágica do dengue/ síndrome do choque do dengue (FHD/SSD) (WHO, 1997; RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

De acordo com a classificação da OMS do ano de 1997 a dengue clássica (DC) é definida como uma doença febril aguda com dois ou mais dos seguintes sintomas: dor de cabeça, dor retro orbital, mialgia, artralgia, *rash* e manifestações hemorrágicas (WHO, 1997).

A FHD se caracteriza como febre com trombocitopenia (contagem de plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$), qualquer manifestação hemorrágica ou prova do laço positiva e evidência de extravasamento de plasma (determinado por aumento em 20% do hematócrito ou pela presença de derramamento pleural ou abdominal ou hipoalbuminemia). A FHD foi categorizada em 4 graus de severidade, grau 1 – prova do laço positiva evidenciada como única manifestação hemorrágica; grau 2 – sangramento espontâneo; grau 3 – hipotensão, inquietação, pulso fraco e acelerado; grau 4 – choque, pressão sanguínea e pulso indetectáveis (WHO, 1997).

A categoria dengue com complicações (DCC) foi determinada no Guia do Programa de Controle Brasileiro do Ministério da Saúde e compreende pacientes que

não preencheram os critérios da OMS para FHD e no caso da classificação de dengue clássica ser insatisfatória. A presença de um dos seguintes achados caracteriza este quadro: alterações graves do sistema nervoso; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; plaquetopenia igual ou inferior a $50.000/\text{mm}^3$; hemorragia digestiva; derrames cavitários; leucometria global igual ou inferior a $1.000/\text{mm}^3$; óbito. Manifestações clínicas do sistema nervoso, presentes tanto em adultos como em crianças, incluem: delírio, sonolência, coma, depressão, irritabilidade, psicose, demência, amnésia, sinais meníngeos, paresias, paralisias, polineuropatias, síndrome de Reye, síndrome de Guillain-Barré e encefalite. Estes sintomas podem surgir no decorrer do período febril ou mais tardiamente, na fase de convalescença (BRASIL, 2005).

Em concordância com o guia “Dengue: diretrizes para diagnóstico, tratamento, prevenção e controle” proposto pela OMS em 2009 e que entrou em vigor no Brasil a partir de janeiro de 2014, os casos de dengue passaram a ser classificados nos seguintes grupos: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave (WHO, 2009).

Um caso de dengue inclui uma pessoa que esteja sob risco de infecção e apresente febre (2 -7 dias) e duas ou mais das seguintes manifestações: náusea, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaleia, dor retro orbital, petéquias ou prova do laço positiva e leucopenia. Também se insere neste grupo criança proveniente ou residente em área com transmissão de dengue, com quadro febril agudo (2 a 7 dias) e sem infecção aparente (WHO, 2009).

Dengue com sinais de alarme é todo caso de dengue que, no período de defervescência apresente um ou mais dos seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, ou dor à palpação do abdômen, vômitos persistentes, acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural (lipotímia), hepatomegalia maior do que 2 cm e aumento progressivo do hematócrito (WHO, 2009).

Para ser classificado como um caso de dengue grave o paciente deve apresentar um ou mais dos seguintes sintomas: Choque devido ao extravasamento grave de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior que três segundos, pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mm Hg; hipotensão arterial em fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória, sangramento grave, comprometimento grave de órgãos tais como dano

hepático importante (AST o ALT>1000), alterações do sistema nervoso central (alteração da consciência), miocardite, entre outros (WHO, 2009).

1.4 Partícula viral

O DENV é um arbovírus cujo principal vetor é o *Aedes aegypti*. (BANCROFT, 1906). No entanto, também pode ser transmitido por outras espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, tais como o *Aedes albopictus* (SIMMONS; JOHN; REYNOLDS, 1931). Apresenta quatro sorotipos virais designados como DENV1-4 os quais pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Outros membros do mesmo gênero incluem o vírus da febre amarela, o vírus do Nilo Ocidental, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite japonesa, o Zika vírus, dentre outros (KUNO et al., 1998). Cada sorotipo do DENV ainda pode ser subdividido em genótipos estreitamente relacionados (RICO-HESSE, 2003; RICO-RESSE, 2007).

Os quatro sorotipos virais do DENV apresentam grande similaridade, variando em cerca de 25-40% das sequências de aminoácidos. Os genótipos dentro dos sorotipos são ainda mais conservados, variando em aproximadamente 3% (RICO-HESSE, 1990; HOLMES; TWIDDY, 2003). Apesar disso, os quatro sorotipos do DENV diferem em termos de patogenicidade e virulência, embora as implicações dessas diferenças fenotípicas serem pouco compreendidas. Evidências apontam que mesmo entre cepas com diferentes genótipos existe variação quanto à patogenicidade (GUZMÁN; KOURÍ; HALSTEAD, 2000; HALSTEAD, 2006; RODRÍGUEZ-ROCHE et al., 2012).

Os DENV vírus são partículas pequenas, medem de 40-50 nm de diâmetro, apresentam envelope lipídico e capsídeo de simetria icosaédrica. O genoma viral consiste em uma molécula linear de RNA fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 11kb de comprimento (STOLLAR; STEVENS; SCHLESINGER, 1966; STOLLAR, 1969) que codifica três proteínas estruturais - a do capsídeo (C), a precursora da proteína M (prM) e a do envelope (E) - e sete não estruturais (NS) - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (STOLLAR, 1969; VEZZA et al., 1980).

A estrutura do DENV apresenta mudanças conformacionais de acordo com variações da temperatura, se apresentando com um formato mais regular a temperatura ambiente, no mosquito vetor ou com uma conformação irregular a 37°C, no hospedeiro

humano. A superfície do DENV 2 é ainda mais dinâmica do que a dos outros sorotipos (FIBRIANSAH et al., 2013; ZHANG et al., 2013).

Macrófagos, monócitos e células dendríticas são células permissivas ao DENV (KOU et al., 2008). O virion entra nas células do hospedeiro via endocitose mediada por receptores (LINDENBACH; RICE, 2003; STIASNY et al., 2011). A fusão entre as membranas celulares e virais requer a associação da proteína E com a membrana celular (HEINZ; ALLISON, 2003). O nucleocapsídeo é então liberado no citoplasma e o RNA genômico é traduzido nas proteínas necessárias para a replicação e formação da partícula viral (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001; YU et al., 2008).

A proteína E é o antígeno exposto em maior quantidade na superfície do DENV. Participa da entrada do vírus nas células permissivas (LINDENBACH et al., 2007) e apresenta 3 domínios (ED) na sua estrutura, designados como EDI, EDII, EDIII (REY et al., 1995). No EDIII estão presentes epítomos comuns aos 4 sorotipos do DENV (ROEHRIG, 2003). Esta região também é sinalizada como a mais crítica para a ligação do vírus aos receptores celulares (CHEN et al., 1997). Por outro lado, na região de dobradiça dos domínios I/II, são encontrados determinantes antigênicos que induzem imunidade duradoura sorotipo-específica (MESSER et al., 2014). A homologia da sequência de aminoácidos da proteína E entre os quatro distintos sorotipos do vírus é de 72-80% e de 96 a 97% entre os genótipos de cada sorotipo (STIASNY et al., 2006).

A prM é uma proteína composta por 166 aminoácidos com função de chaperona. Auxilia o enovelamento e conformação correta da proteína E (LORENZ et al., 2002; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). É clivada na proteína de membrana (M) por uma endoprotease, um fenômeno necessário para a maturação e infectividade da partícula viral (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001; YU et al., 2008).

Durante o curso de infecção pelo DENV, a proteína NS1 é secretada precocemente e apresenta uma relação direta com a carga viral (ALCON-LEPODER et al., 2005; HUANG et al., 2006), atuando como marcador de diagnóstico para a infecção (YOUNG et al., 2000; HUANG et al., 2001).

A proteína NS1 é a única proteína não estrutural do DENV que pode ser expressa não apenas no citosol, mas também como dímeros na membrana celular e como hexâmeros na forma secretada (MULLER; YOUNG, 2013). A forma intracelular desempenha um papel na replicação do RNA viral (MACKENZIE; JONES, 1996). A

forma ancorada na membrana, por sua vez, está envolvida na transdução de sinais (JACOBS et al., 2000). A forma secretada interage com o sistema complemento e acredita-se que permita ao DENV evadir o sistema imune ao atenuar a ativação da via clássica e da lecitina (AVIRUTNAN et al., 2010; AVIRUTNAN et al., 2011). Esta proteína também induz o extravasamento vascular através de fatores inibitórios da migração de macrófagos e autofagia (CHEN et al., 2016). Pode se ligar à protrombina e suprimir sua ativação, afetando as funções coagulatórias do hospedeiro (LIN et al., 2012). Também apresenta a capacidade de se ligar diretamente na superfície celular e causar o rompimento da integridade endotelial (MODHIRAN et al., 2015).

1.5 Vacina da dengue

Vacinas são um importante método profilático para doenças infecciosas. Devido à características particulares da dengue tais como a existência de lacunas na compreensão da patogênese da doença, a ausência de um modelo animal confiável e a ocorrência de interações imunológicas entre os sorotipos virais as quais apresentam o risco de promover a amplificação da infecção, o desenvolvimento de uma vacina foi mais complexo e desafiador do que a de outros flavivírus (McARTHUR; SZTEIN; EDELMAN, 2013).

A primeira e, até o momento, única vacina licenciada para a dengue, a Dengvaxia (CYD-TDV), foi desenvolvida pela Sanofi Pasteur (Lyon, France) (CONSTENLA; CLARK, 2016). A vacina consiste em uma quimera tetravalente de vírus vivo atenuado na qual os genes das proteínas PrM e E de cada um dos quatro sorotipos virais do DENV foram substituídos na estrutura do vírus vacinal da febre amarela (17D) (VLAYCHEVA; CHAMBERS, 2002; GUY et al., 2011).

Esta vacina apresentou uma eficácia geral de cerca de 60%, com altos níveis de proteção para hospitalizações e casos graves da dengue (SABCHAREON et al., 2012; VILLAR et al., 2015). Foi capaz também de prevenir infecções assintomáticas mas com eficácia inferior (33,5%) (OLIVEIRA-BOTELLO et al., 2016). Especificamente na Ásia, a eficácia da Dengvaxia foi de 88,5% na prevenção de FHD e de 67,2% para hospitalizações (CAPEDING et al., 2014). Na América Latina, a eficácia da vacina foi levemente superior à encontrada no continente Asiático, de 90 % para prevenção de FHD e 80,3% para prevenção de hospitalizações (80,3% (VILLAR et al., 2015).

A eficácia da Dengvaxia varia também de acordo com o sorotipo viral infectante (DV1-55%, DV2-43%, DV3-71% e DV4-77%) (GODOI et al., 2017) e a exposição prévia da população ao DENV. Indivíduos soropositivos que receberam a vacina apresentaram níveis elevados e estáveis de anticorpos após a administração da primeira dose enquanto que o pico de anticorpos de indivíduos soronegativos se apresenta cerca de 10 vezes mais baixo, com rápido declínio (CAPEDING et al., 2014). Assim, Uma significativa diferença na eficácia foi observada entre indivíduos não imunes e indivíduos com anticorpos pré-existentes a um ou mais sorotipos do DENV. Indivíduos soronegativos ainda apresentaram um risco duas vezes maior de experimentar uma infecção sintomática. Também foi observado um aumento no número de hospitalizações entre participantes da faixa etária de 2—3 anos, fato que levou à prescrição da vacina para indivíduos maiores de 9 anos (HADINEGORO et al., 2015; GAILHARDOU et al., 2016).

Além disso, em indivíduos soronegativos vacinados observou-se um maior número de hospitalizações. Acredita-se que a imunização em indivíduos deste grupo promova uma maior severidade da primeira infecção natural pelo DENV, semelhante à observada em infecções secundárias de pessoas não vacinadas (FLASCHE et al., 2016). Como consequência a este fato, a OMS recomendou a introdução da vacinação para a dengue apenas em locais com alta endemicidade da doença, definido por uma soroprevalência de pelo menos 70% nas faixas etárias alvo, não sendo recomendada em regiões com soroprevalência inferior a 50% (WHO, 2016).

O custo da dengue é substancial. A vacinação pode reduzir significativamente o impacto que esta doença tem em saúde pública (COUDEVILLE et al., 2016). Em regiões onde a dengue é endêmica, atingindo uma cobertura vacinal de 80%, é previsto uma redução de 13%-25% das hospitalizações por esta doença nos próximos 30 anos (FERGUSON et al., 2016; FLASCHE et al., 2016). Em condições com moderada endemicidade, a política de vacinação reduziria a carga da doença em $6\% \pm 25\%$ e, em condições de alta transmissão, em $13\% \pm 25\%$. Em contraste, em condições de baixa intensidade de transmissão, a vacinação poderia levar a um aumento substancial do número de hospitalizações. Desta forma, a Dengvaxia tem o potencial de reduzir o peso da dengue em áreas de moderada a alta transmissão do vírus (FLASCHE et al., 2016).

No Brasil, estima-se que a vacinação de 70% dos indivíduos com 9 anos de idade reduziria a incidência da infecção em 79%. Além disso, a imunidade de rebanho no país poderia ser alcançada com uma cobertura vacinal de 82% na população alvo considerando a eficácia da vacina de 70% (SHIM, 2017).

1.6 Resposta imune contra o vírus e imunopatogênese

A resposta imune ao DENV é complexa e pode atuar tanto na proteção do indivíduo como na patogênese da doença.

1.6.1 Imunidade inata

Nos eventos iniciais de uma infecção, a resposta imune inata, e particularmente as células *Natural Killers* (NK), desempenham um papel chave. Rapidamente limitam a disseminação do agente infeccioso e direcionam a resposta imune adaptativa específica ao antígeno para efetivamente eliminar o patógeno (DELVES, 2000).

A resposta de células NK ao DENV ocorre desde o início da infecção e perdura por aproximadamente 10 dias. A completa eliminação do vírus intracelular, durante a resposta inata e adaptativa, depende da eliminação de células infectadas por células efectoras, NK e linfócitos T citolíticos (LTC) atuando conjuntamente (GUIDOTTI; CHISARI, 2001). Além disso, a replicação do DENV ocorre em células dendríticas produtoras de citocinas, tais como interferon α (IFN- α) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), importantes para o controle da infecção (HO et al., 2001; LIBRATY et al., 2001; MARTINEZ, HERNÁNDEZ, URCUQUI-INCHINA, 2017). Adicionalmente, as células dendríticas são capazes de produzir interleucina 15 (IL-15) em resposta ao DENV e consequentemente induzir a proliferação, ativação, atividade antiviral e produção de citocinas por células NK. Por sua vez, as células NK, por apoptose, podem mediar a destruição de células dendríticas infectadas. (BANCROFT, 1993; MINGARI et al., 1995; DUNNE et al., 2001 FERLAZZO; PACK, THOMAS, 2004; MARTINEZ, HERNÁNDEZ, URCUQUI-INCHINA, 2017).

Na dengue, quantidades aumentadas de células NK são associadas com uma doença mais branda, enquanto que baixas concentrações são associadas com a doença

mais grave (GREEN et al., 1999; AZEREDO et al., 2006). Essas células, ao reconhecer antígenos do DENV, principalmente a proteína E, na superfície de células infectadas, podem promover a citotoxicidade mediada por células (ADCC) (MATHEW, 2018).

O sistema complemento, outro componente da imunidade inata, interage proximamente com o sistema hemostático para prover a primeira linha de defesa contra patógenos. Em infecções pelo DENV, no período de defervescência, quando o extravasamento de plasma se torna aparente, altos níveis dos produtos da ativação do complemento – C3a e C5a - são medidos, seguido por um consumo e consequente redução destas proteínas em pacientes com SSD (NISHIOKA, 1974; SHAIQ; CHANG; CHURDBOONCHART; BHAMARAPRAVATI; FUTRAKUL, 1983; HOU, 1992). O C3a e C5a são anafilatoxinas que promovem quimiotaxia e contribuem para a resposta inflamatória. Complexos imunes formados pelo antígeno NS1 solúvel e anticorpos ativam o sistema complemento (AVIRUTNAN et al., 1998; AVIRUTNAN et al. 2006, NASCIMENTO et al., 2009). Altos níveis de antígeno NS1 e produtos do complemento são detectados em pacientes infectados pelo DENV, e isto tem sido correlacionado com o extravasamento de plasma e com a gravidade da doença (AVIRUTNAN et al. 2006, NASCIMENTO et al., 2009).

Além disso, ativação da imunidade inata pelo DENV, com expressão de receptores TLR (receptores semelhantes a *Toll*) e RLRs (receptores semelhantes à RIG) nas células dendríticas, induzem a produção de IFN tipo I e IL-27. Estes receptores e estas citocinas dirigem a diferenciação e polarização de LTCD4⁺ *naive* para a subpopulação TH1 com produção de mediadores inflamatórios, TNF- α e IFN- γ , resultando na FHD. Ainda, IL-27 e RLRs são essenciais para induzir a diferenciação de linfócitos T *helper follicular* (T_{HF}) e a produção de anticorpos contra o vírus da dengue (GRINGHUIS et al., 2014; SPROKHOLT et al., 2017).

1.6.2 Imunidade celular

A infecção causada pelo DENV provoca uma potente resposta de células T específicas ao vírus que atinge um pico de ativação por volta da fase crítica da doença. Quanto às subpopulações, Células T CD8⁺ dengue-específicas estão presentes em maior quantidade do que células T CD4⁺ e preferencialmente reconhecem as proteínas NS3, NS4b e NS5, enquanto que células T CD4⁺ são principalmente direcionadas às proteínas

estruturais C e E e também NS1 (SIMMONS et al., 2005; DUANGGHINDA et al., 2010; RIVINO et al., 2013).

Em uma infecção primária pelo DENV, a resposta imune celular é induzida previamente à humoral, sugerindo a possibilidade da resposta celular poder contribuir, pelo menos em parte, para o controle da infecção primária (YOSHIDA et al., 2013).

Estudos prévios sugerem um aumento do número de linfócitos T CD8⁺ ativados durante a fase aguda da infecção, sendo este aumento correlacionado com uma maior gravidade da doença (KURANE et al., 2001; CHANDELE et al., 2016). Por outro lado, dados da literatura também indicam para um papel protetor para estas células (WEISKOPF et al., 2013; DE ALWIS et al., 2016).

A participação dos linfócitos TCD4⁺ específicos na resposta ao DENV, por sua vez, não é muito conhecida. Evidências sugerem que infecções sequenciais com diferentes sorotipos do DENV possam ativar células T CD4⁺ de reatividade cruzada e alterar o perfil de citocinas, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, que conjuntamente com LT CD8⁺ causariam danos ao organismo (MANGADA et al. 2002).

De acordo com a teoria do “pecado original antigênico” (*“original antigenic sin”*) linfócitos T de memória de reatividade cruzada, de baixa afinidade, gerados numa infecção primária, expandem seletivamente durante uma infecção secundária por sorotipo viral heterólogo e competem com os linfócitos T virgens de alta afinidade, mais específicos para o sorotipo viral infectante. Esses linfócitos T com reatividade cruzada também produzem altas concentrações de citocinas inflamatórias (IFN- α , TNF- γ e IL-13) e podem contribuir para o extravasamento de plasma (KURANE et al., 1991; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; HATCH et al., 2011).

Alguns fatores solúveis também são relacionados com a gravidade da doença. As concentrações de diversas citocinas e outros mediadores, assim como receptores solúveis, estão significativamente aumentados na FHD (SOO et al, 2017). Altos níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, fator de crescimento transformador (TGF) -1 β , TNF- α , e IFN- γ foram encontrados em pacientes com infecções graves pelo DENV, em particular em pacientes com SSD (LAUR et al., 1998; RAGHUPATHY et al., 1998; AZEREDO et al., 2001; JUFFRIE et al., 2001; MUSTAFA et al., 2001; SUHARTI et al., 2002; NGUYEN et al., 2004; PEREZ et al.,

2004; CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006; BOZZA et al., 2008; RESTREPO et al., 2008; SOO et al., 2017). Outros mediadores e fatores solúveis encontrados em maior quantidade em pacientes com doença grave incluem o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), fator inibidor da migração de macrófagos, trombopoietina, molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) solúvel, fator de Von Willebrand, trombosmodulina, E-selectina, fator tecidual (FT), inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e ativador do plasminogênio tecidual (KORAKA et al., 2004; MAIRUHU et al. 2005; BUTTHEP et al., 2006; CARDIER et al., 2006a; CARDIER et al., 2006b; CHEN et al., 2006; LEE et al., 2006; CHEN et al., 2007; SOSOTHIKUL et al., 2007; SRIKIATKHACHORN et al., 2007; BOZZA et al., 2008, SOO et al., 2017).

Uma subpopulação de células T CD4⁺, o linfócito T *Helper Follicular* (LT_{HF}), é crítica para o desenvolvimento e diferenciação de Linfócitos B. Essas células secretam IL-21 para induzir a proliferação de linfócitos B, a troca de isótipo de imunoglobulina e estimula as células B de alta afinidade a promover uma resposta efetiva. Apresentam também, como principal função, a produção de plasmócitos de vida longa patógeno-específicos produtores de anticorpos neutralizantes (CROTTY et al., 2014; GITLIN et al., 2014)

No modelo de infecção da dengue, LT_{HF} demonstram uma ativação mínima a moderada na fase febril e uma ativação maior na fase crítica da infecção. Além disso, o número de LT_{HF} ativados é maior em pacientes na fase aguda, em pacientes com infecção secundária, quando comparados àqueles com infecção primária e , em pacientes com a forma mais grave da doença. Assim, acredita-se que maiores quantidades destas células, ao ativarem LB, poderiam aumentar a produção de anticorpos DENV-específicos, que contribuiriam para o agravamento da doença via diferentes mecanismos tais como, a facilitação da infecção mediada por anticorpos (fenômeno ADE) e formação de imunocomplexos (GONÇALVEZ et al., 2007; HALTAUFDERHYDE et al., 2018).

1.6.3 Imunidade Humoral e o Fenômeno ADE

Em uma resposta primária e secundária ao DENV a cinética e os isótipos de anticorpos específicos produzidos são distintos durante a evolução natural da doença.

Em infecções primárias observa-se um lento aumento dos anticorpos específicos. Anticorpos IgM são os primeiros isótipos de imunoglobulinas a aparecer. São detectáveis em 50% dos pacientes nos 3º-5º dias após o início da doença, aumentando para 80% no 5º dia e, 99% no 10º. Os níveis de IgM atingem o pico de concentração duas semanas após o início dos sintomas e declinam geralmente a níveis indetectáveis em cerca de 2-3 meses. Níveis séricos de IgG anti-dengue são geralmente detectáveis em baixos títulos ao final da primeira semana da doença, aumentando lentamente com o passar do tempo e permanecendo a níveis detectáveis após muitos meses, e provavelmente por toda a vida do hospedeiro, indicando uma infecção passada pelo DENV (GUZMÁN et al., 2004; BUCHY et al., 2006; VAZQUEZ et al., 2007; GUZMÁN et al., 2009).

Ao contrário da resposta primária, durante o curso de uma infecção secundária, os títulos de anticorpos aumentam rapidamente. A imunoglobulina dominante é do isótipo IgG, a qual é detectável em altos níveis, mesmo na fase aguda, persistindo em alta concentração por períodos de 30-40 dias. No início da fase de convalescência, níveis de IgM são significativamente mais baixos em infecções secundárias do que em primárias, podendo não ser detectáveis em alguns casos (GUZMÁN et al., 2004; BUCHY et al., 2006; VAZQUEZ et al., 2007; GUZMÁN et al., 2009).

Também é descrito na literatura que, durante a infecção pelo DENV, existe uma potente resposta de plasmoblastos, cerca de 1.000 vezes superior aos níveis basais de indivíduos saudáveis. Essa resposta compõe aproximadamente 30% da população linfocitária periférica dos indivíduos infectados, é amplamente específica ao DENV e quase que inteiramente composta por células secretoras de IgG, (cerca de 70%). No período de defervescência, estes plasmoblastos atingem números bastante elevados. Esse momento coincide com a janela na qual geralmente a maioria dos casos graves de dengue se desenvolvem (ZOMPI et al., 2012; WRAMMERT et al., 2012; GARCIA-BATES et al., 2013).

Por muito tempo tem-se considerado que em uma infecção primária por dengue são produzidos anticorpos neutralizantes (anticorpos homólogos) que promovem imunidade protetora duradoura para sorotipos virais homólogos e imunidade passageira de cerca de 3 meses para sorotipos heterólogos (SABIN, 1952; GUZMÁN et al., 1990). No entanto, recentemente, a hipótese de que a infecção por um sorotipo confere proteção duradoura à reinfecções por todas as cepas deste mesmo sorotipo foi questionada. Em estudo desenvolvido no Peru observou-se, através de dados epidemiológicos, a ocorrência de reinfecções homólogas por diferentes genótipos de DENV-2 (Genótipo Americano seguido por genótipo Americano/Asiático). Não se sabe, até o momento, se este fenômeno é exclusivo das duas cepas de DENV-2 analisadas ou se ele ocorreria também entre outros genótipos e nos outros sorotipos de DENV (FORSHEY et al., 2016).

Numa infecção secundária pelo DENV, por sua vez, acredita-se que anticorpos heterólogos pré-existentes (produzidos durante a infecção primária) não conseguiriam neutralizar o vírus e formariam imunocomplexos DENV- anticorpos que se ligariam à células que expressam receptores FcγRs, como macrófagos/monócitos, que também são células permissivas ao DENV (NAKAYAMA et al., 2011), facilitando a internalização e replicação da partícula viral, o que levaria ao aumento da viremia, sendo esta relacionada com a severidade da doença. O fenômeno descrito acima recebeu o nome de ADE e foi proposto pela primeira vez por HALSTEAD como o principal mecanismo por trás da FHD/SSD (HALSTEAD, 1970).

Investigações posteriores também reafirmaram a relação entre os casos mais graves de dengue e infecções secundárias pelo vírus (GUZMÁN et al., 1990; GUZMÁN et al., 2000a; GUZMÁN et al., 2000b; ALVAREZ et al., 2006). No entanto, nem toda infecção secundária resulta em FHD. De fato, somente de 0.5-2% das infecções secundárias resultam em choque (HALSTEAD, 1993).

As implicações de infecções terciárias e quaternárias na patogênese e proteção da dengue não são completamente compreendidas. Acredita-se que seja adquirida imunidade suficiente de anticorpos heterólogos após as duas primeiras infecções pelo DENV, resultando na redução da severidade da doença em infecções posteriores (ALVAREZ et al., 2006, GIBBONS et al., 2007; ANDERSON et al., 2013).

1.6.4 Fenômenos de Autoimunidade

Estudos mais recentes têm demonstrado o envolvimento de infecções pelo vírus da dengue com fenômenos de autoimunidade (GARCIA et al., 2010; JARDIM et al., 2012; RAJADHYAKSHA; MEHRA, 2012). Mimetismo molecular entre plaquetas, células endoteliais e moléculas do sistema coagulatório com as proteínas NS1, prM e E poderia explicar a reatividade cruzada de anticorpos anti-NS1, anti-prM e anti-E com proteínas do hospedeiro tais como a proteína do choque térmico, a dissulfeto isomerase e a vimetina (CARR et al., 2003). As consequências deste fenômeno seria disfunção plaquetária, apoptose de células endoteliais e defeitos na coagulação. Esses autoanticorpos opsonizariam plaquetas e células endoteliais e, juntamente com macrófagos ativados por IFN- γ poderiam atuar na fagocitose destes constituintes celulares. Tal resposta contribuiria para o aumento da permeabilidade capilar e/ou trombocitopenia na FHD/SSD. (LIN et al., 2011; LIU et al., 2011; LARDO et al. 2018.).

Anticorpos anti-NS1 foram descritos com capacidade de reagir cruzadamente com moléculas do hospedeiro como plaquetas e células endoteliais, assim, interferindo na agregação plaquetária e causando danos ao endotélio celular (CHENG et al., 2009; CHENG et al., 2015; SUN et al., 2015). A proteína NS1 também pode induzir a produção de anticorpos que reagem cruzadamente com o plasminogênio, aumentando a ativação do mesmo, causando desregulação no sistema hemostático (CHUANG et al., 2016).

Dados da literatura informam que, em 70% das amostras de soro de indivíduos na fase aguda da dengue são detectados anticorpos anti-plasminogênio. A presença destes anticorpos também se correlaciona com infecções secundárias e fenômenos hemorrágicos. Além disso, em indivíduos com FHD foram encontradas maiores porcentagens de anticorpos autorreativos à células endoteliais quando comparados à indivíduos com DC (CHUNGE et al. 1994; LIN et al., 2003; LARDO et al., 2018).

1.6.5 Anticorpos Neutralizantes

A resposta imune humoral protetora ao DENV é associada à presença de anticorpos neutralizantes. No entanto, anticorpos que potencialmente neutralizam o

DENV representam uma pequena fração do total de anticorpos produzidos na resposta ao o vírus (BELTRAMELLO et al., 2010; DEJNIRATTISAI et al., 2010; DE ALWIS et al., 2011).

A capacidade dos anticorpos de exercerem atividade neutralizante ou subneutralizante, e neste caso ao invés de proteção, promoverem a amplificação da infecção viral, permanece por ser definido. Estudos têm demonstrado que a função dos anticorpos de atuar como neutralizantes depende de ambas as propriedades: afinidade e valência, sendo crítico e essencial um número elevado de epítomos acessíveis na partícula viral, além de apresentarem alta afinidade a inúmeros epítomos simultaneamente. Anticorpos de alta afinidade, mas incapazes de se ligar a vários determinantes antigênicos, falham em sua atividade neutralizante. (PIERSON; DIAMOND, 2008). Além disso, a concentração de anticorpos capaz de favorecer a amplificação do vírus é variável. Baixas concentrações de anticorpos são necessárias para sorotipos virais homólogos e altas concentrações, em se tratando de sorotipos heterólogos (MIDGLEY et al., 2011; SABCHAREON et al., 2012). Ademais, muitos anticorpos humanos que fortemente neutralizam o DENV somente se ligam à epítomos na conformação quaternária (DE ALWIS et al., 2012; TEOH et al., 2012; FIBRIANSAH et al., 2014).

Anticorpos neutralizantes homotípicos são mais fortemente associados com proteção do que anticorpos neutralizantes heterotípicos. No entanto, anticorpos heterotípicos também podem contribuir para a neutralização do vírus (PUSCHNIK et al., 2013; KATZELNICK et al., 2016). Em infecções secundárias pelo DENV, dependendo da quantidade de anticorpos neutralizantes de reatividade cruzada, produzidos em infecções prévias, observa-se uma associação com um reduzido risco de evolução para a doença sintomática (ENDY et al., 2004; BUDDHARI et al., 2014; KATZELNICK et al., 2016). Por exemplo, em infecções por DENV-2 a pré-existência de anticorpos heterotípicos neutralizantes para o DENV-4 é positivamente associada com proteção. Em infecções secundárias por DENV-3, níveis mais altos de anticorpos neutralizantes pré-existentes que reconhecem este sorotipo são associados com menor viremia e doença mais branda. Por outro lado, a pré-existência de anticorpos heterotípicos neutralizantes ao DENV-2 não são associados com a proteção de uma infecção secundária por ele. (ENDY et al., 2004).

Em infecções primárias, com o passar do tempo, os anticorpos neutralizantes aumentam em magnitude mas não se tornam mais tipo-específicos (KATZELNICK et al., 2015). Na ausência de estímulo e no caso uma reexposição ao DENV, o título destes anticorpos cai no período entre 1-6 meses após a exposição, e então vai decaindo gradualmente. Em regiões endêmicas, por sua vez, o cenário é um pouco diferente. Após a fase inicial de redução, o título de anticorpos neutralizantes permanece relativamente estável por anos após uma infecção primária, podendo em alguns indivíduos apresentar quedas e, em outros, aumento (PUSCHNIK et al., 2013; CORBETT et al., 2015; CLAPHAM et al., 2016; KATZELNICK et al., 2016).

O intervalo de tempo entre as infecções também pode interferir na capacidade neutralizante dos anticorpos. Observa-se que o aumento do intervalo tempo entre a infecção primária e as subsequentes se correlaciona negativamente com a amplitude da neutralização, sugerindo que a resposta de anticorpos neutralizantes evolui de uma neutralização cruzada para uma resposta monotípica (sorotipo-específica) em 8-12 meses após a infecção (CORBETT et al., 2015).

Algumas cepas e sorotipos de DENV também são melhores ou piores neutralizadas. Além disso, a capacidade de neutralização do anticorpo também se correlaciona com a proximidade entre os genótipos do vírus (BRIEN et al., 2010; KATZELNICK et al., 2015). São necessários valores mais baixos de anticorpos neutralizantes homotípicos para promover proteção ao DENV-1 e DENV-4 ao passo que para o DENV-2, são necessárias quantidades mais elevadas (BUDDHARI et al., 2014).

Com relação aos epítomos reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes e subneutralizantes, sabe-se que, após uma infecção pelo DENV, são produzidos anticorpos contra as proteínas estruturais (E, PrM, C) assim como a algumas proteínas NS (NS1, NS3, NS5) (CHURDBOONCHAERT et al., 1991; ABUBAKAR et al., 1997; VALDES et. al, 2000; ABUBAKAR et al., 2002; LAI et al., 2008; LAZARO-OLAN et al., 2008). Acredita-se que os epítomos reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes sejam conservados entre cepas de mesmo sorotipo. Sendo assim, a proteína E é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (PRIYAMADA et al., 2016). Epítomos presentes na região lateral do DIII da PrE são reconhecidos pelos anticorpos com maior capacidade neutralizante produzidos (BRIEN et al., 2010).

Anticorpos anti- prM por muito tempo foram associados com a proteção ao DENV (FALCONAR, 1999; SE-THOE; NG; LING, 1999; CARDOSA et al., 2002). No entanto, estudos mais recentes sugerem um papel destes anticorpos na amplificação da infecção, apresentando uma capacidade de aumentar a gravidade da doença, mesmo em infecções primárias. Anticorpos anti-prM reagem cruzadamente com os 4 sorotipos do DENV e sua capacidade neutralizante varia de baixa a moderada (CHAU et al., 2009; HUANG et al., 2005; HUANG et al., 2006; BELTRAMELLO et al., 2010; DEJNIRATTISAI et al., 2010; LUO et al., 2013).

Anticorpos anti-NS1 reagem cruzadamente com proteínas virais, podendo no decorrer de uma infecção atuar como anticorpos subneutralizantes e desta forma contribuir para a patogênese pelo fenômeno ADE (TIRADO; YOON, 2003). Foi demonstrado que anticorpos anti-NS1 podem reagir com a proteína pr-M e a proteína E com baixa capacidade neutralizante (FALCONAR, 1997; FALCONAR, 2008; MASRINOUL et al., 2013).

1.7 Subclasses de IgG

As IgGs humana compreendem cerca de 75% das imunoglobulinas séricas, apresentando-se no soro de adultos saudáveis nas proporções: IgG1, 65%; IgG2, 23%; IgG3, 8%; e IgG4, 4% (YOUNT et al., 1968).

As concentrações dos diferentes isótipos de IgG no soro variam amplamente conforme a idade, sexo e o estímulo infeccioso em questão. A quantidade de IgG2 sobe lentamente com a idade, não tendo ainda alcançado os valores de adultos até a idade de 12 anos. Isto também acontece com a IgG4, mas em menor grau. IgG1 e IgG3, por sua vez, atingem sua concentração máxima ainda na infância. (VAN DER GIESSEN et al., 1975). As concentrações no soro destas subclasses em homens e mulheres também diferem, mas levemente, sendo que as maiores diferenças são encontradas nas concentrações de IgG2 e IgG4: enquanto que mulheres possuem em média maiores concentrações de IgG2, os homens demonstraram maiores níveis de IgG4 (VAN DER GIESSEN et al., 1975; MERRETT; BURR; MERRETT, 1983).

Uma importante diferença entre as subclasses de IgG está na capacidade de ligação aos receptores Fcγ e na afinidade pelo componente C1q do sistema complemento (DAËRON, 1997; BOURNAZOS; RAVETCH, 2017).

A IgG1 e a IgG3 possuem capacidade de interação com a maioria dos receptores Fcγ enquanto que a IgG2 e a IgG4 apresentam afinidade mínima. Com relação à afinidade com o sistema complemento, as subclasses de IgG humana reagem com o C1q na seguinte ordem: IgG3 (40x) > IgG1 (6x) > IgG2 (1x) > IgG4 (não detectável). Assim, IgG1 e IgG3 ativam eficientemente o complemento enquanto que a IgG2 o faz fracamente e a IgG4 não é capaz de promover ativação (AUGENER et al., 1971; FEINSTEIN; RICHARDSON; TAUSSIG, 1986; JEFFERIS; KUMARARATNE, 1990; BOURNAZOS; RAVETCH, 2017).

Alterações nas concentrações das subclasses de IgG também tem associação com numerosas doenças. Altos níveis de IgG2 estão associados com reduzido risco de infecção por malária enquanto que aumentados níveis de IgG4 é considerado um fator de risco para o desenvolvimento desta infecção (AUCAN et al., 2000). Na hanseníase, pacientes com a forma lepromatosa (mais grave) apresentam uma quantidade 141 vezes maior de IgG1 e 32 vezes maior de IgG3 comparado àqueles com a forma benigna da doença (tuberculoide) (HUSSAIN; KIFAYET; CHIANG, 1995).

THEIN et al. demonstraram que soro de crianças na fase aguda com FHD ou SSD possui níveis maiores de IgG1 e níveis mais baixos de IgG2 dengue-específicos comparados com crianças com FD sendo que, na fase de convalescência, as concentrações das quatro subclasses de IgG se mantiveram similares entre os pacientes com as diferentes formas clínicas da doença (THEIN et al., 1993). KORAKA, em 2001, também correlacionou IgG1, IgG3 e IgG4 DENV-específicas com a severidade da Dengue (KORAKA et al., 2001). Outro estudo, por sua vez, demonstrou que na dengue, a fase de convalescência é marcada por uma significativa queda na razão entre IgG1/IgG2, indicando que pacientes com doença severa responderiam à infecção produzindo subclasses de IgG com maior afinidade pelo FcγRIIIA (WANG et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA

A doença causada pelo vírus da dengue apresenta diferentes manifestações clínicas, desde uma infecção branda assintomática ou com sintomas inespecíficos, até uma síndrome mais grave, caracterizada por distúrbios hematológicos que colocam em risco a vida do paciente (RIGAU-PÉREZ, et al., 1998). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas mais graves da doença ainda não estão totalmente esclarecidos.

A resposta imune humoral ao DENV pode ser protetora, mas também pode contribuir para a imunopatogênese da doença. Esta resposta é direcionada principalmente para as proteínas E, prM e NS1 (VALDÉS et al., 2000).

Uma teoria proposta por HALSTEAD e colaboradores (“antibody-dependent-enhancement-ADE”) sugere que, em infecções secundárias pelo DENV, anticorpos pré-existentes (heterólogos), produzidos durante uma infecção primária por outro sorotipo viral, falhariam em neutralizar o vírus e formariam imunocomplexos DENV-anticorpos que se ligariam às células que expressam receptores Fcγ, facilitando a internalização e replicação viral. Isto levaria ao aumento da viremia, sendo esta relacionada com uma doença mais grave (HALSTEAD et al., 1970).

Sendo assim, infecções secundárias pelo DENV são consideradas fatores de risco para gravidade da doença (HALSTEAD et al., 1967). No entanto, nem toda infecção secundária resulta em FHD (HALSTEAD et al., 1993; ALVAREZ et al., 2006; ANDERSON et al., 2013), assim como casos graves também podem ocorrer em infecções primárias (WICHMANN et al., 2004), indicando que fatores além do fenômeno ADE desempenhariam papel importante na patogênese da dengue.

Um destes fatores, que mais recentemente vem sendo estudado, é a possível relação de anticorpos anti-DENV com fenômenos de autoimunidade. De acordo com esta teoria, anticorpos anti-partícula viral reagiriam com componentes do organismo hospedeiro, devido à mimetismo molecular entre plaquetas, células endoteliais e moléculas do sistema coagulatório com as proteínas virais NS1, PrM e proteína E (CARR et al., 2003; LARDO et al., 2018). Esses autoanticorpos, juntamente com macrófagos ativados por IFN-γ poderiam atuar na fagocitose de plaquetas e células

endoteliais opsonizadas. Tal resposta contribuiria para o aumento da permeabilidade capilar e/ou trombocitopenia característicos da infecção (LIN et al., 2011; LIU et al., 2011).

No entanto, apesar da constante busca para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da dengue, uma terapia antiviral específica ainda está em falta. O tratamento de pacientes com a doença restringe-se ao alívio dos sintomas e cuidados de suporte (KAPTEIN; NEYTS, 2016; LOW; OOI; VASUDEVAN, 2017). A vacina disponível contra o vírus é recente e sua eficácia à longo prazo e contra os 4 sorotipos do vírus, permanece ainda por ser determinada. (LOW; OOI; VASUDEVAN, 2017).

Uma estratégia de tratamento recente abordada em outros modelos de doença é a utilização de anticorpos monoclonais na imunoterapia. Os anticorpos monoclonais são proteínas que possuem especificidade única, sendo derivados de um mesmo clone de linfócitos B e que reconhecem um único epítipo do antígeno (THIE et al., 2008). Na dengue, a terapia com anticorpos poderia auxiliar o sistema imunológico do indivíduo no combate ao patógeno, impedindo o agravamento da doença.

Uma resposta imune humoral é protetora ao DENV quando há a presença de anticorpos neutralizantes. Em terapias com anticorpos, o objetivo é eliminar ou neutralizar o patógeno ou a célula-alvo. Para isso, os anticorpos monoclonais atuam através de vários mecanismos. No caso da neutralização, a ligação direta do anticorpo pode bloquear a atividade de vários patógenos. A neutralização também pode ocorrer através da ligação do anticorpo ao receptor que o patógeno se ligaria (AIRES; CORTE-REAL; GONCALVES, 2008). Ainda, o tratamento efetivo requer a participação do anticorpo exercendo funções efetoras (AIRES; CORTE-REAL; GONCALVES, 2008), como a opsonização, na qual o anticorpo se liga ao patógeno e potencializa a fagocitose da partícula viral (CHARTRAIN; CHU, 2008).

Considerando que a IgG1 e IgG3 são as subclasses de IgG que apresentam maior afinidade pelos FcγR (MATHEW; ROTHMAN, 2008), supõe-se que, maiores concentrações destes anticorpos potencializariam a fagocitose da partícula viral por macrófagos, concorrendo para a eliminação do vírus, mas ao contrário poderiam também favorecer a amplificação do vírus via fenômeno ADE. Além disso, anticorpos IgM e IgG do hospedeiro poderiam reagir com plaquetas, células endoteliais e

leucócitos, contribuindo para a depleção destes componentes celulares (fenômeno de autoimunidade).

Desta forma, nosso trabalho propõe o estudo, de forma indireta, destes dois distintos mecanismos possivelmente envolvidos na imunopatogênese da dengue, como apresentado:

Artigo 1- Análise do perfil de anticorpos IgG-DENV específicos e de IgG1 e IgG3 séricas e DENV-específicas, em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença.

Artigo 2- Análise da relação entre a contagem de plaquetas e leucócitos com a concentração de anticorpos IgG e IgM DENV-específicos em pacientes com as diferentes formas clínicas da dengue.

Ainda, Neste estudo também produzimos hibridomas murinos secretores de anticorpos anti-flavivírus e propomos sua utilização na imunoterapia da dengue e como componente de *kits* para diagnóstico e para o estudo da resposta imune humoral nas doenças causadas por flavivírus.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a participação de anticorpos anti-DENV em diferentes mecanismos de imunopatogênese da dengue e desenvolver insumos a fim de auxiliar no diagnóstico e prognóstico da infecção, com potencial para uso em estratégias imunoterápicas com o fim de atenuar o agravamento da doença.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar quantitativamente os anticorpos IgG1 e IgG3 séricos nas diferentes formas clínicas durante o curso da infecção pelo DENV.
- Analisar semi-quantitativamente os anticorpos IgG anti-DENV, IgG1 anti-DENV e IgG3 anti-DENV, nas diferentes formas clínicas durante o curso da infecção pelo DENV.
- Correlacionar a quantidade de plaquetas, leucócitos, medida do TAP com a quantidade de IgM e IgG DENV-específicas, nas diferentes formas clínicas durante o curso da infecção pelo DENV.
- Obter hibridomas murinos produtores de anticorpos anti-flavivírus.
- Produzir anticorpos monoclonais anti-flavivírus e verificar sua capacidade de neutralizar o vírus e inibir a infecção celular.

4. RESULTADOS

Artigo 1 – Association of anti-DENV IgG antibodies with dengue severity.

Autores: Isabela Cinquini Junqueira, Lucimeire Antonelli da Silveira, Valéria Christina de Rezende Feres, Adriana Oliveira Guilarde, Benigno Alberto Moraes da Rocha, João Victor Batalha de Carvalho, Silvio Rincon Filho, Celina Maria Turchi Martelli.

Revista: Journal of Medical Microbiology -submetido

Artigo 2 – Participação de anticorpos em fenômeno de autoimunidade na dengue.

Autores: Isabela Cinquini Junqueira, Amanda de Oliveira Matos, Celina Maria Turchi Martelli, Valeria Christina de Rezende Feres, Adriana Oliveira Guilarde, Lucimeire Antonelli da Silveira.

Patente– Hibridomas murinos produtores de anticorpos anti-flavivírus

Autores: Isabela Cinquini Junqueira, Lucimeire Antonelli da Silveira, Cristina Rodriguez de Oliveira, Ângela Ferreira Lopes de Teive e Argolo.

Artigo 1.

ASSOCIATION OF ANTI-DENV IgG ANTIBODIES WITH DENGUE SEVERITY

Isabela Cinquini Junqueira¹; Lucimeire Antonelli da Silveira¹; Valeria Christina de Rezende Feres³; Adriana Oliveira Guilarde¹; Benigno Alberto Moraes da Rocha⁴; João Victor Batalha de Carvalho¹; Silvio Rincon Filho¹; Celina Maria Turchi Martelli².

¹Instituto de Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

² Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz/PE, Recife, PE, Brazil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

⁴ Faculdade de Enfermagem, Universidade Estadual de Goiás, Ceres, GO, Brazil

Corresponding author: isabelacinquini@yahoo.com.br

Keywords: Dengue, immunopathogenesis, IgG subclasses

ABSTRACT

In order to investigate the participation of IgG and cytophilic subclasses in dengue immunopathogenesis, we measured, by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), with in-house procedures, serum IgG1 and IgG3 and DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 in 233 serum samples from 134 individuals with dengue distinct clinical manifestations, through different times (acute, convalescent and late convalescent phase). Our study demonstrated that there are variations in these antibodies' kinetics between dengue different clinical forms. Comparing DF and DHF, higher levels of DENV-specific IgG antibodies predominated in DHF samples, since the onset of infection. Serum IgG1 also raised its concentration in the disease more severe form, but only in the convalescent phase. Comparing acute DF and DwC, no differences in

antibodies levels was observed. In the convalescent and late convalescent phases, higher levels of serum IgG1 and IgG3 were detected. Modifications in DENV-specific IgG levels, on the contrary, were limited to the convalescent phase. In conclusion, our results suggest the participation of IgG antibodies in dengue pathogenesis and point for a future application of immunoenzymatic assays with DENV-specific IgG antibodies to monitor the disease severity in dengue infected individuals from endemic areas.

INTRODUCTION

Dengue is an important human viral disease transmitted by arthropod vectors in tropical and subtropical densely populated areas (1). There are four dengue serotypes (DENV1-4), that are members of the *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus. In the last two decades, dengue incidences increased exponentially in Brazil (2).

Dengue infected individuals, in majority, develop a mild form of the disease, with benign course and characteristic symptoms. However, the disease can also progress to a more severe form. This is characterized by increased capillary permeability, plasma leakage and homeostatic abnormalities that may progress to circulatory failure and hypovolemic shock (3).

To date, several mechanisms are proposed to be involved in the disease immunopathogenesis and, among them, there is the cytokine storm, the original antigenic sin, the antibody-dependent-enhancement (ADE) and more recently, the autoimmune phenomenon (4-7).

According to ADE theory, in a primary infection, neutralizing antibodies are created, providing a lifelong and protective immunity to homologous viral serotypes and transient immunity to heterologous serotypes (8, 9). In a secondary infection, on the contrary, pre-existing heterologous antibodies (created during the primary infection) cannot neutralize the virus, instead, they produce immunocomplexes DENV-antibodies, that bind to Fc γ receptor-bearing cells such as macrophages / monocytes that also are DENV permissive cells, thereby, facilitating viral internalization and replication, leading to an increased viremia that is related to the disease severity (10, 11).

The Fc γ receptor family has three different isoforms (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) (12, 13). IgG subclasses exhibit differential affinity for these receptors and, cytophilic antibodies IgG1 and IgG3, demonstrate a greater affinity for all of three receptors (14, 15). Therefore, higher IgG1 and IgG3 concentrations could potentiate viral phagocytosis by macrophages, facilitating viral amplification (ADE phenomenon). At the same time, they also suppress INF-I mediated antiviral response, by inducing these cells to synthesize IL-10 (16), contributing to the enhancement of infection and disease pathogenesis.

In addition, IgG1 and IgG3 also are efficient complement activators (17, 18). Studies have already shown that preceding the onset of dengue shock there is an extensive complement activation, suggesting a possible role for complement products such as C3a or C5a in endothelial damage and plasma leakage (19, 20).

In order to understand the participation of IgG antibodies and cytophilic subclasses in dengue immunopathogenesis, in this study, anti-DENV antibodies (IgG, IgG1 and IgG3) and serum cytophilic subclasses were measured in serum samples from individuals with dengue different clinical forms over three periods: acute, convalescent and late convalescent.

METHOD

Study population

Individuals participating in this study were selected from two virologically- and/or serologically- well-characterized cohorts of DENV cases from health care units in Goiânia, GO/Brazil, followed-up during two different DENV epidemics: October/2005-march/2006 and june/2012-july/2013, with the prevalence of DENV-3 (2005/2006) (21) and DENV-1 and DENV-4 (2012/2013) (22, 23).

Inclusion Criteria

Individuals included in this study were confirmed for acute DENV infection, have the day of onset of symptoms reported and the disease classified according to

WHO guideline (3) in: dengue fever (DF), dengue with complications (DwC) (24) or dengue hemorrhagic fever (DHF).

Virus antigens

DENV 1 (strain Hawaii), DENV 2 (strain N. Guinea C), DENV 3 (strain H 87), and DENV 4 (strain BC 295/97) were utilized to infect C6/36 insect cells. Infected cells were cultured in Leibovitz medium, supplemented with antibiotics and 2% of bovine fetal serum for 4 (DENV-1/DENV2) and 8 (DENV-3/DENV4) days. Subsequently, supernatants were harvested and mixed with Polyethylene glycol (PEG). After an overnight period, the mixture was centrifuged for 30 min at 1.500g and supernatant was discarded, remaining a viral precipitate. The pellet was then resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and stored in aliquots at -80°C until application in antigen-specific assays.

Total IgG1 and IgG3 Standard curves

Cytophilic IgG subclasses not DENV-specific were quantified with the generation of standard curves with commercial IgG1 and IgG3 (Sigma Aldrich). Data provided by these curves were extrapolated to calculate IgG1 and IgG3 concentrations in patients' serum samples. Each IgG subclass has its curve individually standardized considering the unique behavior of each anti-isotype monoclonal antibody.

Serum IgG1 and IgG3 Quantitative ELISA

Human IgG1 and IgG3 antibodies were detected by an in-house capture ELISA assay, reproducing the assays performed for the generation of their standard curves, replacing commercial IgG subclasses with previously titrated dengue patients' serum samples.

ELISA plates were coated with mouse monoclonal antibodies (human anti-IgG1 and anti-IgG3). After blocking the plates, diluted serum samples were added. After 1 h of incubation at 37°C, unbound antibodies were washed, and an anti-human IgG monoclonal antibody conjugated with horseradish peroxidase (Invitrogen) was added to the plates. The assay was revealed with o-Phenylenediamine (OPD).

IgG-DENV ELISA

An in-house indirect ELISA system was developed for IgG DENV-specific antibody detection in serum samples. Polystyrene plates (Costar - High binding) were coated with monoclonal anti-flavivirus antibodies. After the addition of the blocking solution, a viral pool (DENV1-4) was added and incubated for 1h at 37°C. In the next step, diluted serum samples were added. After 1h of incubation at 37°C, unbound antibodies were washed, and an anti-human antibody conjugated with horseradish peroxidase (Invitrogen) was added. After 1h, plates were washed again, and the assay was revealed with OPD.

IgG1-DENV ELISA

The assay performed for IgG1 DEN-specific antibodies detection was a modification of a commercial kit. Commercially available plates (dengue IgG indirect ELISA kit- PanBio, Pty, Ltd., Brisbane, Austrália) coated with DENV virus were used for the assay. Diluted serum samples were added in these plates and incubated for 1h. After incubation, unbound antibodies were washed away and anti-human IgG1 monoclonal antibodies (Invitrogen) were added. After another 1h of incubation, an anti-mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase (Invitrogen) was added and after another 1h of incubation, plates were washed again, and the assay was revealed (OPD).

IgG3-DENV ELISA

An in-house capture ELISA system was developed to determine DENV-specific IgG3 antibodies levels in serum samples of DENV-infected individuals. Microwells were coated with monoclonal anti-human IgG3 (Invitrogen) antibodies. After blocking the plates, diluted serum samples were added. After 1 h of incubation at 37°C, unbound antibodies were washed away and a viral concentrate (DENV1-4) was added. After another 1 h of incubation, an anti-flavivirus antibody conjugated with horseradish peroxidase (dengue MAC ELISA, PanBio, Pty, Ltd., Brisbane, Austrália) was added to the wells for 1 h. Plates were washed again and the assay was revealed with OPD.

Statistical Analysis

Clinical, epidemiological and laboratorial data were entered in Epiinfo-Access database. Initially, we applied descriptive statistics to assess the distribution of variables in order to characterize the study population. The U test of Mann-Whitney was applied to calculate associations between independent variables, considering DF as the reference group. The software used for the statistical analysis was IBM SPSS Statistics version 23 and GraphPad Prism 6 for graphical generation. $p \leq 0,05$ values were considered statistical significant.

RESULTS

Patient characteristics

Serum samples selected for this study (n=233) were collected from 134 patients, through different periods, in the disease acute (0-7 days), convalescent (8-15 days) and late convalescent phase (16-30 days). Not all patients had serum samples collected at these three periods.

The study population median age was 33.5 years, with a minimum age of 3 years and a maximum of 76 years. Regarding age group, most individuals included in this study were in the category of 16-39 years (56.7%) and, with respect to gender, the majority, 60.2%, were female (n = 74) (Table 1).

Table 1: Patients characteristics: gender, age, and clinical manifestation.

Characteristics	N	%	DF	DwC	DHF
Gender					
Male	58	43,3	26	15	17
Female	76	56,7	25	23	28
Age group					
2-15 years	6	4,5	1	2	3
16-39 years	76	56,7	28	25	23
40-49 years	44	32,8	17	10	17
≥ 60 years	8	6	5	1	2

FD: dengue fever, DwC: dengue with complications, DHF: dengue hemorrhagic fever.

Antibodies kinetics

In DF, DwC and DHF patients, we observed differences in antibody production kinetics, with an increase in their concentrations between acute and convalescent phases, except DENV-specific IgG1, whose levels did not vary significantly over time in DF and DwC clinical forms (Tables 2,3 and 4). DENV-specific IgG3 was the antibody that presented the highest increase between acute and convalescent phases, being this increment approximately 4 times in DF and 2.5 in the disease more severe outcomes, DHF and DwC (Tables 1, 2 and 3).

In the search for a more sensitive assay to detect cytophilic subclasses, we developed a quantitative ELISA, capable of quantifying IgG1 and IgG3 antibodies in individuals' sera. Since it was impossible to standardize a quantitative assay to dosage DENV-specific subclasses and, considering that the immune system reacts to the present stimuli, quantifying these serum subclasses would reflect their rise in response to DENV. As a result, in DF, our study demonstrates a more discrete increase in serum IgG1 (0.17) and IgG3 (0.64) between acute and convalescence phases. In DwC and DHF, differently, IgG1 presented a more pronounced increase (DwC-1,4x and FHD-1,5x), similar to observed for IgG3 (2.4x-DwC and 1.9x-DHF) (Tables 2 and 3).

In general, DENV-specific IgG, serum and DENV-specific IgG1 and IgG3 levels demonstrated discrete variations between convalescent and late convalescent phases (Tables 2, 3 and 4).

Table 2: Antibodies levels in Dengue Fever samples.

DENGUE FEVER				
	Acute	Convalescent	Late convalescent	<i>p</i>
Serum IgG1 g/l	433,22 (n=29)	506,99 (n=27)	515,27 (n=30)	0,027*
Serum IgG3 g/l	1,82 (n=28)	3,0 (n=27)	3,18 (n=32)	0,023*
DENV-specific IgG O.D.	1,51 (n=36)	2,29 (n=26)	2,31 (n=32)	0,005*
DENV-specific IgG1 O.D.	1,58 (n=25)	1,79 (n=22)	1,65 (n=28)	0,089
DENV-specific IgG3 O.D.	0,29 (n=25)	1,46 (n=21)	0,93 (n=28)	0,011*

O.D. optical density. * Significant results $p \leq 0,05$.

Table 3: Antibodies levels in Dengue with complications samples.

DENGUE WITH COMPLICATIONS				
	Acute	Convalescent	Late convalescent	<i>p</i>
Serum IgG1 g/l	425,5 (n=17)	1041,1 (n=16)	981,8 (n=12)	0,000*
Serum IgG3 g/l	1,49 (n=13)	5,1 (n=17)	5,54 (n=13)	0,000*
DENV-specific IgG O.D.	2,02 (n=22)	2,51 (n=16)	2,44 (n=13)	0,000*
DENV-specific IgG1 O.D.	1,4 (n=21)	1,78 (n=16)	1,49 (n=13)	0,066
DENV-specific IgG3 O.D.	0,32 (n=21)	1,10 (n=15)	1,17 (n=13)	0,004*

O.D. optical density. * Significant results $p \leq 0,05$.

Table 4: Antibodies levels in Dengue Hemorrhagic fever samples.

DENGUE HEMORRHAGIC FEVER				
	Acute	Convalescent	Late convalescent	<i>p</i>
Serum IgG1 g/l	393,34 (n=17)	939,20 (n=20)	519,93 (n=23)	0,000*
Serum IgG3 g/l	1,61 (n=17)	4,81 (n=26)	2,57 (n=23)	0,030*
DENV-specific IgG O.D.	2,22 (n=21)	2,51 (n=24)	2,51 (n=22)	0,004*
DENV-specific IgG1 O.D.	1,45 (n=19)	1,76 (n=21)	1,72 (n=19)	0,017*
DENV-specific IgG3 O.D.	0,38 (n=19)	1,35 (n=21)	1,27 (n=21)	0,001*

O.D. optical density. * significant results $p \leq 0,05$.

Association of antibody levels with clinical outcome

In dengue acute phase, our results demonstrate that there is a difference in DENV-specific IgG concentration between DF (O.D. =1,51) and DHF (O.D. =2,22) ($p=0,021$) with a higher quantity of this antibody in the disease more severe clinical form. In this period, serum and DENV-specific IgG1 and IgG3 exhibited no significant variations in their levels in dengue distinct clinical manifestations. (Figure 1).

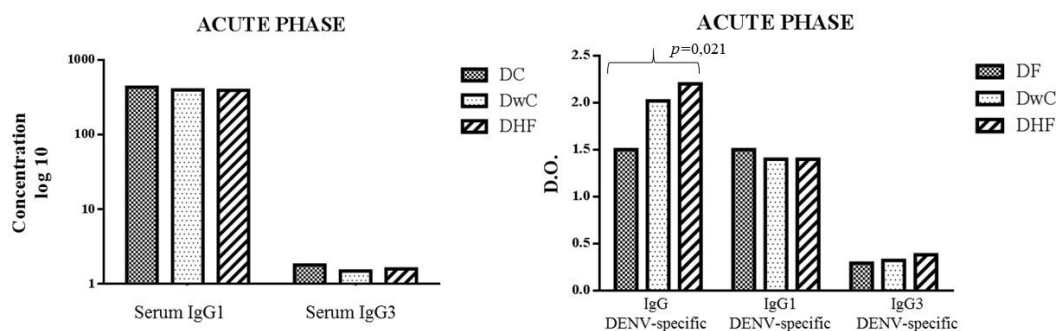


Figure 1: Serum IgG1 and IgG3 and DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 amount in dengue different clinical forms, during acute phase.

A) serum IgG1: DFxDwC: $p=0,693$, DFxDHF: $p=0,014$; Serum IgG3: DFxDwC: $p=0,409$, DFxDHF: $p=0,535$; **B)** DENV-specific IgG: DFxDwC: $p=0,200$, DFxDHF: $p=0,021$; DENV-specific IgG1: DFxDwC: $p=0,366$, DFxDHF: $p=0,627$; DENV-specific IgG3: DFxDwC: $p=0,700$, DFxDHF: $p=0,934$. $p \leq 0,05$ values were considered statistical significant. **Controls:** Serum IgG1 - positive control (human serum): O.D.=2,2, negative control (mouse serum): O.D.=0,05; Serum IgG3 - positive control (human serum): O.D.=2,5, negative control (mouse serum): O.D.=0,1; DENV-specific IgG - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=2,2, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,3; DENV-specific IgG1 - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=2,0, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,2; DENV-specific IgG3 - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=1,2, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,07.

Since our results demonstrated that antigen-specific IgG was the antibody that presented a relationship with the disease severity in the first week of infection, we proceed the analysis with specific antibodies in the search of a biomarker for the disease severity in critical phase (3-6 days). Although we could observe an increase in DENV-specific cytophilic antibodies in DHF serum, it wasn't statistically significant and results preserved similarity to what was previously demonstrated in the acute phase, with DENV-specific IgG maintaining a higher concentration in patients with DHF (O.D.=2,22) when compared to DF (O.D.=1,91) ($p=0,016$) (figure 2).

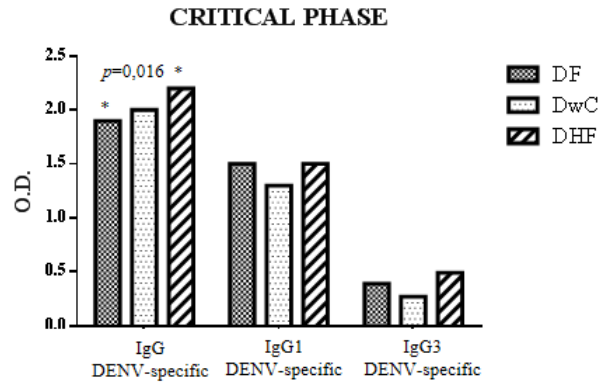


Figure 2: DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 antibodies in dengue different clinical forms, during critical phase.

DENV-specific IgG: DF- O.D.= 1,91 (n=26), DwC–O.D.= 2,00 (n=12), DHF-O.D. =2,22 g/l (n=17), DFxDwC: $p=0,900$, DFxDHF: $p=0,016$; DENV-specific IgG1: DF–O.D.= 1,58 (n=17), DwC–O.D. 1,34 (n=11), DHF-O.D. 1,58 (n=15), DFxDwC: $p=0,115$, DFxDHF: $p=0,865$; DENV-specific IgG3: DF–O.D.= 0,39 (n=17), DwC–O.D.=0,27 (n=11), DHF-O.D.=0,49 (n=15), DFxDwC: $p=0,438$, DFxDHF: $p=0,777$. $p \leq 0,05$ values were considered statistical significant. **Controls:** DENV-specific IgG - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=2,2, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,3; DENV-specific IgG1 - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=2,0, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,2; DENV-specific IgG3 - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=1,2, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,07.

In the convalescent phase (8-15 days), serum IgG1 and DENV-specific IgG exhibited a significant increase in serum samples of DwC and DHF patients when compared to DF. Furthermore, serum IgG3 also raised its concentrations in patients with a more severe outcome but only in those with DwC ($p=0,016$), not DHF (Figure 3).

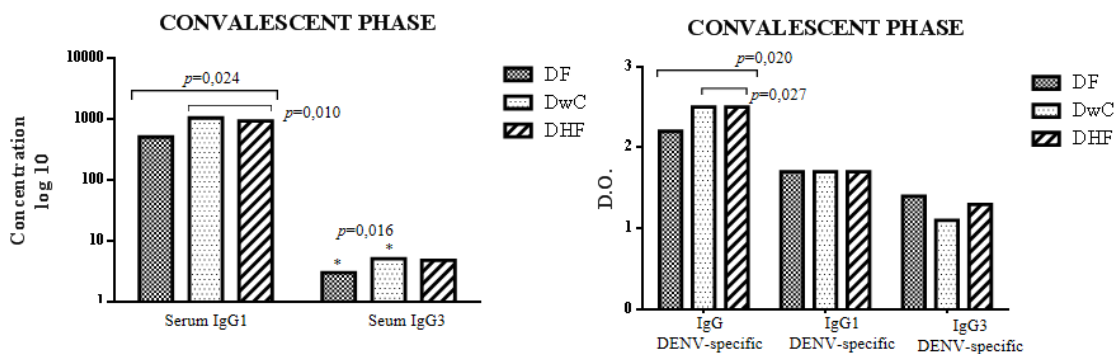


Figure 3: Serum IgG1 and IgG3 and DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 amount in dengue different clinical forms, during convalescent phase.

A) Serum IgG1: DFxDwC: $p=0,010$, DFxDHF: $p=0,024$; Serum IgG3: DFxDwC: $p=0,016$, DFxDHF: $p=0,185$; **B)** DENV-specific IgG: DFxDwC: $p=0,027$, DFxDHF: $p=0,020$; DENV-specific IgG1: DFxDwC: $p=0,657$, DFxDHF: $p=0,752$; DENV-specific IgG3: DFxDwC: $p=0,574$, DFxDHF: $p=0,831$. p

$\leq 0,05$ values were considered statistically significant. **Controls:** Serum IgG1 - positive control (human serum): O.D.=2,2, negative control (mouse serum): O.D.=0,05; Serum IgG3 - positive control (human serum): O.D.=2,5, negative control (mouse serum): O.D.=0,1; DENV-specific IgG - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=2,2, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,3; DENV-specific IgG1 - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=2,0, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,2; DENV-specific IgG3 - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=1,2, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,07.

In a later period, when organism tends to return to homeostasis, higher levels of serum IgG1/IgG3 are still detectable in patients with dengue with complications ($p=0,019$ and $p=0,002$, respectively). DENV-specific IgG persisted raised in patients with DHF ($p=0,042$) and, surprisingly, DENV-specific IgG1 decreased in serum samples of patients that developed DwC, when compare to DF ($p=0,006$) (Figure 4).

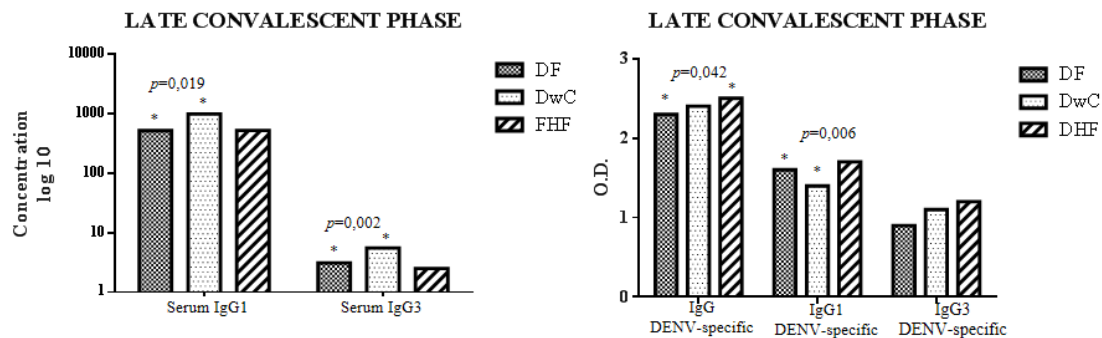


Figure 4: Serum IgG1 and IgG3 and DENV-specific IgG, IgG1 and IgG3 amount in dengue different clinical forms, during late convalescent phase.

A) Serum IgG1: DFxDwC: $p=0,019$, DFxDHF: $p=0,566$; Serum IgG3: DFxDwC: $p=0,002$, DFxDHF: $p=0,335$; **B)** DENV-specific IgG: DFxDwC: $p=0,108$, DFxDHF: $p=0,042$; DENV-specific IgG1: DFxDwC: $p=0,275$, DFxDHF: $p=0,223$. $P \leq 0,05$ values were considered statistically significant.

Controls: Serum IgG1 - positive control (human serum): O.D.=2,2, negative control (mouse serum): O.D.=0,05; Serum IgG3 - positive control (human serum): O.D.=2,5, negative control (mouse serum): O.D.=0,1; DENV-specific IgG - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=2,2, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,3; DENV-specific IgG1 - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=2,0, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,2; DENV-specific IgG3 - positive control (DENV-positive human serum): O.D.=1,2, negative control (DENV-negative human serum): O.D.=0,07.

DISCUSSION

Our results demonstrated that there is a differential antibody kinetics in serum of dengue-infected individuals with different clinical manifestations. Over the course of the infection, anti-DENV IgG antibodies exhibited higher concentrations in DHF compared to DF. Previous studies had reported that a rapid and potent plasmablast antigen-specific response is induced in dengue infection, predominantly with IgG-secreting cells, reaching maximum values between the 6th-7th day of the onset of patient's symptoms, a period that coincide with the development of the disease severity (25,26). Our results with DENV-specific IgG dosage reinforce these data and adds the possibility of this antibody being used as a biomarker for dengue severity in the disease critical phase, 3-6 days since the onset of the disease symptoms. Published data had proposed anti-dengue NS1 IgG as a biomarker of long-term and recent dengue infection (27) but not for disease gravity.

The study city, Goiânia-GO / Brazil, is a dengue endemic region, and consequently has a high prevalence of secondary infections (22). It is known that DENV response differ in primary and secondary infections. Specific antibodies kinetics and isotypes are distinct during the natural course of the disease. In primary infections, anti-dengue IgG serum levels are generally detectable in lower titers at the end of the first week of the disease, increasing slowly as time passes and remaining detectable for many months, and probably throughout host life, indicating a past DENV infection. Unlike a primary response, during the course of a secondary infection, IgG antibodies titers increases rapidly, even in the acute phase, and persists in high concentrations for 30-40 days (28-31).

Furthermore, our results of serum IgG1 dosage in the convalescent phase may indicate their participation in dengue immunopathogenesis since the highest amount of this antibody was detected in individuals with DHF. This is similar to what was observed with DENV-specific IgG antibodies, with this difference disappearing over the time, when organism tends to return to homeostasis, after antigenic stimulus. Their *et al.* (1993) also demonstrated higher levels of IgG1 in DHF or DSS patients, a similar result obtained by Koraka *et al.* (2001) and more recently, by Posadas-Mondragón *et al.* (2017) (32-34). Although our results corroborated this published data, our study population was composed in majority by young adults and adults, in opposite of Their

et al. (1993) and Koraka *et al.* (2001) study population, composed by children and adolescents (32,33). Posadas-Mondragón *et al.* (2017), despite analyzing variations in IgG subclasses levels in adults, restricted their study to the acute phase (34). It is known that IgG1 and IgG3 concentrations vary according to age (35) and DENV-specific antibodies levels modify in consequence of the population degree of DENV exposure (34). For that reason, studies in populations with distinct epidemiological contexts are necessary. Our study demonstrate the dynamics of IgG antibodies and subclasses in a adult population constantly challenge by DENV and with a high vaccination coverage for another flavivirus, the yellow fever virus. Antibodies cross-reaction between different flaviviruses occurs and can interfere in pathogen response (36).

Our results also indicated that antibodies kinetics are not similar in DHF and DwC. In DwC patients, when compared to DF, a detectable difference in antibody levels appeared later. Serum IgG3 raised and remained elevated until a later period (16-30 days after the onset of symptoms). As in DHF serum, in DwC, IgG1 raised in the convalescence period but unlike what happened with DHF, remained in higher levels for a longer time. DENV-specific IgG, on the contrary, presents in higher concentrations in DwC only in the second week of infection.

Despite of our results with non-DENGUE-specific cytophilic subclasses in serum samples of dengue-infected individuals, we did not detect any significant variation in DENV-specific IgG1 and IgG3 levels in dengue distinct clinical forms. Perhaps as a consequence of limitations of the qualitative assays that were performed for these antibodies dosage, rather than the quantitative ones, used with serum subclasses.

The assay developed to detect DENV-specific IgG1 employed recombinant antigens instead of viral extract, which was used in the assays for the other DENV-specific antibodies detection. This hijacks the detection system and prevents the detection of antibodies that respond to all kind of virus proteins, and may explain our disregarding result. We found, in the later convalescent phase, lower concentrations of DENV-specific IgG1 in DwC samples.

DENV humoral immune protective response is associated with the presence of neutralizing antibodies. However, antibodies that potently neutralize DENV represents only a small fraction of the entire antibodies produced against the virus (37-39). These

neutralizing antibodies reach a peak in the convalescent phase and then, decrease over time (40). Moreover, many human antibodies that strongly neutralize DENV bind only to quaternary epitopes and not linear proteins (41-43). In fact, most of the antibodies generated after primary and secondary infections are cross-reactive and weakly neutralizing (37, 39).

During DENV infection, the antibody response is multispecific and functionally variable. Thereby, *in vitro* assays with the complete viral particle, representing a more heterogeneous antigen preparation, with a mixture of linear and conformational epitopes, may better reflect the dynamics of antigen-antibody interaction that happens *in vivo*, and consequently would allow a better comprehension of the antibody kinetics in the disease immunopathogenesis.

Our, in agreement with several reports in the literature, reinforce the participation of IgG antibodies in dengue immunopathogenesis. This would be possible through different mechanisms such as the activation of the complement system, the antibody-dependent enhancement (ADE) phenomenon and ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity).

CONCLUSION

Our results from this study suggests the participation of IgG antibodies in dengue pathogenesis and point for a future application of immunoenzymatic assays with DENV-specific IgG to monitor the disease severity in dengue infected individuals from endemic areas.

COFLICTS OF INTERESTS

Authors declare that there are no conflicts of interest.

ETHICAL CONSIDERATIONS

This study was approved by the Ethics Committee on Research of the Hospital das Clínicas from Federal University of Goiás, protocol nº 132/2008 (CEPMHA/HC/UFG nº 132/2008). All patients gave informed consent.

REFERENCES

- 1 TSAI, T. F.; HALSTEAD, S. B. Tropical viral infections. Current opinion in infectious diseases 1998. 11: 547–53.
- 2 RODRIGUES N. C. et al. Temporal and Spatial Evolution of Dengue Incidence in Brazil, 2001-2012. Plos One 2016. 11: e0165945.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION: Clinical Diagnosis in: Dengue haemorrhagic fever-Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva 1997. 2nd ed: 12-23.
- 4 HALSTEAD, S. B. et al. Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. Japanese journal of medical science and biology 1967. 20: 96–103.
- 5 CHUANG, Y. C. et al. Dengue virus nonstructural protein-1 induced antibodies cross-react with human plasminogen and enhance its activation. The Journal of Immunology 2016. 196: 1218-1226.
- 6 LARDO, S. et al. The Autoimmune Mechanism in Dengue Hemorrhagic Fever. Acta Medica Indonesiana 2018. 50: 70-79.
- 7 SEHRAWAT, P. et al. Role of Cytokines as Molecular Marker of Dengue Severity. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases 2018. 10: e2018023.
- 8 SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. The American journal of tropical medicine and hygiene 1952. 1: 30–50.
- 9 GUZMÁN, M. G. et al. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. The American journal of tropical medicine and hygiene 1990. 42: 179–84.
- 10 HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. The Yale journal of biology and medicine 1970. 42: 350–62.
- 11 WANG T. T. et al. IgG antibodies to dengue enhanced for FcγRIIIA binding determine disease severity. Science 2017. 355: 395-398.
- 12 RAVETCH, J. V.; KINET, J. P. Fc receptors. Annual Review of Immunology 1991. 9: 457-92.
- 13 RAVETCH, J. V.; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. Annual Review of Immunology 2001. 19: 275-90.

- 14 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* 2002. 185: 1213–21.
- 15 MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological Reviews* 2008. 225: 300-13.
- 16 UBOL, S.; HALSTEAD, S. B. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010. 12: 1829-1835.
- 17 BRÜGGEMANN, M. et al. Comparison of the effector. functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 1987. 66: 1351-13661.
- 18 TAO, M. H.; SMITH, R. I.; MORRISON, S. L. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *Journal of Experimental Medicine* 1993. 178: 661-667.
- 19 MALASIT, P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1987. 3: 316-320.
- 20 MEHLHOP, E. et al. Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. *Cell host & microbe* 2007. 2: 417–426.
- 21 GUILARDE , A. O. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *Journal of Infectious Diseases* 2008. 197: 817-824.
- 22 ARGOLO, A. F. L. T. et. al. High frequency of a pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Centrak Brazil. *BMC Infectious Diseases* 2016. 16: 546-553.
- 23 ROCHA, B. A. M. et al. Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil. *Infectious Diseses of Poverty* 2017. 6: 116.
- 24 BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE: Dengue. Diagnóstico e manejo clinico-adulto e criança. Brasília 2005. 3ª ed: 2005.
- 25 GARCIA-BATES, T. M. et al. Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients. *Journal of Immunology* 2013. 1: 80-87.

- 26 WRAMMERT, J. N. et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *Journal of Virology* 2012. 86: 2911–2918.
- 27 NASCIMENTO E. J. M. et al. Development of antibody biomarkers of long term and recent dengue virus infections. *Journal of Virology Methods* 2018. 257: 62-68.
- 28 GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases* 2004. 8: 69–80.
- 29 BUCHY, F. et al. Laboratory tests for the diagnosis of dengue virus infection. Geneva, TDR/Scientific Working Group 2006. TDR/SWG/08.
- 30 VAZQUEZ, S. et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue three virus infections. *International Journal of Infectious Diseases* 2007. 11: 256–62.
- 31 GUZMÁN, M. G.; ROSARIO, D.; KOURI, G. In: *KALITZKY, M.; BOROWSKI, P.* eds. *Diagnosis of dengue virus infection. Molecular Biology of the flaviviruses.* Horizon Bioscience, UK, 2009.
- 32 THEIN, S. et al. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. *Journal of medical virology* 1993. 40: 102–106.
- 33 KORAKA, P. et al. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *Journal of clinical microbiology* 2001. 39: 4332–4338.
- 34 POSADAS-MONDRAGÓN, A. et al. Indices of anti-dengue immunoglobulin G subclasses in adult Mexican patients with febrile and hemorrhagic dengue in the acute phase. *Microbiology and Immunology* 2017. 61: 433-441.
- 35- VAN DER GIESSEN, M. et al. Quantification of IgG subclasses in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age. *Clinical and experimental immunology* 1975. 21: 501–509.
- 36- HOUGHTON-TRIVIÑO N; MONTAÑA D; CASTELLANOS J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Revista de Salud Publica* 2008. 10: 299-307.

- 37 BELTRAMELLO, M. et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell host & microbe* 2010. 8: 271–283.
- 38 DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 2010. 328: 745–748.
- 39 DE ALWIS, R. et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLOS Neglected Tropical Disease* 2011. 5: e1188.
- 40 PUSCHNIK, A. et al. Correlation between dengue-specific neutralizing antibodies and serum avidity in primary and secondary dengue virus 3 natural infections in humans. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2013. 7: e2274.
- 41 DE ALWIS, R. et al. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012. 109: 7439–7444.
- 42 TEOH, E. P. et al. The structural basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. *Science Translational Medicine* 2012. 4: 139-183.
- 43 FIBRIANSAH, G. et al. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Molecular Medicine* 2014. 6:358-371.

Artigo 2.

POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DE ANTICORPOS EM FENÔMENO DE AUTOIMUNIDADE NA DENGUE

Isabela Cinquini Junqueira¹, Amanda de Oliveira Matos¹, Celina Maria Turchi Martelli², Valeria Christina de Rezende Feres³, Adriana Oliveira Guilarde¹, Lucimeire Antonelli da Silveira¹

¹Instituto de Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

²Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz/PE, Recife, PE, Brazil

³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

RESUMO

A dengue é uma doença viral aguda causada por um dos quatro sorotipos do DENV (DENV- 1 a 4). A infecção causada pelo vírus pode se manifestar em diferentes formas clínicas desde uma doença branda ou uma febre indiferenciada até uma síndrome mais grave caracterizada por sangramentos e extravasamento de plasma. No entanto, As razões que levam ao desenvolvimento das formas mais graves da dengue ainda não estão totalmente esclarecidas. Pesquisas recentes têm demonstrado o envolvimento de infecções pelo vírus da dengue com fenômenos de autoimunidade em consequência do mimetismo molecular entre plaquetas, células endoteliais e moléculas do sistema coagulatório com proteínas virais. Assim, neste estudo, investigamos uma possível correlação entre a quantidade de anticorpos dos isótipos IgM e IgG com mudanças nas concentrações de plaquetas e leucócitos em indivíduos com dengue a fim de acrescentar evidências que ajudem a sustentar a hipótese do envolvimento da resposta humoral do indivíduo na patogênese da doença. Para isso, selecionamos 129 indivíduos diagnosticados com dengue com as diferentes formas clínicas doença e realizamos análises de correlação entre seus dados de contagem de plaquetas, leucócitos e medida do TAP com a concentração de anticorpos IgG, IgM antígenos específicos e proteína viral NS1. Nossos resultados demonstraram um aumento estatisticamente significativo de IgG e IgM antígeno específicas quando da diminuição de plaquetas e leucócitos em pacientes com as diferentes formas clínicas da dengue, o que pode sugerir a atuação destas moléculas na depleção destes constituintes sanguíneos.

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral aguda causada por um dos quatro sorotipos do DENV (DENV- 1 a 4). A infecção causada pelo vírus pode se manifestar em diferentes formas clínicas desde uma doença branda ou uma febre indiferenciada até uma síndrome mais grave caracterizada por sangramentos e extravasamento de plasma (RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

As razões que levam ao desenvolvimento das formas mais graves da dengue ainda não estão totalmente esclarecidas. Acredita-se que haja a participação de diversos fatores, entre eles, características do próprio vírus, da genética do hospedeiro e a resposta de citocinas (RICCO-HESSE et al., 1997; SRIKIATKHACHORN; MATHEW; ROTHMAN, 2017; SANTOS et al. 2017).

Estudos também apontam a participação da resposta imune humoral ao DENV na imunopatogênese da doença. Anticorpos produzidos em resposta ao vírus da dengue podem apresentar reatividade cruzada com componentes do organismo do indivíduo gerando um processo de autoimunidade induzida pelo DENV com consequências no aumento da gravidade da doença (LIN et al., 2003). Análises proteômicas e de homologia da proteína viral NS1 demonstram que a região C-terminal desta proteína apresenta epítomos que são compartilhados pelo organismo humano (CHENG et al., 2009). Além disso, a infecção pelo DENV também pode levar à produção de anticorpos IgM reativos com plaquetas, levando à lise e inibição da agregação das mesmas (LIN et al., 2001). Também tem-se relatado uma potencial reatividade de anticorpos anti-DENV com o plasminogênio. Dessa forma, a disfunção tecidual, a trombocitopenia e as consequentes ocorrências de hemorragia e extravasamento de plasma na dengue podem ser causadas por uma resposta humoral descontrolada, levando a um estado transitório de autoimunidade induzido pelo vírus (CHUANG et al., 2016; WAN et al., 2016).

Neste estudo, investigamos uma possível correlação entre a quantidade de anticorpos dos isótipos IgM e IgG com as concentrações de plaquetas e leucócitos em indivíduos com dengue, a fim de gerar evidências que possam sustentar a hipótese do envolvimento dos anticorpos anti -DENV específicos na patogênese da doença.

METODOLOGIA

População de estudo

A população do estudo foi selecionada a partir de uma coorte de indivíduos diagnosticados com as diferentes formas clínicas da dengue (WHO, 2009), recrutados em distintas unidades de saúde da cidade de Goiânia-GO: Hospital Estadual de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad (HDT), Hospital São Judas, CAIS Chácara do Governador, CIAMS Novo Horizonte, Hospital Cidade Jardim, CAIS Campinas, Hospital de Dermatologia Sanitária e Hospital São Francisco de Assis.

O diagnóstico da infecção pelo vírus DENV foi realizado através da dosagem de anticorpos IgM e IgG, pesquisa da proteína viral NS1 e detecção do genoma viral por RT-PCR.

A coorte foi acompanhada durante o período epidêmico de 2012-2013, previamente à introdução do ZIKA vírus e da vacina para a dengue no país. Nesta população foi observado a co-circulação dos quatro sorotipos virais do DENV (DENV1-4), com prevalência do DENV-4 (ROCHA et. al, 2017) e um predomínio de resposta de anticorpos multítípica (ARGOLO et. al, 2016).

Crítérios de inclusão

Como critério de inclusão para participação neste estudo, foram selecionados a partir de um banco de dados, indivíduos que apresentavam diagnóstico confirmado de infecção aguda pelo DENV. Após a seleção dos indivíduos, foram coletadas informações a respeito de resultados de dosagem de anticorpos IgM e IgG anti-DENV, proteína viral não estrutural 1 (NS1), contagem de leucócitos e plaquetas e medida do valor do tempo de atividade da protrombina (TAP).

Amostras de estudo

Amostras biológicas (soro e plasma) dos indivíduos participantes da pesquisa foram coletadas em dois momentos distintos no curso da infecção, durante a fase aguda, compreendendo do 1º ao 7º dia após o início dos sintomas e de convalescência, do 8º ao 15º dia após o início dos sintomas.

Sorologia IgM e IgG

Nas amostras de soro dos indivíduos participantes do estudo, anticorpos IgM e IgG antidengue foram dosados por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) de captura e indireto respectivamente, utilizando *kit* comercial (PanBio, Pty, Ltd., Brisbane, Austrália), conforme instruções do fabricante . A proteína viral NS1 também foi dosada por ELISA, com método semi-quantitativo, utilizando *kit* comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) e seguindo as instruções dos fabricantes.

Classificação dos indivíduos em casos primários e secundários de dengue

Para a classificação dos indivíduos em casos de infecção primária ou secundária foi utilizada a razão entre IgM e IgG DENV-específicos, sendo classificado como

portador de uma infecção primária aqueles pacientes cuja razão entre estes anticorpos foi $\geq 1,2$ e, de episódios secundários, aqueles com a razão menor do que 1,2 (SHU et al., 2003).

Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os programas IBM SPSS Statistics versão 23 e GraphPad Prism 6. Nas análises da concentração das variáveis sorológicas e laboratoriais nas diferentes formas clínicas da dengue foi empregado o teste U de Mann-Whitney e, para análise da possível relação entre estas variáveis, o teste de correlação de Spearman. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Considerações éticas

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás protocolo nº 132/2008 (CEPMHA/HC/UFG nº 132/2008).

Foi realizado o esclarecimento a respeito da pesquisa com os pacientes e, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, procedeu-se o preenchimento de formulário contendo informações referentes a dados pessoais e fatores de risco relacionados à infecção pelo dengue.

RESULTADOS

Características da população de estudo

Após o emprego dos critérios de inclusão, participaram do estudo 129 indivíduos, sendo a maioria pertencente ao sexo feminino (55,1%). A mediana de idade desta população foi de 34 anos, com idade máxima de 82 anos e mínima < 1ano. A faixa etária de 16-49 anos foi a que apresentou o maior número de indivíduos (Tabela 1).

Tabela 1: Características da população de estudo: distribuição por gênero, idade e formas clínicas da dengue.

CARACTERÍSTICAS	N	%	Dengue	DCSA	DG
Sexo					
Masculino	58	44,9	22	29	7
Feminino	71	55,1	26	39	6
Faixa etária					
≤5 anos	1	0,7	1	-	-
6-15 anos	6	4,6	2	4	-
16-49 anos	91	70,5	31	48	12
≥50 anos	31	24	14	16	1

DCSA: dengue com sinais de alarme, DG: dengue grave.

Concentração de Imunoglobulinas, proteína NS1 e parâmetros laboratoriais entre as diferentes formas clínicas da dengue

No curso da fase aguda da dengue (0-7 dias), nossos resultados demonstraram uma diferença significativa na quantidade de leucócitos e da proteína viral NS1 entre as formas clínicas dengue e dengue com sinais de alarme (DSA). A quantidade de proteína NS1 foi maior na forma mais grave da doença ao contrário do número de leucócitos, que se apresentou menor nos indivíduos com DSA (Tabela 2).

Tabela 2: Quantidade de leucócitos, plaquetas, IgG, IgM, proteína NS1 e medida do TAP entre as diferentes formas clínicas da dengue na fase aguda da doença.

FASE AGUDA (0-7 DIAS)				
Características	Dengue	DCSA	DG	P
Leucócitos/mm ³	4565	3595	4150	Dengue/DCSA = 0,039*
	(n=46)	(n=62)	(n=12)	Dengue/DG = 0,759

Plaquetas/mm³	154.000 (n=46)	121.000 (n=62)	96.100 (n=12)	Dengue/DCSA = 0,110 Dengue/DG = 0,07
TAP	58,9 (n=37)	58,5 (n=54)	68,7 (n=9)	Dengue/DCSA = 0,984 Dengue/DG = 0,312
D.O. IgG	2,3 (n=44)	2,1 (n=60)	2,4 (n=12)	Dengue/DCSA = 0,329 Dengue/DG = 0,968
D.O. IgM	0,87 (n=26)	0,94 (n=34)	1,1 (n=8)	Dengue/DCSA = 0,273 Dengue/DG = 0,167
D.O. NS1	0,72 (n=46)	1,3 (n=68)	1,3 (n=12)	Dengue/DCSA = 0,037* Dengue/DG = 0,969

DCSA: dengue com sinais de alarme, DG: dengue grave, TAP: tempo de atividade da protrombina, D.O. densidade ótica, NS1: proteína não estrutural-1*resultados significativos ($p \leq 0,05$).

Após a primeira semana de infecção, os indivíduos com DAS mantiveram uma menor contagem de leucócitos quando comparados com indivíduos com a forma mais branda da doença ($p=0,011$). Neste mesmo período de observação, a quantidade dos outros parâmetros analisados não apresentaram variações estatisticamente significativas que pudessem se correlacionar com a gravidade da doença (Tabela 3).

Tabela 3: Quantidade de leucócitos, plaquetas, IgG e medida do TAP entre as diferentes formas clínicas da dengue na fase de convalescência da doença.

FASE DE CONVALESCÊNCIA (8º-15º DIAS)				
Características	Dengue	DCSA	DG	p
Leucócitos/mm³	6285 (n=26)	5370 (n=41)	6.800 (n=10)	Dengue/DCSA= 0,011* Dengue/DG= 0,596
Plaquetas/mm³	201.000 (n=26)	97.000 (n=41)	229.000 (n=10)	Dengue/DCSA= 0,620 Dengue/DG= 0,416

TAP	56,7 (n=22)	57,6 (n=34)	55,8 (n=7)	Dengue/DCSA = 0,669 Dengue/DG = 0,899
D.O. IgG	2,1 (n=7)	2,5 (n=9)	1,6 (n=2)	Dengue/DCSA = 0,560 Dengue/DG= 0,143

DCSA: dengue com sinais de alarme, DG: dengue grave, TAP: tempo de atividade da protrombina, D.O. densidade ótica, *resultados significativos ($p \leq 0,05$).

Correlação entre concentração IgM e IgG com a quantidade de leucócitos e plaquetas

A análise de correlação entre imunoglobulinas e parâmetros laboratoriais, número de plaquetas e leucócitos, demonstrou uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de IgG e plaquetas ($r= -0,297$, $p =0,000$) (figura 1A) e IgG e leucócitos ($r= -0,223$, $p= 0,007$) (figura 1B) na fase aguda da infecção. Este fenômeno não foi observado durante a fase de convalescência (Figura 1C e 1D).

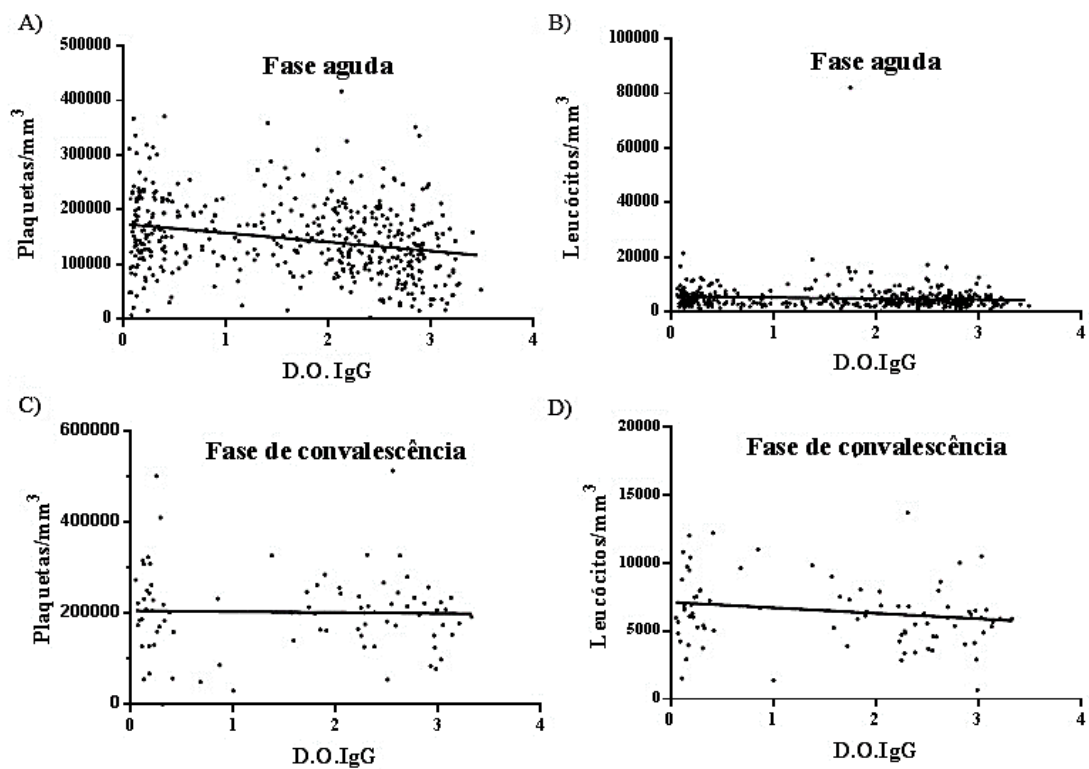


Figura 1: Correlação entre quantidade de IgG com a contagem de plaquetas/ leucócitos na fase aguda e de convalescência da infecção.

Análise de correlação entre. **A:** Plaquetas e D.O. de IgG na fase aguda da infecção ($r = -0,297$, $p = 0,000$); **B:** correlação entre D.O. de IgG com contagem de leucócitos na fase aguda da infecção ($r = -0,223$, $p = 0,007$); **C:** correlação entre D.O. de IgG e contagem de plaquetas na fase de convalescência ($r = -0,003$, $p = 0,985$); **D:** correlação entre D.O. de IgG e contagem de leucócitos na fase de convalescência ($r = -0,158$, $p = 0,387$); ($p \leq 0,05$).

Assim como foi observado para a IgG, os anticorpos do isótipo IgM apresentaram uma correlação inversamente proporcional com a contagem de leucócitos ($r = -0,247$, $p = 0,003$) e plaquetas ($r = -0,311$, $p = 0,000$) (Figura 2), ambos na fase aguda da infecção.

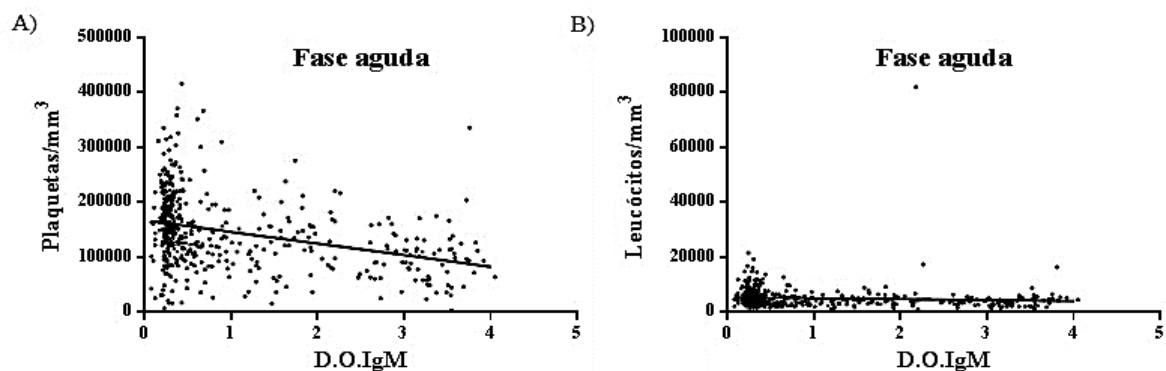


Figura 2: Correlação entre quantidade de IgM com a contagem de plaquetas/ leucócitos na fase aguda da infecção.

Análise de correlação entre. **A:** Plaquetas e D.O. de IgM na fase aguda da infecção ($r = -0,311$, $p = 0,000$); **B:** correlação entre D.O. de IgM com contagem de leucócitos na fase aguda da infecção ($r = -0,247$, $p = 0,003$); ($p \leq 0,05$).

A dinâmica de produção de anticorpos varia entre infecções primárias e secundárias, principalmente na fase aguda. Sendo assim, as quantidades de IgG e IgM foram analisadas nas diferentes formas clínicas da dengue em indivíduos com infecções primárias e secundárias no período de 0-7 dias. Observou-se que, durante a infecção primária, a correlação entre as imunoglobulinas e as contagens dos componentes sanguíneos não apresentou resultados significativos. Por sua vez, em infecções secundárias pelo DENV observou-se uma correlação significativa e inversamente

proporcional entre IgM/IgG e a contagem de leucócitos (IgM/leucócitos: $r = -0,389$, $p = 0,025$; IgG/leucócitos: $r = -0,451$, $p = 0,008$) e IgG com plaquetas ($r = -0,368$, $p = 0,035$).

A correlação entre o tempo de atividade da protrombina (TAP) e a dosagem sérica da proteína viral NS1 não apresentou diferença significativa ($r = -0,750$, $p = 0,423$) (Figura 3).

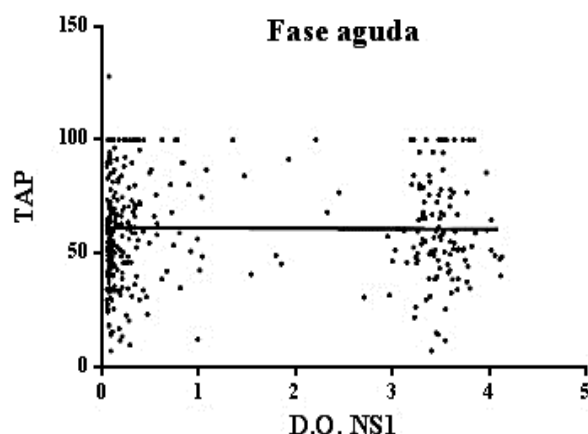


Figura 3: Correlação entre quantidade da NS1 com TAP na fase aguda da infecção.

Análise de correlação entre D.O. do antígeno NS1 com a TAP na fase aguda da infecção ($r = -0,75$, $p = 0,423$); ($p \leq 0,05$).

A fim de verificar se o fenômeno observado acima (Figura 1-3), se relacionava com uma maior gravidade da doença, analisou-se a relação entre a concentração de IgG e IgM com o número de leucócitos/plaquetas (ou vice-versa) em indivíduos com dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Os resultados obtidos demonstraram a existência de correlação significativa e inversa entre as quantidades de IgM e IgG com o número de plaquetas e de IgG com o número de leucócitos em amostras biológicas de indivíduos com dengue com sinais de alarme e de IgM/plaquetas com dengue grave. Não observou-se nenhuma correlação entre estes parâmetros na forma clínica mais branda da doença (Tabela 4).

Tabela 4: Correlação entre imunoglobulinas e plaquetas/leucócitos na fase aguda da infecção, nas diferentes formas clínicas da dengue.

Parâmetros correlacionados	FASE AGUDA		
	Dengue	DsA	DG
IgG/plaquetas	(n=45) $r = -0,195$ $p = 0,198$	(n=62) $r = -0,498$ $p = 0,000^*$	(n=12) $r = -0,434$ $p = 0,159$
IgM/plaquetas	(n=45) $r = -0,209$ $p = 0,168$	(n=62) $r = -0,390$ $p = 0,001^*$	(n=12) $r = -0,587$ $p = 0,045^*$
IgG/leucócitos	(n=45) $r = 0,238$ $p = 0,570$	(n=62) $r = -0,286$ $p = 0,024^*$	(n=12) $r = -0,350$ $r = 0,264$
IgM/leucócitos	(n=45) $r = -0,158$ $p = 0,299$	(n=62) $r = -0,214$ $p = 0,095$	(n=12) $r = -0,035$ $p = 0,914$

DAS: dengue com sinais de alarme, DG: dengue grave; r : coeficiente de correlação. *resultados significativos ($p \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

Em pacientes com dengue já é bem documentado a ocorrência de alterações de parâmetros laboratoriais nas diferentes formas clínicas da doença tais como contagem de plaquetas e de leucócitos (AZEREDO et. al., 2018). Na população deste estudo observou-se diferenças entre as formas clínicas dengue e DAS na contagem de leucócitos. Por outro lado, não foi observada uma diminuição significativa no número de plaquetas em indivíduos com as formas clínicas mais graves da doença quando comparados com aqueles com a doença mais branda. Este fato pode ser um reflexo do pequeno número de participantes do estudo com a forma mais grave da doença.

Durante o curso de infecção pelo DENV, a proteína NS1 é secretada precocemente e apresenta uma relação direta com a carga viral (ALCON-LEPODER et al., 2005; HUANG et al., 2006). Sendo assim, em casos graves observa-se um aumento sérico desta proteína (PARANAVITANE et al., 2014). Como esperado, em nosso estudo a dosagem da proteína NS1 foi maior nos pacientes com a forma clínica dengue com sinais de alarme quando comparado com indivíduos que apresentavam a forma mais branda da doença.

Pesquisas recentes têm demonstrado o envolvimento de infecções pelo vírus da dengue com fenômenos de autoimunidade (GARCIA et al., 2010; JARDIM et al., 2012; RAJADHYAKSHA; MEHRA, 2012). Mimetismo molecular entre plaquetas, células endoteliais, moléculas do sistema coagulatório com as proteínas NS1, prM e E poderia explicar a reatividade cruzada de anticorpos anti-NS1, anti-prM e anti-E com proteínas do hospedeiro tais como a proteína do choque térmico, a dissulfeto isomerase e a vimetina (CARR et al., 2003), direcionando a resposta imune anti-viral contra constituintes do próprio organismo. As consequências deste fenômeno seriam disfunção plaquetária, apoptose de células endoteliais e defeitos na coagulação. Anticorpos anti-NS1 de reatividade cruzada, juntamente com macrófagos ativados por IFN- γ e células endoteliais ativadas por TNF - α podem atuar opsonizando plaquetas, potencializando a sua fagocitose (LIN et al., 2011; LIU et al., 2011, WAN et. al. 2016). Esta condição poderia contribuir para o aumento da permeabilidade capilar e/ou trombocitopenia nas formas mais graves da dengue. Além disso, foram encontrados níveis maiores de autoanticorpos anti-plaquetas e anti- células endoteliais em pacientes com FHD/SSD (LIN et al., 2003) sugerindo a participação destes anticorpos na maior gravidade da doença.

Além do mimetismo molecular que ocorre entre componentes do DENV e constituintes de plaquetas, células endoteliais e proteínas do sistema da coagulação, outros mecanismos tais como a ativação de células "*bystander*" e a persistência viral podem explicar a resposta autoimune (LARDO et al., 2018; HALSTEAD, 2008). Estes mecanismos envolvem fenômenos de autoimunidade, que invariavelmente são transitórios durante um processo infeccioso e não implicam na quebra da tolerância imunológica ao próprio. Nas doenças autoimunes, ao contrário, a causa subjacente de sua patogênese compreende a desregulação de mecanismos de supressão de clones de

linfócitos T autorreativos, instalando um quadro permanente do fenômeno autoimune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

No presente estudo a hipótese implicando fenômenos de autoimunidade foi investigada indiretamente por análises de correlações entre a quantidade sérica de anticorpos com a de plaquetas e leucócitos. Foi verificado um aumento de IgG e IgM antígeno específicas quando da diminuição de plaquetas e leucócitos em pacientes com dengue, o que pode sugerir a atuação destas moléculas na destruição destes constituintes sanguíneos. Além disso, conseguimos relacionar também a ocorrência deste fenômeno com a maior gravidade da doença. A associação de anticorpos anti- DENV com a baixa concentração de leucócitos, como demonstrado para IgG em DSA, até a presente data não tinha sido relatada, apesar de já ser bem caracterizado um quadro de leucopenia nos pacientes com dengue.

A proteína NS1 viral induz o extravasamento vascular através de fatores inibitórios da migração de macrófagos e autofagia (CHEN et al., 2016). Apresenta a capacidade de se ligar diretamente na superfície celular e causar o rompimento da integridade endotelial (MODHIRAN et al., 2015) e também pode se ligar à protrombina e suprimir sua ativação, o que afeta as funções coagulatórias do hospedeiro (LIN et al., 2012). Pesquisas recentes também demonstraram outro possível papel para esta proteína causando disfunções no sistema coagulatório. A proteína NS1 pode induzir a produção de anticorpos que reagem cruzadamente com o plasminogênio, o que pode aumentar a ativação do mesmo (CHUANG et al., 2016) resultando em distúrbios da hemostasia. A fim de observar a possibilidade do envolvimento desta proteína com distúrbios da coagulação correlacionamos a dosagem de NS1 e TAP de indivíduos com dengue. No entanto, os resultados obtidos no nosso estudo não reforçaram esta hipótese. Entretanto é importante levar em consideração que a população deste estudo em sua maioria foi composta de indivíduos com infecção secundária. Sabe-se que neste tipo de infecção altos níveis de anticorpos NS1 podem promover o *clearance* da proteína NS1 circulante (CLAPHAN et al., 2016). Isto poderia justificar a ausência de correlação entre estes parâmetros avaliados devido à uma ação biológica do anticorpo neutralizando a proteína e reduzindo sua disponibilidade para interação com a TAP ou para sua detecção sérica.

Sendo assim, os resultados encontrados neste artigo sustentam a hipótese do fenômeno de autoimunidade na dengue com a participação de anticorpos associados

com fatores envolvidos com o agravamento da doença. Contudo, a autoimunidade não é o único mecanismo no qual as imunoglobulinas anti-DENV participariam favorecendo quadros graves da dengue. O fenômeno ADE (HALSTEAD, 1970; ALVARES et al., 2006), talvez o mais conhecido dos mecanismos da imunopatogênese, também envolve a participação da resposta imune humoral e é usado como principal justificativa para as observações epidemiológicas de casos mais graves de dengue, associados à ocorrência de infecções primárias em crianças (HALSTEAD, 1967) e secundárias heterotípicas em adultos (GIBBONS et al., 2007).

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Tolerância Imunológica e Autoimunidade. In: *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro-RJ: **ELSEVIER**, p. 319-344, 2012.

ALCON-LEPODER, S. et al. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. **Journal of virology**, v. 79, n. 17, p. 11403–11, 2005.

ALVAREZ, M. et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 6, p. 1113–7, 2006.

ARGOLO, A. F. L. T. et. al. High frequency of a pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Centrak Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 546-553, 2016.

AZEREDO, E. L. et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. **Plos Currents**, v. 10, pii: ecurrents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5, 2018.

CARR, J. M. et al. Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. **Journal of Medical Virology**, v. 69, p. 521-28, 2003.

CHEN, H. R. et al. Dengue virus nonstructural protein 1 induces vascular leakage through macrophage migration inhibitory factor and autophagy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1-19, 2016.

CHENG, H. J. et al. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n.1, p. 63-73, 2009.

CHUANG, Y. C. et al. Dengue virus nonstructural protein-1 induced antibodies cross-react with human plasminogen and enhance its activation. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 3, p. 1218-1226, 2016.

CLAPHAM, H. E., et al. Modelling Virus and Antibody Dynamics during Dengue Virus Infection Suggests a Role for Antibody in Virus Clearance. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 5, e100495, 2016.

GARCÍA G. et al. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue- infected persons and its association with immunological disorders. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 38-3, 2010.

GIBBONS, R. V et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 5, p. 910–3, 2007.

HASTEAD, S. B. Dengue. In: tropical medicine science and practice. Korea: International Vaccine: Imperial College Press, p. 469-471, 2008

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 42, n. 5, p. 350–62, 1970.

HALSTEAD, S. B. et al. Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. **Japanese journal of medical science & biology**, v. 20 Suppl, n. 23, p. 96–103, 1967.

HUANG, K. J. et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 5, p. 2825–32, 2006.

JARDIM, D. L. et al. Autoimmune features caused by dengue fever: a case report. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 92-5, 2012.

LARDO, S. et al. The Autoimmune Mechanism in Dengue Hemorrhagic Fever. **Acta Medica Indonesiana**, v. 50, n. 1, p. 70-79, 2018.

LIN, S.W. et al. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. **Journal of Infection**, v. 64, n. 3, p. 325-334, 2012.

LIN, Y. S. et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 236, n. 5, p. 515–23, 2011.

LIN, C. F. et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **Journal of Medical Virology**, n. 69, p. 82–90, 2003.

LIN, C. F. et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. **Journal of Medical Virology**, v. 63, n. 2, p. 143-149, 2001.

LIU, I. J. et al. Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9726–36, 2011.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates cell via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 1-2, 2015.

PARANAVITANE, S. A. et al. Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 570, 2014.

RAJADHYAKSHA, A.; MEHRA, S. Dengue fever evolving into systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a case report. **Lupus**, v. 21, p. 999-02, 2012.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244–51, 1997.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-977, 1998.

ROCHA, B. A. M. et al. Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 116, 2017.

SANTOS, A. C. et al. Meta-Analysis of the relationship between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) gene polymorphisms and susceptibility to Dengue. **Immunological Investigations**, v. 46, n. 2, p. 201-220, 2017.

SHU, P. Y. et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 4, p. 622-630, 2003.

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

WAN, S. W. et al. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies contribute to platelet phagocytosis by macrophages. **Thrombosis Haemostasis**, v. 115, n. 3, p. 646-656, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control, new ed. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2009.

Patente

TÍTULO: HIBRIDOMAS MURINOS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTI-FLAVIVÍRUS

Inventores: Isabela Cinquini Junqueira (1º Autor)

Lucimeire Antonelli da Silveira (2º Autor)

Cristina Rodriguez de Oliveira (3º Autor)

Ângela Ferreira Lopes de Teive e Argolo

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente patente de invenção pertence ao setor de biotecnologia e refere-se à produção de hibridomas (2D4F3, 2D4E3 e 2D4D2) produtores de anticorpos monoclonais anti-flavivírus e a aplicação destes anticorpos como insumos para ensaios *in vitro*, utilizados isoladamente como anticorpo conjugado (anticorpo + enzimas ou anticorpo + fluorocromos) e como componente de kits diagnósticos, no estudo da imunopatogênese da dengue e na imunoterapia desta doença e de outras doenças causadas por flavivírus.

1- ESTADO DA TÉCNICA

A dengue é uma doença causada por um vírus que possui quatro sorotipos designados como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 os quais pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Outros membros do mesmo gênero incluem o vírus da febre amarela, o vírus do Nilo Ocidental, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite japonesa, Zika vírus (ZIKV), dentre outros (KUNO et al., 1998).

A infecção por um dos 4 sorotipos do DENV pode se manifestar em distintas formas clínicas, desde uma doença silenciosa ou com sintomas inespecíficos até uma

síndrome mais grave, caracterizada por distúrbios hematológicos que colocam em risco a vida do paciente (RIGAU-PÉREZ et al., 1999).

O Brasil apresenta intensa circulação do vírus da dengue, observando-se uma tendência, com o passar dos anos, de aumento do número de casos e da letalidade da doença. De acordo a Organização Pan Americana de Saúde, no ano de 2017, 252.054 casos de dengue foram notificados no país ocasionando uma taxa de incidência de 119,3 casos a cada 100.000 habitantes, número bastante inferior aos observados nos anos de 2013 (taxa de incidência de 721,5 casos de dengue/100.000 habitantes), 2015 (793,4 casos de dengue/ 100.000 habitantes) e 2016 (716,0 casos de dengue/ 100.000 habitantes), nos quais foram notificados aproximadamente 1,5 milhões de casos da doença (PAHO, 2018).

A dengue também acarreta um peso econômico significativo ao país. Estimativas do custo da doença, considerando períodos epidêmicos e não epidêmicos, variam de US\$ 371 milhões (2009) a US\$ 1,2 bilhões (2013) (MARTELLI et al., 2015).

Até o momento, o tratamento de pacientes com dengue restringe-se ao alívio dos sintomas e cuidados de suporte, inexistindo uma terapia antiviral específica (KAPTEIN; NEYTS, 2016; LOW; OOI; VASUDEVAN, 2017). Uma vacina para o vírus foi recentemente licenciada, mas com ressalvas quanto à sua utilização. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda seu emprego somente em regiões de alta endemicidade da doença, representada por uma soroprevalência de pelo menos 70% (WHO, 2016).

Além disto, com base na experiência recentemente vivenciada no Brasil quando foram observados surtos de febre amarela em diferentes regiões do país, mesmo existindo uma vacina segura e eficaz para a doença, percebe-se que a existência de uma vacina não exclui a necessidade de opções de tratamento para a doença. (GOLDANI, 2017).

Uma opção de tratamento que tem se mostrado promissora em outros modelos de doença é a imunoterapia humana com a administração de anticorpos monoclonais (TIAN; YE; ZHOU, 2017; DOBBIN-SEARS et al., 2018). Anticorpos monoclonais são anticorpos que possuem especificidade única, sendo derivados de um mesmo clone de linfócitos B e que reconhecem um único epítopo antigênico (THIE et al., 2008).

Em 1975, KOHLER e MILSTEIN descreveram a imortalização de células B secretoras de anticorpos de camundongos imunizados através da fusão celular com uma linhagem de mieloma. A linhagem celular resultante (hibridoma) mantém a característica de imortalidade das células do mieloma e a capacidade de produção de anticorpos do linfócito B, possibilitando uma produção contínua de anticorpos (KOHLER; MILSTEIN, 1975).

A utilização destes anticorpos na terapêutica da dengue se encontra em vários estágios de teste para uso clínico. A maioria dos candidatos a imunoterápicos são específicos para o domínio III da proteína do Envelope (EIII) e apresentam capacidade neutralizante para os quatro sorotipos virais (SAOKAEW et al., 2014; ROBINSON et al., 2015; KIM et al., 2016.)

A resposta imunológica natural mediada por anticorpos desempenha um papel chave na proteção contra infecções virais. A neutralização do vírus ocorre através da inibição direta da infectividade viral resultante da ligação de anticorpos à epítomos da partícula viral. Esta resposta é correlacionada à proteção contra a infecção (VANBLARGAN; GOO; PIERSON, 2016) e pode ser artificialmente mimetizada através da utilização terapêutica de anticorpos monoclonais em indivíduos doentes (BURTON; SAPHIRE; PARREN, 2001).

Em termos gerais, em terapias com anticorpos, o objetivo é eliminar ou neutralizar o patógeno ou uma célula-alvo. Para isso, os anticorpos monoclonais atuam através de vários mecanismos. No caso da neutralização, a ligação do anticorpo ao patógeno pode bloquear sua atividade. A neutralização também pode ocorrer através da ligação do anticorpo ao receptor ao qual o patógeno se ligaria, impedindo assim a infecção celular (AIRES; CORTE-REAL; GONCALVES, 2008). Em outros casos, o tratamento efetivo requer o envolvimento de outros mecanismos efetores da resposta imune e o anticorpo pode mediar estas funções (AIRES; CORTE-REAL; GONCALVES, 2008), como por exemplo, a opsonização, com o anticorpo exercendo a atividade de opsonina, ao revestir a partícula viral e potencializar sua fagocitose (CHARTRAIN; CHU, 2008).

A “American Type Culture Collection” (ATCC), principal centro de recursos biológicos, é um centro de aquisição, autenticação, produção, preservação,

desenvolvimento e distribuição de linhagens celulares, microorganismos padrão de referência, entre outros, para pesquisa médica e biológica. Na ATCC, (ATCC, 2018) existem aproximadamente 1000 hibridomas depositados, destes, apenas um hibridoma é específico aos quatro sorotipos do DENV, um produz anticorpos anti-DENV-1, dois anti-DENV-2, um anti-DENV3, um anti-DENV-4 e um anti-flavivírus.

A Busca por patentes de anticorpos anti-flavivírus, anti-dengue ou anti-zika em base de dados de patentes da América Latina e Espanha apresentou como resultado uma patente depositada para anticorpo anti-dengue (LATIPAT, 2018). No Brasil, por sua vez, até o momento, nenhuma patente de anticorpo monoclonal anti-DENV, anti-Zika ou anti-flavivírus se encontra depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (INIPI, 2018). Isto acarreta em certa dificuldade na aquisição de insumos para pesquisa e diagnóstico da dengue no país. Exigindo portanto, a importação destes insumos para este fim, o que implica em demora na entrega e a elevação dos custos, havendo, desta forma, a necessidade de produção destes insumos para suprimento do mercado nacional.

De maneira geral, a produção de anticorpos monoclonais inicia-se com o processo de imunização comumente em camundongos, não exigindo que o antígeno seja purificado. Após este processo e constatado a resposta de linfócitos B ao antígeno, remove-se o baço do animal, a principal fonte destes linfócitos, para utilização na fusão com células tumorais, como mielomas ou linfomas. A fusão entre estas células é possível devido à ação de um composto químico, o polietilenoglicol (PEG). O Híbrido produtor de anticorpos monoclonais é isolado após seleção com meio de cultivo HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) e segue para o processo de clonagem, usando o método de diluição limite. Os sobrenadantes destes hibridomas são testados quanto à produção dos anticorpos, geralmente utilizando as técnicas de imunoquímica como ensaios imunoenzimáticos (ELISA), *Wester blot*, *dot blot*, entre outros, para triagem das células híbridas e caracterização da especificidade dos anticorpos.

Os hibridomas selecionados, clonados e testados podem ser produzidos indefinidamente em meio de cultivo *in vitro* em menor e maior escala. No sobrenadante do cultivo celular de hibridomas é possível a detecção de anticorpos em quantidades que variam de 20 a 100 µg/ml. Essa quantidade pode ser ampliada para 1 a 40 mg/ml com a administração intraperitoneal dos hibridomas em animais histocompatíveis ou

imunodeficientes, que desenvolvem um tumor ascítico (KRETZMER, 2002). Isto também pode ser obtido *in vitro* (LARRICK et al., 1998) com a utilização de biorreatores, tornando ilimitado o suprimento de anticorpos monoclonais produzidos pelo hibridoma. Estas células podem também ser estocadas em nitrogênio líquido para uso a longo prazo.

2- APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA

Uma aplicação sugerida para os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4F3, 2D4E3 e 2D4D2 é a utilização como imunoterápico para o tratamento da infecção causada pelo vírus da dengue. Para isso, a capacidade neutralizante destes anticorpos monoclonais foi testada em reação de soroneutralização com redução em placa (SNRP₅₀) (WHO, 2007) com os vírus Zika (ZIKV), DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

Inicialmente, placas de cultivo celular com 24 cavidades foram recobertas com 500 µl de células Vero (células epiteliais do rim de macaco verde - *Chlorocebus sp.*), na densidade de 3×10^5 cels/ml, 24 - 48 horas antes da realização do ensaio. A seguir, alíquotas de ZIKV, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (1.000 UFP/ml) foram incubadas a 37°C com diferentes diluições dos anticorpos monoclonais a serem testados, partindo da concentração máxima de 0,8 mg/ml até 0,006 mg/ml, realizando diluições seriadas na razão 2. Após esta etapa, 50 µl da mistura Mab + vírus foi distribuída na placa de cultivo previamente revestida com uma monocamada de células VERO e incubada por mais 1 hora a 37°C para adsorção da partícula viral. Ao final deste período, os poços da placa foram cobertos com 500 µl de carboximetilcelulose (CMC) por 6 dias, DENV-1 e DENV-2, 10 dias, DENV-3 e DENV-4, e 8 dias, Zika, a 37°C, 5% CO₂. A revelação da reação foi realizada com corante cristal violeta.

Na concentração máxima testada de 0,8 mg/ml os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4E3, 2D4EF e 2D4D2 não apresentaram capacidade neutralizante para o ZIKV, tendo em vista que a neutralização máxima obtida pelos anticorpos foi de, 39,4% para 2D4E3, 44,8% para 2D4F3 e 45,2% para 2D4D2, não sendo atingida a capacidade de redução de 50% do número de placas (Figura 1).

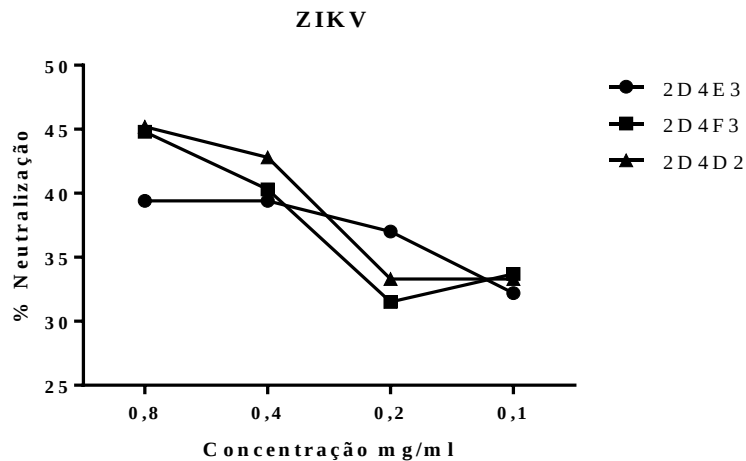


Figura 1: Ensaio de SNRP₅₀ com ZIKV e com os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 2D4D2.

Controle positivo: vírus + anticorpo monoclonal sem especificidade para flavivirus - nenhuma neutralização observada. Controle negativo: anticorpo monoclonal sem vírus - nenhum efeito citopático observado.

Os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 2D4D2 apresentaram capacidade de neutralizar em 50% o número de placas formadas pelo DENV-1, na concentração mínima de 0,2 mg/ml. Nesta concentração a porcentagem de neutralização obtida pelo anticorpo do hibridoma 2D4E3 foi de 53,5%, de 57,2% para o 2D4F3e de 50,7% para o 2D4D2 (Figura 2).

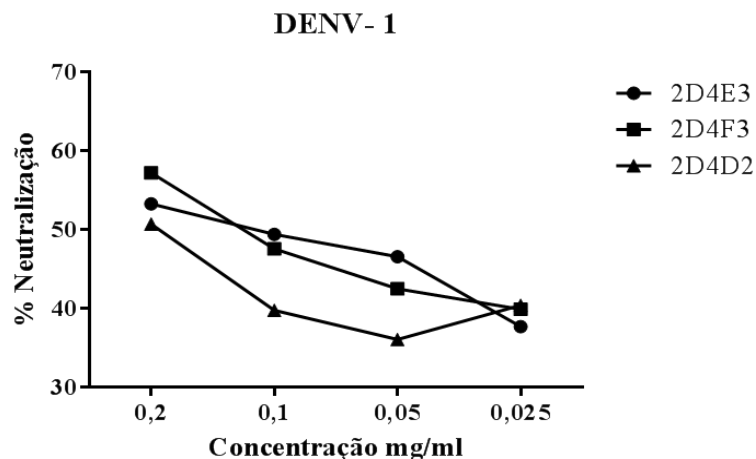


Figura 2: Ensaio de SNRP₅₀ com DENV-1 e com os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 2D4D2.

Controle positivo: vírus + anticorpo monoclonal sem especificidade para flavivirus - nenhuma neutralização observada. Controle negativo: anticorpo monoclonal sem vírus - nenhum efeito citopático observado.

Assim como observado para o DENV-1, os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 2D4D2 apresentaram capacidade de neutralizar em 50% o número de placas formadas pelo DENV-2 na concentração mínima de 0,2 mg/ml. Nesta concentração a porcentagem de neutralização obtida pelo anticorpo do hibridoma 2D4E3 foi de 56,5%, do 2D4F3 foi de 62% e do 2D4D2 foi de 51,6%. (Figura 3).

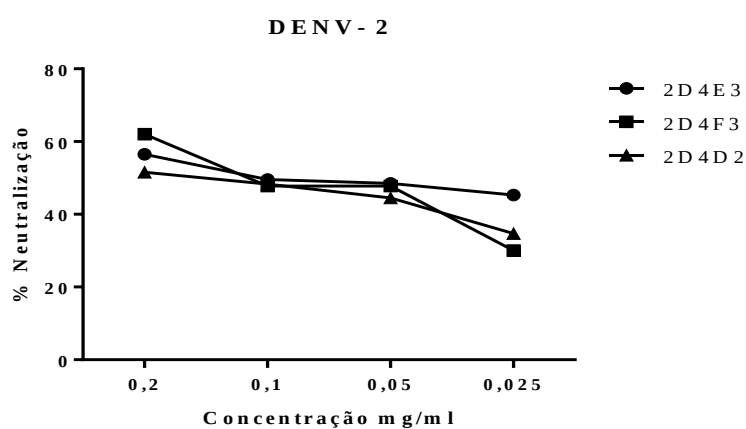


Figura 3: Ensaio de SNRP₅₀ com DENV-2 e com os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 2D4D2.

Controle positivo: vírus + anticorpo monoclonal sem especificidade para flavivirus - nenhuma neutralização observada. Controle negativo: anticorpo monoclonal sem vírus - nenhum efeito citopático observado.

Os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4F3 e 2D4D2 apresentaram capacidade de neutralização superior para o DENV-3, quando comparado com os demais sorotipos do DENV. Para ambos os hibridomas, a capacidade de neutralizar em 50% a formação de placas do DENV-3 foi obtida na concentração de 0,025 mg/ml, sendo obtida a porcentagem de neutralização de 50% (2D4E3) e 53,8% (2D4D2) (Figura 4). Por motivos técnicos, os resultados do hibridoma 2D4E3 não estão apresentados.

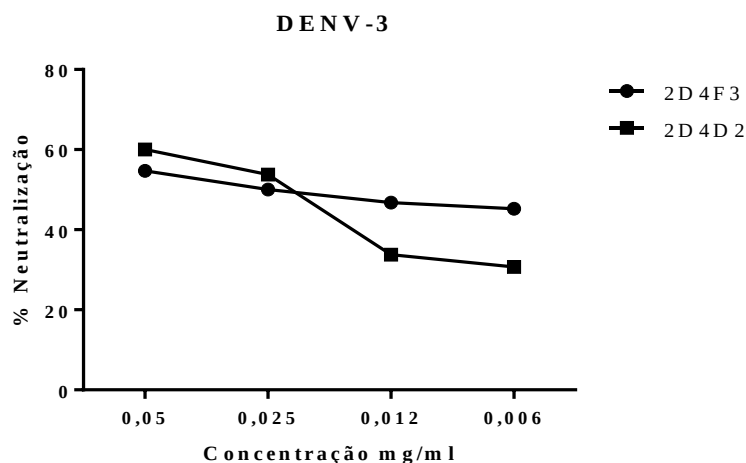


Figura 4: Ensaio de SNRP₅₀ com DENV-3 e com os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4F3 e 2D4D2.

Controle positivo: vírus + anticorpo monoclonal sem especificidade para flavivirus - nenhuma neutralização observada. Controle negativo: anticorpo monoclonal sem vírus - nenhum efeito citopático observado.

Com relação à capacidade neutralizante destes anticorpos para o DENV-4, nas concentrações testadas até o momento, concentração máxima de 0,05 mg/ml, não foi observada capacidade neutralizante satisfatória (2D4E3- 42%; 2D4F3- 41,2% e 2D4D2- 49,3%), não sendo alcançado o limiar de neutralização mínimo de 50%. No entanto, levando em consideração que os anticorpos monoclonais testados neutralizaram o DENV-1 e o DENV-2 em concentrações mais elevadas, é provável que com o aumento das concentrações destes anticorpos, o limiar mínimo de neutralização será alcançado.

Outro emprego sugerido para os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4F3, 2D4E3 e 2D4D2 seria em ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

Com a finalidade de testarmos a aplicação dos anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4F3, 2D4E3 e 2D4D2 como anticorpo secundário foi realizada titulação destes em um ELISA indireto, com procedimento “in house”. Placas de poliestireno (Costar – “high binding”) foram recobertas com extrato bruto dos quatro sorotipos do DENV, diluídos na razão de 1/50 em tampão fosfato-salino (PBS), incubadas “overnight” a 4°C e bloqueadas a 37°C por 2 horas em solução de 5% de leite desnatado. A seguir, o anticorpo a ser testado foi adicionado em diferentes concentrações, na razão 2, a partir da concentração de 20µg/ml variando até $0,9 \times 10^{-5}$

µg/ml. A etapa seguinte consistiu na adição de um anticorpo monoclonal anti-IgG de camundongo conjugado à enzima peroxidase. O substrato utilizado na reação foi o peróxido de hidrogênio e ortofenilenodiamina (OPD) em tampão citrato-fosfato. A reação foi lida no comprimento de onda de 492 nm.

Os anticorpos produzidos pelos três hibridomas apresentaram desempenho semelhante no ELISA testado, sendo indicada a utilização na concentração mínima de 0,625 µg/ml (2D4E3 D.O. = 1,3; 2D4F3 D.O. = 1,3; 2D4D2 D.O. = 1,4) nas condições deste sistema de detecção. A partir da concentração de 0,312 µg/ml observa-se o fim do platô do gráfico de titulação com o início do declínio das D.Os. (Figura 6).

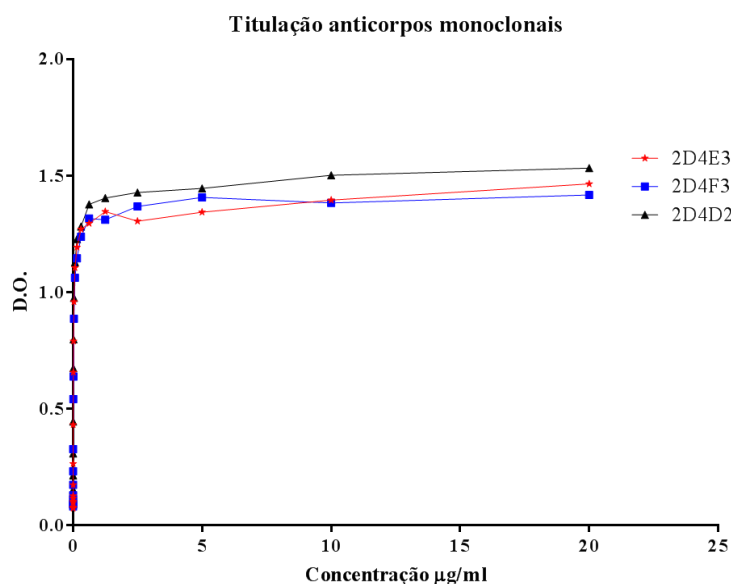


Figura 5: Titulação dos anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4F3, 2D4E3, 2D4D2.

D.O: densidade ótica. Controle positivo: soro de camundongo imunizado com DENV 1-4 na diluição de 1/500, D.O = 2,6; Controle negativo: soro de camundongo não imunizado na diluição de 1/500, D.O = 0,2; Branco da reação: ausência de soro de camundongo, D.O = 0,14.

Os resultados obtidos indicam que os anticorpos produzidos pelos hibridomas 2D4F3, 2D4E3, 2D4D2 apresentam capacidade para utilização na imunoterapia da dengue para os sorotipos virais DENV-1, DENV-2 e DENV-3e também podem ser utilizados como anticorpo secundário, em ensaios de ELISA, em etapa posterior à adição do vírus da dengue como, por exemplo, como conjugado de ensaios de captura para IgM anti-DENV (MAC-ELISA).

anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase seguida pela adição do cromógeno (OPD) e peróxido de hidrogênio. A reação foi lida no comprimento de onda de 492nm.

Os resultados obtidos indicam que os anticorpos monoclonais caracterizados (hibridomas 2D4F3, 2D4E3, 2D4D2) reagem de forma semelhante em ensaios de ELISA, apresentando D.Os. muito próximas em todos os testes. Quanto à especificidade, eles se mostraram mais reativos ao ZIKV, com D.Os. um pouco mais altas, do que ao DENV. No entanto ambas as reações são positivas e portanto, os anticorpos produzidos são anti-flavivírus (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto à especificidade:

Clone	D.O. DENV 1-4	D.O. ZIKV	Especificidade
2D4F3	1,9	2,6	Anti-flavivírus
2D4E3	2,0	2,6	Anti-flavivírus
2D4D2	2,0	2,6	Anti-Flavivirus

D.O. densidade ótica. D.O. controle positivo ZIKV (soro camundongo imunizado com ZIKV): 2,7. D.O. Controle positivo DENV1-4 (soro camundongo imunizado com os 4 sorotipos do DENV): 2,5. D.O. Controle negativo (soro de camundongo não imunizado): 0,1

No ELISA utilizando os quatro sorotipos do DENV separadamente, os anticorpos produzidos pelos hibridomas apresentaram resultados semelhantes para todos os vírus, com pequena variação, indicando sua capacidade de reconhecer igualmente todos os sorotipos do DENV, não se ligando preferencialmente a nenhum sorotipo (Tabela 3).

6- Caracterizações dos anticorpos monoclonais

A caracterização dos anticorpos consistiu na determinação dos isótipos de cadeias leve e pesada (Tabela 1) assim como a definição de sua especificidade (Tabela 2 e 3).

Primeiramente, para a determinação dos isótipos de cadeia leve e pesada, foi realizado um ELISA utilizando um “kit” comercial (*Rapid ELISA mouse mab isotyping kit*, Pierce®) e seguindo as instruções do fabricante.

Os resultados obtidos indicaram que os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas 2D4F3, 2D4E3 e 2D4D2 são do isótipo de cadeia leve kappa e cadeia pesada do subtipo IgG1 (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto aos isótipos de cadeia leve e pesada.

Clone	Classe/ Subclasse (Cadeia Pesada)	Cadeia Leve
2D4F3	IgG1	Kappa
2D4E3	IgG1	Kappa
2D4D2	IgG1	Kappa

A especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos foi determinada através de ELISA com procedimento “*in house*”. Para isso, primeiramente, os anticorpos de interesse foram purificados por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de proteína G (HiTrap Proteína G HP, GE®) e posteriormente foram quantificados por “kit” de dosagem de proteínas (BCA™ *Protein Assay kit*, Pierce®), seguindo instruções do fabricante.

No ELISA de caracterização dos anticorpos, placas de poliestireno (*high binding*, Costar®) foram sensibilizadas com os quatro sorotipos do DENV, misturados e individualmente, e também ZIKV na diluição de 1/50. A seguir foram adicionados os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 2D4D2 na concentração de 20µg/ml. A ligação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de um

As amostras positivas na reação acima foram determinadas utilizando como critério um limiar de reatividade, calculado pela média das absorbâncias dos controles negativos acrescidos de 2 desvios padrões. Aqueles hibridomas que apresentaram resultado negativo neste ELISA foram então descartados e os com resultados positivos, foram clonados.

5- Clonagem

A clonagem compreendeu a obtenção, através da técnica da diluição limite, de híbridos homogêneos, ou seja, originados e replicados a partir de uma única célula-mãe, sendo assim, produtores de anticorpos que reconhecem os mesmos determinantes antigênicos, ou seja, obtendo-se uma população homogênea de anticorpos.

A técnica da diluição limite é realizada da seguinte forma: uma suspensão celular é produzida com os hibridomas a serem clonados e distribuída em placas de cultura de 96 poços (Corning Costar®) de modo a obter 1 célula por poço. De 5 a 7 dias após o início da clonagem, as células são observadas em microscópio invertido. A presença de um único grupo de células caracteriza a proliferação de um único clone. Dois ou mais grupos de células indicam a presença de múltiplos clones. Cerca de 12-15 dias após o início da clonagem, quando as células proliferaram e cobriram toda a superfície do poço, são coletados sobrenadantes dos poços que continham apenas um grupo de células e realizada a mesma técnica de ELISA que foi usada para seleção dos hibridomas pós-fusão. Os sobrenadantes positivos indicam a presença de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais com as especificidades de interesse.

Durante e após a clonagem, os hibridomas são mantidos em meio HT, que consiste no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma) suplementado com 15% de SFB, 1,36 mg/mL de hipoxantina e 388 µg/mL de timidina. Posteriormente, os clones são mantidos em meio simples (DMEN suplementado com 10% de SFB) e expandidos.

de centrifugação. Por fim, este precipitado deve ser ressuspenso em 1/10 a 1/100 do volume original em PBS.

No preparo do inóculo, 3 µl de hidróxido de alumínio foram adicionados a 100 µl de suspensão viral concentrada (mistura equivalente dos quatro sorotipos de DENV), para cada camundongo a ser imunizado.

2- Imunização dos camundongos

Camundongos *Balb/c*, do sexo feminino foram imunizados com 100 µl de inóculo no seguinte intervalo de tempo com 8 doses: zero/dois/quatro/16/18/19/21 e 23 dias.

3- Produção dos hibridomas

Esta etapa compreendeu a fusão de células de mieloma de camundongo, linhagem SP2 Ag 14/10, com as células esplênicas dos camundongos previamente imunizados, originando hibridomas murinos produtores de anticorpos, conforme a técnica de FASEKAS et al. (1980).

4- Seleção dos Hibridomas

A etapa da seleção dos hibridomas compreendeu a triagem dos hibridomas produtores dos anticorpos de interesse dentre um conjunto de hibridomas originados da fusão. Para isto, sobrenadantes da cultura celular dos hibridomas recém-produzidos foram testados através de ensaio imunoenzimático (ELISA) com procedimento “*in house*”. Resumidamente, microplacas de poliestireno (*high binding*-Costar®) foram sensibilizadas com uma mistura dos quatro sorotipos de DENV, os mesmos vírus usados na imunização dos animais, na diluição de 1/1280. A seguir, foi adicionado o sobrenadante do cultivo celular dos hibridomas. A reação foi revelada pela adição de um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (diluição de 1/8.000). O substrato utilizado para esta reação foi OPD e peróxido de hidrogênio em tampão citrato-fosfato. A leitura da reação foi realizada em comprimento de onda de 492 nm.

3- DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA

1- Produção do inóculo viral

Os quatro sorotipos do DENV, cepas protótipo, DENV-1 (Hawaii), DENV-2 (New Guinea C), DENV-3 (H87) e DENV-4 (BC 295/7) foram cultivados em células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 em meio de cultura Leibovitz (L15) com 2% de soro fetal bovino, em estufa a 25-28°C.

O processo de infecção das células C6/36 pelos vírus foi realizado seguindo o seguinte protocolo: Células C6/36 foram repicadas em meio L15 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Ao atingirem 70-80% de confluência celular, desprezou-se o meio da garrafa de cultura e adicionou-se cerca de 1 ml de sobrenadante viral. A garrafa foi então colocada em estufa bacteriológica e homogeneizada a cada 20 minutos até completar 1 hora, tempo necessário para adsorção do vírus. A seguir foi adicionado 15-20 ml de meio de cultura com 2% de soro fetal bovino. As garrafas voltaram para a estufa e permaneceram em cultivo até o aparecimento de efeito citopático. Este tempo é variável conforme o sorotipo viral: 3-4 dias, DENV-1 e DENV-2 e 7-10 dias, DENV-3 e DENV-4.

Após o aparecimento de efeito citopático, as garrafas foram imediatamente congeladas a -80°C e permaneceram nesta temperatura por no mínimo 24 horas. Ao fim das 24 horas, a garrafa infectada foi descongelada em água fria, acrescida de 2% de soro fetal bovino, e seu volume foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos, sob refrigeração. A próxima etapa consistiu em coletar o sobrenadante da centrifugação e seguir para a etapa concentração do vírus.

A concentração do vírus foi realizada acrescentando-se 1 volume da solução de PEG a 50% para cada 4 volumes do sobrenadante contendo o vírus. Esta mistura foi mantida em refrigeração por cerca de 12 horas. Ao fim deste período, foi realizada mais uma centrifugação, a 1.500g por 30 minutos. Nesta fase os vírus concentrados se encontram em um precipitado no fundo do tubo

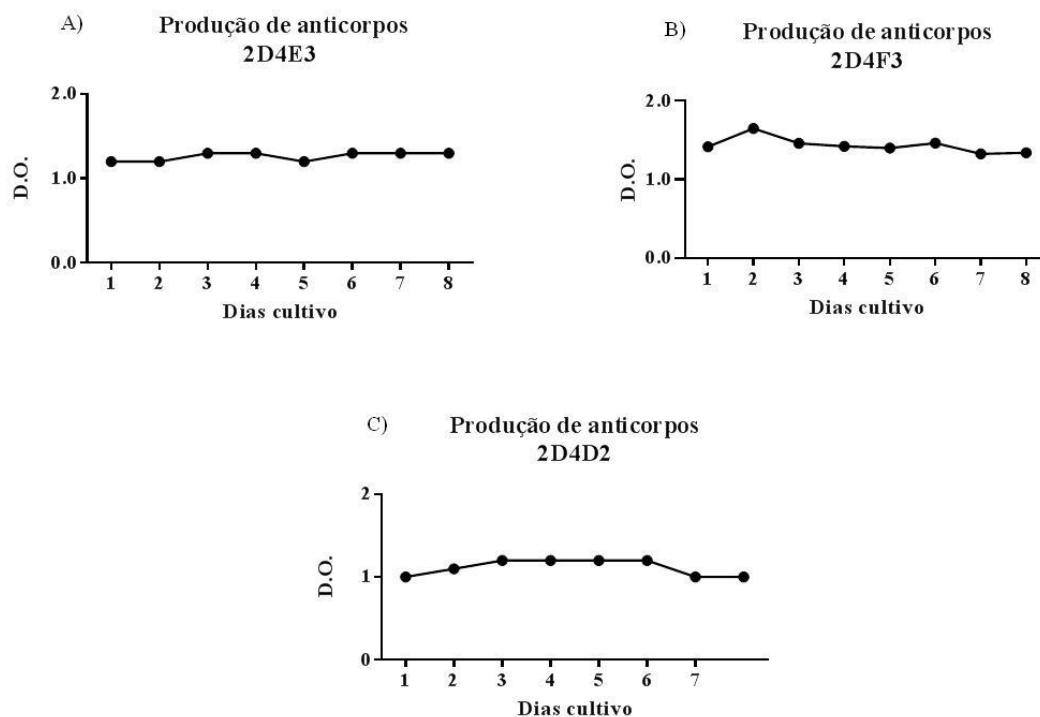


Figura 8: Cinética de produção de anticorpos dos hibridomas 2D4E3, 2D4F3, 2D4D2.

4- REINVINDICAÇÕES:

1. Hibridomas murinos caracterizados por serem capazes de produzir anticorpos monoclonais anti-flavivírus.
- 2- O anticorpo monoclonal anti- flavivírus secretado pelos hibridomas do item 1.
- 3- O processo para a produção do anticorpo monoclonal anti-flavivírus que compreende a cultura do hibridoma reivindicado no item 1 e 2 bem como a obtenção do anticorpo produzido no sobrenadante da cultura dessas células.
- 4- O anticorpo monoclonal produzido em ascite após inoculação em Balb/c dos hibridomas reivindicados no item 1 e 2.
- 5- O anticorpo monoclonal produzido por métodos de cultivo submersos que possibilitem o incremento da massa de anticorpos monoclonais secretados *in vitro* do hibridoma item 1 e 2.
- 6- Uso do hibridoma de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado por produzir anticorpos monoclonais para aplicação como insumos na produção de *kits* de diagnóstico, na fase estacionária de colunas de coluna de cromatografia, imunoterapia e outras possíveis aplicações.

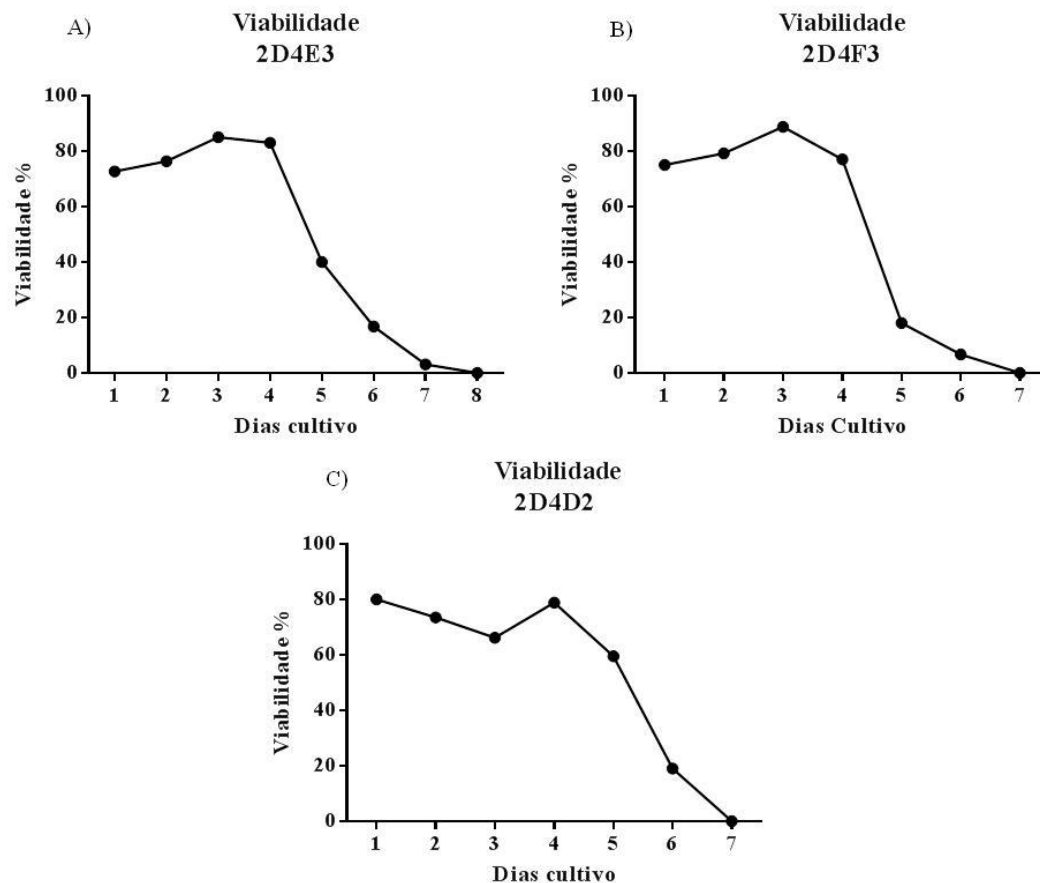


Figura 7: Curva da Viabilidade dos hibridomas 2D4E3, 2D4F3, 2D4D2.

Quanto à cinética de produção de anticorpos, observa-se que, para todos os três hibridomas, desde o primeiro dia de cultivo ocorreu uma elevada produção de anticorpos, que se manteve estável por todo o período de acompanhamento da curva de crescimento celular (Figura 8).

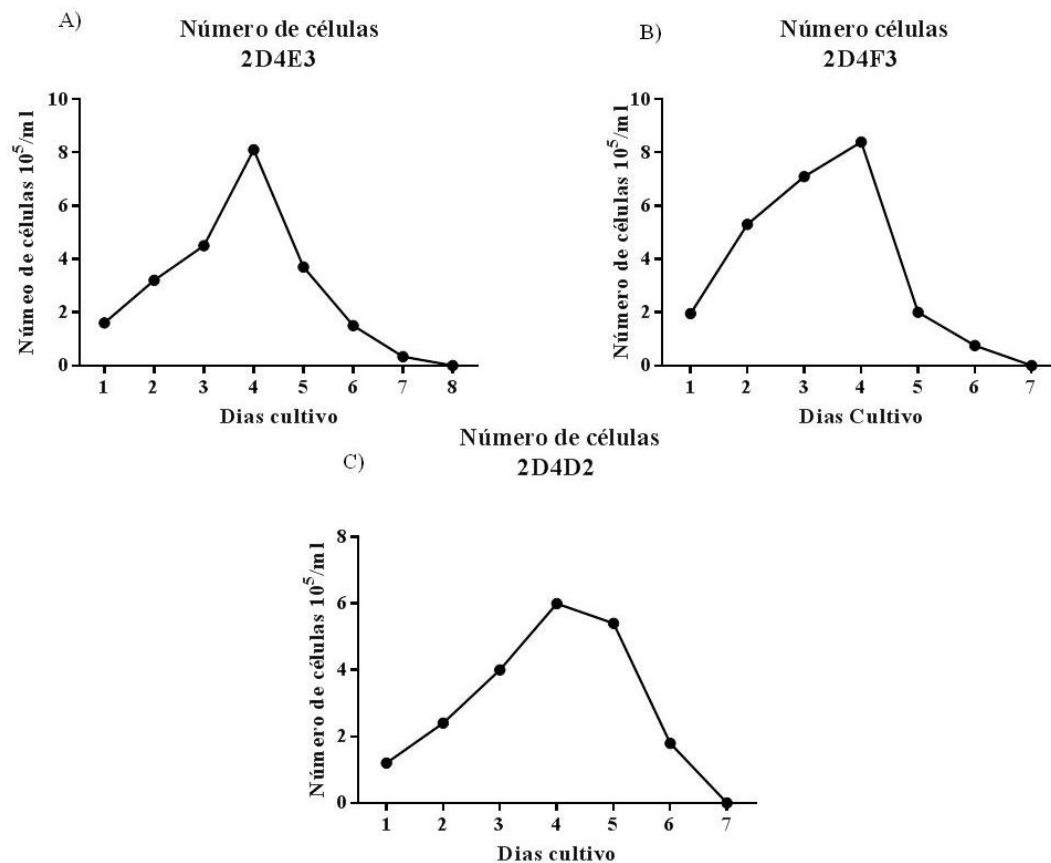


Figura 6: Curva de crescimento celular dos hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 2D4D2.

A viabilidade máxima atingida pelo hibridoma 2D4E3 foi de 85%, 76 horas após o início do cultivo, havendo a seguir queda da viabilidade (Figura 7A). Assim como foi observado para 2D4E3, a viabilidade máxima atingida pelo hibridoma 2D4F3 foi a 76 horas após o início do cultivo, com 88,7% de células vivas (Figura 7B). Ao contrário do observado para os outros dois hibridomas, a viabilidade máxima do hibridoma 2D4D2 (80%) foi alcançada 24 horas após o início do cultivo (Figura 7C).

Tabela 4: Estabilidade do hibridoma quanto à capacidade de produção de anticorpos durante o tempo em cultura.

Clone	Tempo em cultura (dias)	D.O. Média
2D4F3	60	1,04
2D4E3	60	1,24
2D4D2	60	1,31

D.O. densidade ótica. D.O. controle positivo (soro camundongo imunizado com DENV1-4): 2,4. D.O. controle negativo (soro de camundongo não imunizado): 0,07. *Cut off*: 0,13.

A curva de crescimento celular compreende a etapa em que a proliferação e morte celular são avaliadas periodicamente, a fim de se compreender o perfil proliferativo da célula de interesse. Para isso, os hibridomas foram descongelados e 3 dias após o descongelamento, foi retirada uma alíquota da suspensão de células das garrafas de origem correspondente a 2×10^5 células. Esta alíquota foi transferida para outra garrafa e o meio de cultivo foi completado para 5 mL (meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino). As células da curva permaneceram em cultivo por aproximadamente 7 dias. Durante esse período o meio de cultivo não foi trocado e, diariamente, as células foram contadas para determinação da concentração celular, e cálculo da viabilidade, utilizando o corante azul de Trypan. Também foram coletadas alíquotas do sobrenadante do cultivo celular para determinação da cinética de produção de anticorpos pelo mesmo método de ELISA “*in house*” utilizado na etapa de seleção dos hibridomas.

Os hibridomas 2D4E3, 2D4F3 e 2D4D2 atingiram as concentrações celulares máximas de $8,1 \times 10^6$ células/ml (Figura 6A), $8,4 \times 10^6$ células/ml (Figura 6B) e $6,1 \times 10^6$ células/ml (Figura 6C), respectivamente, em 96 horas após o início do cultivo.

Tabela 3: Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto à capacidade de ligação ao DEV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

Clone	D.O. DENV-1	D.O. DENV-2	D.O. DENV-3	D.O. DENV-4
2D4F3	2,0	2,0	1,9	1,8
2D4E3	1,7	2,0	1,8	2,0
2D4D2	1,7	2,1	1,5	2,0

D.O. densidade ótica. D.O. controle positivo DENV1(soro camundongo imunizado com DENV1-4): 2,8. D.O. D.O. controle positivo DENV2(soro camundongo imunizado com DENV1-4): 2,7 D.O. controle positivo DENV3(soro camundongo imunizado com DENV1-4): 2,6 D.O. controle positivo DENV4(soro camundongo imunizado com DENV1-4): 2,6. D.O. controle negativo DENV1 (soro de camundongo não imunizado): 0,1. D.O. controle negativo DENV2 (soro de camundongo não imunizado): 0,1. D.O. controle negativo DENV3 (soro de camundongo não imunizado): 0,1. D.O. controle negativo DENV4 (soro de camundongo não imunizado): 0,1.

7-Avaliação da estabilidade do clone, curva de crescimento e cinética de produção de anticorpos

Na avaliação da estabilidade, os hibridomas foram testados quanto à manutenção da capacidade de produzir anticorpos. Para isso, os clones selecionados foram mantidos em cultivo por 60 dias de forma ininterrupta. Inicialmente os hibridomas foram cultivados em meio HT, e posteriormente mantidos em meio simples (DMEN suplementado com 10% de SFB). Os sobrenadantes coletados durante esse período, foram testados por ELISA para confirmar se manteriam a produção de anticorpos mesmo após tempo de cultivo prolongado. Como mostra a Tabela 4, os hibridomas selecionados continuaram produzindo anticorpos no período analisado.

5- REFERÊNCIAS

AIRES, S. F.; CORTE-REAL, S.; GONCALVES, J. Recombinant antibodies as therapeutic agents: pathways for modeling new biodrugs. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy**, v. 22, n. 5, p. 301-314, 2008

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Hybridomas%20by%20Antigenic%20Determinant.ashx> >. Acesso em 18 setembro 2018.

BURTON, D. R.; SAPHIRE, E. O.; PARREN, P. W. A model for neutralization of viruses based on antibody coating of the virion surface. *Current Topics of Microbiology and Immunology*, v. 260, p. 109-143, 2001.

CHARTRAIN, M.; CHU, L. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 447-467, 2008.

DOBBIN-SEARS, I. et al. Ustekinumab in psoriatic arthritis and related phenotypes. **Therapeutic Advances in Chronic Diseases**, v. 9, n. 10, p. 191-198, 2018.

FASEKAS DE STGROTH, S.; SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. **Journal of Immunological Methods**, v. 35, n. 1, p. 1-21, 1980.

GOLDANI, L. Z. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 21, n. 2, p. 123-124, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp> >. Acesso em 9 set. 2018.

KAPTEIN, S. J.; NEYTS, J. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. **Current Opinion Pharmacology**, v. 30, p. 1-7, 2016.

KIM, S. H. et al. Development of a monoclonal antibody specific to envelope domain III with broad-spectrum detection of all four dengue virus serotypes. **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, v. 473, n. 4, p. 894-898, 2016

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 2, p. 135-142, 2002.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

LATIPAT. ESPACENET: PESQUISA DE PATENTES DA ESPANHA E AMÉRICA LATINA. Disponível em: <http://sistema.bibliotecas-bdigital.fgv.br/bases/latipat-espacenet-pesquisa-de-patentes-da-espanha-e-america-latina> >. Acesso em 9 set. 2018.

LOW, J. G.; OOI, E. E.; VASUDEVAN, S. G. Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. **Journal of Infectious** v. 215, S96-S102, 2017.

MARTELLI, C. M. T. et al. Impact of Dengue: Multicenter Study scross four Brazilian Regions. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, e0004042, 2015.

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

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION: Health information Plataform for the Americas. Disponível em: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/254-dengue-incidencia-en.html?showall=&start=1> >. Acesso em 05 set. 2018.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-977, 1998.

SAOKAEW, N. et al. Human monoclonal single-chain antibodies specific to dengue virus envelope protein. *Letters in Applied Microbiology*, n. 3, p. 270-277, 2014.

THIE, H. et al. Phage display derived therapeutic antibodies. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 43-446, 2008.

TIAN, T.; YE, J.; ZHOU, S. Effect of pertuzumab, trastuzumab and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer: A meta-analysis. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 55, n. 9, p. 720-727, 2017.

VANBLARGAN, L. A.; GOO, L.; PIERSON, T. C. Deconstructing the Antiviral Neutralizing Antibody Response: Implications for Vaccine Development and Immunity. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 84, n. 4, p. 989-1010, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Weekly epidemiological record. Geneva, v. 91, n. 21, p. 265-284, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Dengue Haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, 2nd ed., p. 1-84, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Geneva, WHO/IBV/07.07, p. 1-21, 2007.

5. DISCUSSÃO

Diversos fatores são propostos com envolvimento na imunopatogênese da dengue, entre eles, características genéticas do hospedeiro (FcγR) (ALAGARASU et al., 2015), antígeno HLA (GRUPA et al., 2018), vitamina D (LAPLANA; ROYO; FIBLA, 2018), tipo sanguíneo (MURUGANANTHAN et al., 2018), polimorfismo da IL-10 (SANTOS et al. 2017), fatores virais (RICCO-HESSE et al., 1997), tempestade de citocinas (SRIKIATKHACHORN; MATHEW; ROTHMAN, 2017), ADE (HALSTEAD et al., 1967) e fenômeno de autoimunidade (LARDO et al., 2018). Nossos resultados sugerem a participação de anticorpos IgM e IgG em mecanismos envolvidos nos fenômenos ADE e de autoimunidade e sinalizam para um modelo de imunopatogênese conforme proposto na Figura 3.

Linfócitos B DENV-específicos, *naive* e de memória, e linfócitos B não DENV-específicos, por ativação de células *bystander*, produzem anticorpos em resposta ao DENV. Em conjunto, esses linfócitos B se diferenciam em plasmócitos de vida longa e curta. Os plasmócitos de vida longa são então diferenciados de linfócitos B, após interação com linfócitos T *helper* folicular, e produzem anticorpos neutralizantes ao DENV homotípicos e heterotípicos, responsáveis pela redução da infecção celular pelo vírus (SABCHAREON et al., 2012; CLAPHAM et al., 2016). Por sua vez, anticorpos produzidos por plasmócitos de vida curta tendem a produzir anticorpos subneutralizantes envolvidos com a imunopatogênese da dengue (BELTRAMELLO et al., 2010; DEJNIRATTISAI et al., 2010). Esses anticorpos são originados da ativação de linfócitos B sorotipos específicos e heterotípicos, produzidos em infecções anteriores por outros sorotipos do DENV, ou de reatividade cruzada, produzidos em resposta a outros flavivírus (PRIYAMVADA et al., 2016; PRIYAMVADA et al., 2017). Células *bystander* podem também contribuir para a produção de anticorpos envolvidos na patogênese da doença e, conseqüentemente, no seu agravamento. Assim, os imunocomplexos formados pela ligação dos anticorpos às partículas virais podem ativar o sistema complemento, com a produção de anafilatoxinas e de substâncias quimiotáticas (SHRESTA, 2012, NASCIMENTO et al., 2014), e anticorpos anti-NS1 e anti-PrM poderiam promover a destruição direta das células endoteliais, contribuindo para o fenômeno vascular característico da dengue (LARDO et al., 2018). Estes

imunocomplexos poderiam também, via Fc γ R, promover a infecção viral devido ao aumento da internalização e multiplicação do vírus em células permissivas (fenômeno ADE) (HALSTEAD et al., 1967) e produção de IL-10 (UBOL; HALSTEAD, 2010). Por sua vez, o aumento de IL-10 pode favorecer a troca de isótipos de imunoglobulinas para IgG1 e IgG3 (MALISAN et al., 1996). Em nosso estudo observou-se um aumento de IgG-DENV específica em pacientes com FHD. Nossos resultados também demonstraram um aumento de IgG1 e IgG3 nas formas mais graves da doença. Estes resultados reforçam uma possível participação destas subclasses no modelo de imunopatogênese proposto.

Anticorpos anti-DENV também tem sido implicados em fenômenos de autoimunidade. Estes anticorpos, por mimetismo molecular, ao reconhecerem sequências comuns entre o DENV e a célula do hospedeiro, podem promover a destruição de plaquetas e leucócitos, caracterizando o fenômeno de autoimunidade, que podem contribuir para o desenvolvimento das formas clínicas mais graves da dengue (LIN et al., 2001; LIN et al., 2003; LIN et al., 2011; CHUANG et al., 2016). Nossos resultados demonstraram um aumento de IgG e IgM antígeno específicas quando da diminuição de plaquetas e leucócitos em pacientes com as diferentes formas clínicas da dengue, sugerindo que os anticorpos podem estar envolvidos em fenômeno de autoimunidade contra estes componentes celulares pelo mecanismo de mimetismo molecular.

O entendimento dos mecanismos da imunopatogênese da dengue se faz necessário para a compreensão do fenômeno de agravamento da doença a fim de uma possível definição precoce do prognóstico do paciente. Além disso, estratégias que ajudem a impedir a evolução do paciente para quadros mais graves da doença são necessárias. Até o momento, não existe uma terapia antiviral específica para a dengue disponível. O tratamento de pacientes com a doença restringe-se ao alívio dos sintomas e cuidados de suporte (KAPTEIN; NEYTS, 2016; LOW et al., 2017). O desenvolvimento de terapias específicas na fase crítica da doença aguda poderia ser útil. Uma opção de tratamento seria a utilização de anticorpos monoclonais humanizados com especificidade para a partícula viral. Os anticorpos produzidos por nossos hibridomas apresentam este potencial.

Em termos gerais, em terapias com anticorpos, o objetivo é eliminar ou neutralizar o patógeno ou a célula-alvo. Para isso, os anticorpos monoclonais atuam através de vários mecanismos. Na neutralização, a ligação direta e efetiva do anticorpo pode bloquear a atividade do patógeno. A neutralização também pode ocorrer através da ligação do anticorpo ao receptor que o patógeno se ligaria na superfície da célula alvo (AIRES DA SILVA et al., 2008). Em outros casos, o tratamento efetivo requer uma resposta imune mais complexa e o anticorpo também atuaria exercendo suas funções efectoras próprias (AIRES DA SILVA et al., 2008). Como por exemplo pode ocorrer a opsonização do antígeno, ação na qual o anticorpo se liga ao patógeno e o torna mais suscetível a fagocitose (CHARTRAIN; CHU, 2008). Os anticorpos monoclonais produzidos neste estudo apresentaram potencial para uso em ensaios imunoenzimáticos, como anticorpo de captura ou como conjugado, também podendo ser empregado em técnicas para determinação do diagnóstico da dengue e do prognóstico do paciente.

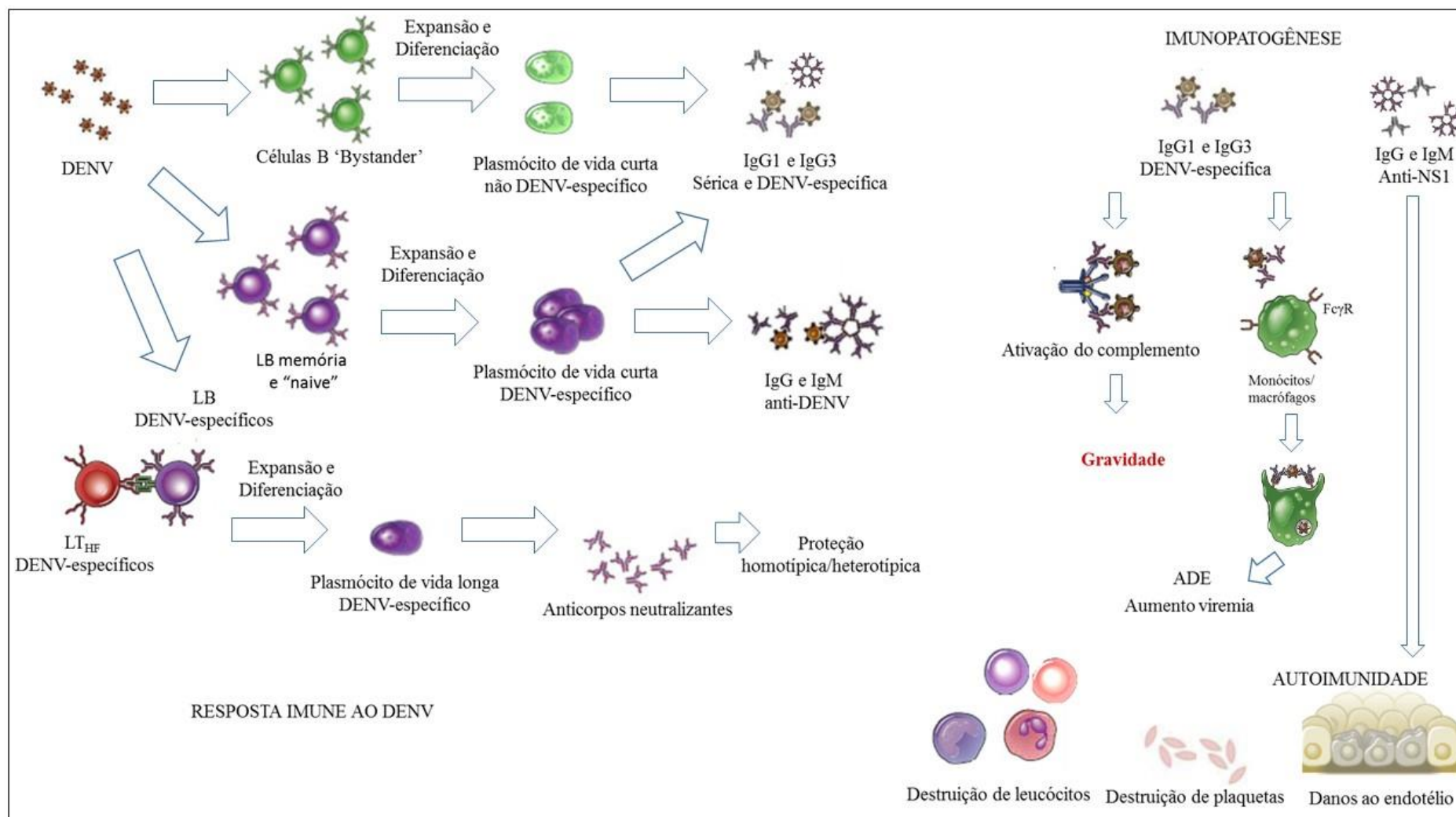


Figura 3: Participação de anticorpos anti-DENV na imunopatogênese da dengue.

6. CONCLUSÕES

Os resultados de nossas pesquisas apontam para o possível envolvimento de anticorpos em diferentes mecanismos na imunopatogênese da dengue e sugerem o acompanhamento da cinética destes anticorpos para sinalização de um prognóstico menos favorável da doença. A dosagem de IgG DENV-específica, um dos biomarcadores de gravidade apontados neste estudo, requer na técnica padronizada a utilização de anticorpos anti-flavivírus na fase sólida do ensaio imunoenzimático. Os anticorpos anti-flavivírus produzidos neste estudo demonstraram potencial de serem empregados futuramente para este fim ou em uma perspectiva de terapia humana.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Tolerância Imunológica e Autoimunidade. In: *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro-RJ: **ELSEVIER**, p. 319-344, 2012.

ABUBAKAR, S. et al. Antigenic cell associated dengue 2 virus proteins detected in vitro using dengue fever patients sera. **The Malaysian Journal of Pathology**, n. 24, p. 29–36, 2002.

ABUBAKAR, S. et al. Antibody responses of dengue fever patients to dengue 2 (New Guinea C strain) viral proteins. **The Malaysian Journal of Pathology**, n. 19, p. 41–51, 1997.

AIRES, S. F.; CORTE-REAL, S.; GONCALVES, J. Recombinant antibodies as therapeutic agents: pathways for modeling new biodrugs. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy**, v. 22, n. 5, p. 301-314, 2008.

ALAGARASU, K. et al. Association of FCGR2A p. R131H and CCL2 c.-2518 A>G gene variants with thrombocytopenia in patients with dengue vírus infection. **Human Immunology**, v. 76, n. 11, p. 819-822, 2015.

ALCON-LEPODER, S. et al. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. **Journal of virology**, v. 79, n. 17, p. 11403–11, 2005.

ALVAREZ, M. et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 6, p. 1113–7, 2006.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em: <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Hybridomas%20by%20Antigenic%20Determinant.ashx> >. Acesso em 18 setembro 2018.

ANDERSON, K. B. et al. A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 3, p. 360–8, 2013

ARGOLO, A. F. L. T. et. al. High frequency of a pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Centrak Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 546-553, 2016.

AUCAN, C. et al. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria. **Infection and immunity**, v. 68, n. 3, p. 1252–8, 2000

AUGENER, W. et al. The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with Cl. **Immunochemistry**, v. 8, p. 1011-18, 1971.

AVIRUTNAN, P. et al. Binding of flavivirus non-structural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 424-433, 2011.

AVIRUTNAN, P. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 793-806, 2010.

AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078–88, 2006.

AVIRUTNAN, P. et al. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 6338 -46, 1998.

AZEREDO, E. L. et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. **Plos Currents**, v. 10, pii: ecurrents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5, 2018.

AZEREDO, E. L. et al. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 143, p. 345–356, 2006.

AZEREDO, E. L. et. al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*, n. 204, p. 494–07, 2001.

BANCROFT, T. L. On the etiology of dengue fever. **Australian Medical Gazette**, v. 25, p. 17-8, 1906.

BANCROFT, G. J. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. **Current Opinion in Immunology**, n. 5, p. 503–10, 1993.

BELTRAMELLO, M. et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 3, p. 271–83, 2010.

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

BOURNAZOS, S.; RAVETCH, J. V. Diversification of IgG effector functions. **International Immunology**, v. 29, n. 7, p. 303-310, 2017.

BOZZA, F. A. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infectious Disease**, n. 8, p. 86, 2008.

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, e1760, 2012.

BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, n. 31, 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE: Dengue. Diagnóstico e manejo clínico-adulto e criança. **Brasília**, 3ª ed., p. 1-29, 2005.

BRIEN, J. D. et al. Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against dengue virus type 3. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10630-10643, 2010.

BRÜGGEMANN, M. et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, v. 66, n. 5, p. 1351-1366, 1987

BUCHY, F. et al. Laboratory tests for the diagnosis of dengue virus infection. Geneva, **TDR/Scientific Working Group**, TDR/SWG/08, 2006.

BUDDHARI, D. et al. Dengue virus neutralizing antibody levels associated with protection from infection in Thai cluster studies. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 17, e3230, 2014.

BURTON, D. R.; SAPHIRE, E. O.; PARREN, P. W. A model for neutralization of viruses based on antibody coating of the virion surface. *Current Topics of Microbiology and Immunology*, v. 260, p. 109-143, 2001.

BUTTHEP, P. et al. Elevated soluble thrombomodulin in the febrile stage related to patients at risk for dengue shock syndrome. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, n. 25, p. 894–97, 2006.

CAPEDING, M. R. et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1358-1365, 2014.

CARDIER, J. E. et al. Relationship of thrombopoietin and interleukin-11 levels to thrombocytopenia associated with dengue disease. **Cytokine**, n. 34, p. 155–60, 2006a.

CARDIER, J. E. et al. Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells. **Endothelium**, n. 13, p. 335–40, 2006b.

CARDOSA, M. J. et al. Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. **BMC microbiology**, v. 2, p. 9, 2002.

CARR, J. M. et al. Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. **Journal of Medical Virology**, v. 69, p. 521-28, 2003.

CASTAÑEDA, J. R. et al. Dengue in Latin America: Systematic review of molecular epidemiological trends. **Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1-24, 2017.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever. Available at: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/dengue-fever-and-dengue-hemorrhagic-fever.htm>. Accessed June 13, 2012.

CHANDELE, A. et al. Characterization of Human CD8 T cell Responses in Dengue virus-infected patients from India. **Journal of Virology**, v. 90, n. 24, p. 11259-11278, 2016.

CHAKRAVARTI, A.; KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. **Indian Journal of Medical Research**, n. 123, p. 25–30, 2006.

CHARTRAIN, M.; CHU, L. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 447-467, 2008.

CHAU, T. N. B. et al. Dengue virus infections and maternal antibody decay in a prospective birth cohort study of Vietnamese infants. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 12, p. 1893–900, 2009.

CHEN, H. R. et al. Dengue virus nonstructural protein 1 induces vascular leakage through macrophage migration inhibitory factor and autophagy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1-19, 2016.

CHEN, L. C. et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 74, p. 142–47, 2006.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature medicine**, v. 3, n. 8, p. 866–71, 1997.

CHENG, H. J. et al. Correlation between serum levels of anti-endothelial cell autoantigen and anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies in dengue patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 5, p. 989-995, 2015.

CHENG, H. J. et al. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n.1, p. 63-73, 2009.

CHUANG, Y. C. et al. Dengue virus nonstructural protein-1 induced antibodies cross-react with human plasminogen and enhance its activation. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 3, p. 1218-1226, 2016.

CHUNGE, E. et al. Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 5, p. 1304-1307, 1994.

CHURDBOONCHAERT, V. et al. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 44, p. 481–493, 1991.

CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVATI, N.; FUTRAKUL, P. Crossed immunoelectrophoresis for the detection of split products of the third complement in dengue hemorrhagic fever. I. Observations in patients' plasma. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 569–76, 1983.

CLAPHAM, H. E., et al. Modelling Virus and Antibody Dynamics during Dengue Virus Infection Suggests a Role for Antibody in Virus Clearance. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 5, e100495, 2016.

CLAPHAM, H. E. et al. Dengue Virus (DENV) Neutralizing Antibody Kinetics in Children after Symptomatic Primary and Postprimary DENV Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 9, p. 1428-1435, 2016.

CONSTENLA, D.; CLARK, S. Financing dengue vaccine introduction in the Americas: challenges and opportunities. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 4, p. 547–559, 2016.

CORBETT, K. et al. Preexisting neutralizing antibody responses distinguish clinically inapparent and apparent dengue virus infections in a Sri Lankan pediatric cohort. **Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 590-599, 2015.

COUDEVILLE, L. et al. Potential impact of dengue vaccination: Insights from two large-scale phase III trials with a tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 34, n. 50, p. 6426-6435, 2016

DAËRON, M. Structural bases of FcγR functions. **International Reviews of Immunology**, v. 16, p. 1-27, 1997.

DE ALWIS, R. et al. Immunodominant Dengue Virus-Specific CD8⁺ T cell Responses are associated with memory PD-1⁺ phenotype. *Journal of Virology*, v. 90, n. 9, p. 4771-4779, 2016.

DE ALWIS, R. et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 5, n. 6, e1188, 2011.

DE ALWIS, R. et al. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 19, p. 7439–44, 2012.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5979, p. 745–8, 2010.

DELVES, P. J., ROITT, I. M. The immune system. Second of two parts. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 108–17, 2000.

DOBBIN-SEARS, I. et al. Ustekinumab in psoriatic arthritis and related phenotypes. **Therapeutic Advances in Chronic Diseases**, v. 9, n. 10, p. 191-198, 2018.

DUNNE, J. et al. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 3129–38, 2001.

ENDY, T. P. et. al. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 990-1000, 2004.

FALCONAR, A. K. I. Monoclonal antibodies that bind to common epitopes on the dengue virus type 2 nonstructural-1 and envelope glycoproteins display weak neutralizing activity and differentiated responses to virulent strains: implications for pathogenesis and vaccines. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 15, n. 3, p. 549–61, 2008.

FALCONAR, A. K. Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. **Archives of virology**, v. 144, n. 12, p. 2313–30, 1999.

FALCONAR, A. K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Archives of virology**, v. 142, n. 5, p. 897–916, 1997.

FASEKAS DE STGROTH, S.; SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. **Journal of Immunological Methods**, v. 35, n. 1, p. 1-21, 1980.

FEINSTEIN, A.; RICHARDSON, N.; TAUSSIG, M. J. Immunoglobulin flexibility in complement activation. **Immunology Today**, v. 7, p. 169-74, 1986.

FERGUSON, N. M. et al. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. **Science**, v. 353, n. 6303, p. 1033-1036, 2016.

FERLAZZO, G. et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, n. 101, p. 16606–11, 2004.

FIBRIANSAH, G. et al. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 3, p. 358-371, 2014.

FIBRIANSAH, G. et al. Structural changes in dengue virus when exposed to a temperature of 37°C. **Jornal of Virology**, v. 87, n. 13, p. 7585-7592, 2013.

FLASCHE, S. et al. The Long-Term Safety, Public Health Impact, and Cost-Effectiveness of Routine Vaccination with a Recombinant, Live-Attenuated Dengue Vaccine (Dengvaxia): A Model Comparison Study. **Plos Medicine**, v. 13, n. 11, e1002181, 2016.

FORSHEY, B. M. et. al. Imcomplete protection against dengue virus type 2 re-infection in Peru. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, e0004398, 2016.

GAILHARDOU, S. et al. Safety Overview of a Recombinant Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine: Pooled Analysis of Data from 18 Clinical Trials. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, e0004821, 2016.

GARCIA-BATES, T. M. et al. Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients. **Journal of Immunology**, n. 1, v. 190, p. 80-7, 2013.

GARCÍA G. et al. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue- infected persons and its association with immunological disorders. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 38-3, 2010.

GIBBONS, R. V et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 5, p. 910–3, 2007.

GODÓI, I. P. et al. CYD-TDV dengue vaccine: systematic review and meta-analysis of efficacy, immunogenicity and safety. **Journal Comparative Effectiveness research**, v. 6, n. 2, p. 910-913, 2017.

GOLDANI, L. Z. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 123-124, 2017.

GOMES, I. C. G. G. et al. Molecular and clinical epidemiological surveillance of dengue virus in Paraíba, Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 19-26, 2017.

GREEN, S. et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Disease**, v. 180, p. 1429–1435, 1999.

GRINGHUIS, S. I. et al. Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. **Nature Communications**, v. 5, n. 5074, 10.1038/ncomms6074, 2014.

GRUPTA, S. et al. Genome-Wide Analysis to Identify HLA Factors Potentially Associated with Severe Dengue. **Frontiers Immunology**, v.9, n. 728, fimmu.2018.00728, 2018.

GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. **Annual Review of Immunology**, n. 19, p. 65–91, 2001.

GUILARDE, A. O. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 6, p. 817-824, 2008.

GUZMÁN, M. G.; ROSARIO, D.; KOURI, G. In: KALITZKY, M.; BOROWSKI, P. eds. Diagnosis of dengue virus infection. Molecular Biology of the flaviviruses. **Horizon Bioscience**, UK, 2009.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 69–80, 2004.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G.; HALSTEAD, S. B. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? **Lancet**, v. 355, n. 9218, p. 1902–3, 2000a.

GUZMÁN, M. G. et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. **American journal of epidemiology**, v. 152, n. 9, p. 793–9; discussion 804, 2000b.

GUZMÁN, M. G. et al. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 42, n. 2, p. 179–84, 1990.

GUY, B. et al. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Vaccine** 2011; v. 29, n. 42, p. 7229–724, 2011.

HADINEGORO, S. R. et al. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 13, p. 1195–206, 2015.

HASTEAD, S. B. Dengue. In: tropical medicine science and practice. Korea: International Vaccine: Imperial College Press, p. 469-471, 2008.

HALSTEAD, S. B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 20, n. 6, p. 407–15, 2006.

HALSTEAD, S. B. Global epidemiology of dengue: health systems in disarray. **Tropical Medicine**, v. 35, p. 137-46, 1993.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 42, n. 5, p. 350–62, 1970.

HALSTEAD, S. B. et al. Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. **Japanese journal of medical science and biology**, v. 20 Suppl, n. 23, p. 96–103, 1967.

HATCH, S. et al. Intracellular cytokine production by dengue virus specific T cells correlates with subclinical secondary infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, p. 1282-91, 2011.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Advances in virus research**, v. 59, n. 5, p. 63–97, 2003.

HO, L. J. et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 1499–506, 2001

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2003.

HOUGHTON-TRIVIÑO N; MONTAÑA D; CASTELLANOS J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. **Revista de Salud Publica**, v. 10, n. 2, p. 299-307, 2008.

HUANG, K. J. et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 5, p. 2825–32, 2006.

HUANG, Y. K. et al. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 63, n. 3, p. 247-251, 2001

HUANG, K. et al. Flow Cytometric Determination for Dengue Virus-Infected Cells : Its Application for Antibody-Dependent Enhancement, **Dengue Bulletin**, v. 29, 2005.

HUSSAIN, R.; KIFAYET, A.; CHIANG, T. J. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 410-415, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp> >. Acesso em 9 set. 2018.

JACOBS, M. G. et al. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 11, p. 1603-1610, 2000.

MALISAN, F. et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 3, p. 937-947, 1996.

MANGADA, M. M. et al. Dengue specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. **Journal of Infectious Disease**, v. 185, p. 1697–03, 2002..

MARTELLI, C. M. T. et al. Impact of Dengue: Multicenter Study across four Brazilian Regions. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, e0004042, 2015.

MARTINA, B. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical Microbiology Review**, v. 22, p. 564-81, 2009

MARTÍNEZ, J.; HERNÁNDEZ, J. C.; URCUQUI-INCHIMA, S. Role of dendritic cells in infection by dengue virus: targets for replication and immune response. **Revista Chilena de Infectología: órgano oficial de la Sociedad chilena de Infectología**, v. 34, n. 3, p. 249-256, 2017.

MASRINOUL, P. et al. Serotype-specific anti-Dengue virus NS1 mouse antibodies cross-react with prM and are potentially involved in virus production. **Viral immunology**, v. 26, n. 4, p. 250–8, 2013.

MATHEW, A. Defining the role of NK cells during dengue virus infection. **Immunology**, doi: 10.1111/imm.12928, 2018.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 225, p. 300-13, 2008.

MCARTHUR, M. A.; SZTEIN, M. B.; EDELMAN, R. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 8, p. 933-953, 2013.

MEHLHOP, E. et al. Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. **Cell host & microbe**, v. 2, n. 6, p. 417–26, 2007.

LINDENBACH, B. D. et al. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. **Journal of Virology**, n. 17, v. 81, p. 8905-18, 2007.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23–61, 2003.

LIU, I. J. et al. Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9726–36, 2011.

LORENZ, I. C. et al. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **Journal of virology**, v. 76, n. 11, p. 5480–91, 2002.

LOW, J. G.; OOI, E. E.; VASUDEVAN, S. G. Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. **Journal of Infectious** v. 215, S96-S102, 2017.

LUO, Y.-Y. et al. Identification of a novel infection-enhancing epitope on dengue prM using a dengue cross-reacting monoclonal antibody. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 194, 2013.

MACKENZIE, J. M.; WESTAWAY, E. G. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of virology**, v. 75, n. 22, p. 10787–99, 2001.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; Young, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, n. 307, p. 232-240, 1996.

MAIRUHU, A. T. et al. Increased PAI-1 plasma levels and risk of death from dengue: no association with the 4G/5G promoter polymorphism. **Thrombosis Journal**, n. 3, p. 17, 2005.

MALASIT, P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, n. 3, v. 18, p. 316-20, 1987.

LATIPAT. ESPACENET: PESQUISA DE PATENTES DA ESPANHA E AMÉRICA LATINA. Disponível em: <http://sistema.bibliotecas-bdigital.fgv.br/bases/latipat-espacenet-pesquisa-de-patentes-da-espanha-e-america-latina> >. Acesso em 9 set. 2018.

LAUR, F. et al. Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 92, p. 654–56, 1998.

LEE, Y. R et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. **Journal of General Virology**, n. 87, p. 3623–30, 2006.

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, 2002.

LIBRATY, D. H. et al. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **Journal of Virology**, n. 75, p. 3501–8, 2001.

LIN, S.W. et al. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. **Journal of Infection**, v. 64, n. 3, p. 325–334, 2012.

LIN, Y. S. et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 236, n. 5, p. 515–23, 2011.

LIN, C. F. et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **Journal of Medical Virology**, n. 69, p. 82–90, 2003.

LIN, C. F. et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. **Journal of Medical Virology**, v. 63, n. 2, p. 143–149, 2001

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, 2001.

KOU, Z. et al. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of medical virology**, v. 80, n. 1, p. 134–46, 2008.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 2, p. 135-142, 2002.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, v. 11, n. 5, p. 301-311, 2001.

KURANE, I. et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon gamma in sera of children with dengue. **Journal of Clinical Investigation**, n. 88, p. 1472–1480, 1991.

LAI, C.-Y. et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **Journal of virology**, v. 82, n. 13, p. 6631–43, 2008.

LAPLANA, M.; ROYO, L. L.; FIBLA, J. Vitamin D Receptor Polymorphisms and risk of enveloped virus infection: A meta-analysis. **Gene**, v. 678, p. 384-394, 2018.

LAZARO-OLAN, L. et al. Analysis of antibody response in human dengue patients from the Mexican coast using recombinant antigens. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, n. 8, p. 69–79, 2008.

LARDO, S. et al. The Autoimmune Mechanism in Dengue Hemorrhagic Fever. **Acta Medica Indonesiana.**, v. 50, n. 1, p. 70-79, 2018.

JARDIM, D. L. et al. Autoimmune features caused by dengue fever: a case report. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 92-5, 2012.

JEFFERIS, R.; KUMARARATNE, D. S. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. **Clinical and experimental immunology**, v. 81, n. 3, p. 357–67, 1990.

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**, n. 65, p. 70–5, 2001.

KALAYANAROOJ, S. et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 313–21, 1997.

KAPTEIN, S. J.; NEYTS, J. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. **Current Opinion Pharmacology**, v. 30, p. 1-7, 2016.

KATZELNICK, L. C. et al. Neutralizing antibody titers against dengue virus correlate with protection from symptomatic infection in a longitudinal cohort. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 3, p. 728-733, 2016

KATZELNICK, L. C. et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. **Science**, v. 34, n. 6254, p. 1338-1343, 2015.

KIM, S. H. et al. Development of a monoclonal antibody specific to envelope domain III with broad-spectrum detection of all four dengue virus serotypes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 4, p. 894-898, 2016

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KORAKA, P. et al. Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity. **Journal of Medical Virology**, n. 72, p. 445–50, 2004.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue virus type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, n. 2, p. 479-493, 1990.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-977, 1998.

RIVINO, L. et al. Differential targeting of viral components by CD4⁺ versus CD8⁺ T lymphocytes in dengue virus infection. **Journal of Virology**, v. 87, n. 5, p. 2693-2706, 2013.

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

ROCHA, B. A. M. et al. Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 116, 2017.

RODRIGUES N. C. et al. Temporal and Spatial Evolution of Dengue Incidence in Brazil, 2001-2012. **Plos One**, v. 11, n. 11, e0165945, 2016.

RODRIGUEZ-BARRAQUER I. et al. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 935e, 2011.

RODRÍGUEZ-ROCHE, R. et al. [Biological properties of virus dengue-3 strains isolated during the epidemic occurred in Havana, 2001-2002]. **Revista cubana de medicina tropical**, v. 64, n. 2, p. 187-98, 2012.

ROEHRIG, J. T. Antigenic structure of flavivirus proteins. **Advances in virus research**, v. 59, p. 141-75, 2003.

SABCHAREON, A. et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1559-1567, 2012.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1, n. 1, p. 30-50, 1952.

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, 2016.

PUSCHNIK, A. et al. Correlation between dengue-specific neutralizing antibodies and serum avidity in primary and secondary dengue virus 3 natural infections in humans. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 6, e2274, 2013.

RAGHUPATHY, R. et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. **Journal of medical virology**, v. 56, n. 3, p. 280–5, 1998.

RAJADHYAKSHA, A.; MEHRA, S. Dengue fever evolving into systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a case report. **Lupus**, v. 21, p. 999-02, 2012.

RAVETCH, J. V.; KINET, J. P. Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 457-92, 1991.

RAVETCH, J. V.; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 275-90, 2001.

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

REY, F. A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, v. 375, n. 6529, p. 291–8, 1995.

RICO-HESSE, R. Dengue virus evolution and virulence models. **Clinical Infection Disease**, v. 44, n. 11, p. 1462-1466, 2007.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 315-341, 2003.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244–51, 1997.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Description of the current epidemiological trends of dengue in the Americas. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494:2010-descripcion-situacion-epidemiologica-actual-dengue-americas&Itemid=0&lang=en. Acesso em 13 de outubro de 2018.

PARANAVITANE, S. A. et al. Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 570, 2014.

PEREZ, A. B. et al. IL-10 levels in dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. **Journal of Medical Virology**, n. 73, p. 230–34, 2004

PERIAGO, M. R.; GUZMÁN, M. G. [Dengue and hemorrhagic dengue in the Americas]. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 21, n. 4, p. 187–91, 2007.

PESSANHA, J. E. et al. Dengue fever in three sanitary districts in the city of Belo Horizonte, Brazil: a population-based seroepidemiological survey, 2006 to 2007. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 27, p. 25 2- 58, 2010.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 10, n. C, p. e12, 2008.

POSADAS-MONDRAGÓN, A. et al. Indices of anti-dengue immunoglobulin G subclasses in adult Mexican patients with febrile and hemorrhagic dengue in the acute phase. **Microbiology and Immunology**, v. 61, n.10, p. 433-441, 2017.

PREMARATNA R. et al. Should colloid boluses be prioritized over crystalloid boluses for the management of dengue shock syndrome in the presence of ascites and pleural effusions. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, p. 52, 2011.

PRIYAMVADA, L. et al. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 5, e33, 2017.

NASCIMENTO E. J. M. et al. Development of antibody biomarkers of long term and recent dengue virus infections. **Journal of Virology Methods**, v. 257, p. 62-68, 2018.

NASCIMENTO, E. J. et. al. Emerging concepts in dengue pathogenesis: interplay between plasmablasts, platelets, and complement in triggering vasculopathy. **Critical Reviews in Immunology**, v. 34, n. 3, 227-240, 2014.

NASCIMENTO, E. J., et al. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. **Plos One**, v. 4, n. 8, e6782, 2009.

NGUYEN, T. H. et. al. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. **Journal of Infectious Disease**, n. 189, p. 221–32, 2004.

NIMMANNITYA, S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 18, p. 392–97, 1987.

NISALAK, A. et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973-1999. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 2, p. 191-202, 2003.

NISHIOKA, K. Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 21, p. 385–92, 1974.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiology and infection**, v. 111, n. 1, p. 163–70, 1993.

OLIVERA-BOTELLO, G. et al. Tetravalent Dengue Vaccine Reduces Symptomatic and Asymptomatic Dengue Virus Infections in Healthy Children and Adolescents Aged 2-16 Years in Asia and Latin America. **Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 994-1000, 2016.

OOI, E.-E.; GUBLER, D. J. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. **Cadernos de saúde pública**, v. 25 Suppl 1, n. 12, p. S115–24, 2009.

MERRETT, J.; BURR, M. L.; MERRETT, T. G. A community survey of IgG4 antibody levels. **Clinical allergy**, v. 13, n. 5, p. 397–407, 1983.

MESSER, W. B. et al. Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 5, p. 1939–1944, 2014

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, 2011.

MINGARI, M. C. et al. Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)- like activity. expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR mediated target cell lysis or lymphokine production. **International Immunology**, n. 7, p. 697–703, 1995.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates cell via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 1-2, 2015.

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, 2005.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, v. 98, n. 2, p. 192-208, 2013.

MURUGANANTHAN, K. et al. Blood group AB is associates with severe forms of dengue virus infection. **Virus Disease**, n.1, p. 103-105, 2018.

MUSTAFA, A. S. et al. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n. 30, p. 229–233, 2001.

NAKAYAMA, E. et al. Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 204 Suppl , n. Suppl 3, p. S978–85, 2011.

SAN MARTÍN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128–35, 2010.

SANTOS, A. C. et al. Meta-Analysis of the relationship between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) gene polymorphisms and susceptibility to Dengue. **Immunological Investigations**, v. 46, n. 2, p. 201-220, 2017.

SAOKAEW, N. et al. Human monoclonal single-chain antibodies specific to dengue virus envelope protein. **Letters in Applied Microbiology**, n. 3, p. 270-277, 2014.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245–6, 1986.

SEHRAWAT, P. et al. Role of Cytokines as Molecular Marker of Dengue Severity. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, e2018023, 2018.

SE-THOE, S. Y.; NG, M. M.; LING, A. E. Retrospective study of Western blot profiles in immune sera of natural dengue virus infections. **Journal of medical virology**, v. 57, n. 3, p. 322–30, 1999.

SHAIO, M. F.; CHANG, F. Y.; HOU, S. C. Complement pathway activity in serum from patients with classical dengue fever. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 672–75, 1992.

SHIM, E. Cost-Effectiveness of Dengue Vaccination Programs in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1227-1234, 2017.

SHRESTA, S. Role of complement in dengue virus infection: protection or pathogenesis? **mBio**, v. 3, n. 1, e00003-12, 2012.

SHU, P. Y. et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 4, p. 622-630, 2003.

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, 2005.

SIMMONS, J. S.; JOHN, J. H.; REYNOLDS, F. H. K. Possible transfer of dengue virus from infected to normal mosquitoes during copulation. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 11, p. 199-216, 1931.

SIQUEIRA-JÚNIOR, J. B. et. al. Spatial point analysis based on dengue surveys at household level in Brazil. **BMC Public Health**, v. 361, n. 8, p. 1-9, 2008.

SOO, K. M. et al. Metanalysis of biomarkers for severe dengue infections. **PeerJ**, v. 5, e3589, 2017.

SOSOTHIKUL, D. et. al. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with dengue virus infection. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, n. 97, p.627–34, 2007.

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

SRIKIATKHACHORN, A. et. al. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **Journal of Virology**, n. 81, p. 1592–600, 2007.

SPROKHOLT, J. K. et al. RIG-I-like receptor activation by dengue virus drives follicular T helper cell formation and antibody production. *Plos Pathology*, v. 13, n. 11, e1006738, 2017.

STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bulletin of World Health Organization*, v. 83, p. 308–14, 2005.

STIASNY, K. et al. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. **Amino acids**, v. 41, n. 5, p. 1159–63, 2011.

STIASNY, K. et al. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. **Journal of Virology**, v. 80, n. 19, p. 9557-9568, 2006.

STOLLAR, V. Studies on the nature of dengue viruses. IV. The structural proteins of type 2 dengue virus. **Virology**, v. 39, n. 3, p. 426–38, 1969.

STOLLAR, V.; STEVENS, T. M.; SCHLESINGER, R. W. Studies on the nature of dengue viruses. II. Characterization of viral RNA and effects of inhibitors of RNA synthesis. **Virology**, v. 30, n. 2, p. 303–12, 1966

SUHARTI, C. et. al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, n. 87, p. 42–6, 2002.

SUN, D. S. et al. Endothelial cell sensitization by death receptor fractions of an anti-dengue nonstructural protein 1 antibody induced plasma leakage, coagulopathy and mortality in mice. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 6, p. 2743-2753, 2015.

TAO, M. H.; SMITH, R. I.; MORRISON, S. L. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 2, p. 661-667, 1993

TEOH, E. P. et al. The structural basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 139, 139-183, 2012.

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. 102–106, 1993.

THIE, H. et al. Phage display derived therapeutic antibodies. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 43-446, 2008.

TIAN, T.; YE, J.; ZHOU, S. Effect of pertuzumab, trastuzumab and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer: A meta-analysis. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 55, n. 9, p. 720-727, 2017.

TIRADO, S. M. C.; YOON, K.-J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. **Viral immunology**, v. 16, n. 1, p. 69–86, 2003

TSAI, T. F.; HALSTEAD, S. B. Tropical viral infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 547–53, 1998.

UBOL, S.; HALSTEAD, S. B. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, n. 12, v. 17, p. 1829-35, 2010.

VALDÉS, K. et al. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 5, p. 856–7, 2000.

VANBLARGAN, L. A.; GOO, L.; PIERSON, T. C. Deconstructing the Antiviral Neutralizing Antibody Response: Implications for Vaccine Development and Immunity. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 84, n. 4, p. 989-1010, 2016.

VAN DER GIESSEN, M. et al. Quantification of IgG subclasses in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age. **Clinical and experimental immunology**, v. 21, n. 3, p. 501–9, 1975.

VASCONCELOS, P. F. et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 253–5, 1995.

VAZQUEZ, S. et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue three virus infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 256–62, 2007.

VEZZA, A. C. et al. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 29, n. 4, p. 643–652, 1980.

VILLAR, L. et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p. 113–23, 2015.52, 2015.

VLAYCHEVA, L. A.; CHAMBERS, T. J. Neuroblastoma cell-adapted yellow fever 17D virus: characterization of a viral variant associated with persistent infection and decreased virus spread. **Journal of Virology**, v. 76, n. 12, p. 6172–6184, 2002

ZHANG, X. et al. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110 n. 17, p. 6795-6799, 2013.

ZOMPI, S. M. et al. Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1568, 2012.

WAN, S. W. et al. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies contribute to platelet phagocytosis by macrophages. **Thrombosis Haemostasis**, v. 115, n. 3, p. 646-656, 2016.

WANG T. T. et al. IgG antibodies to dengue enhanced for FcγRIIIA binding determine disease severity. **Science**, v. 355, n. 6323, p. 395-398, 2017

WICHMANN, O. et al. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. **Tropical Medicine and International Health: TM & IH**, v. 9, n. 9, p. 1022-1029, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Weekly epidemiological record. Geneva, v. 91, n. 21, p. 265-284, 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Global strategy for dengue prevention and control, 2012-2020. Geneva, 1^a ed., p. 1-43. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control, new ed. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Geneva, WHO/IBV/07.07, p. 1-21, 2007.

Anexo 2 – Comprovante de submissão do artigo

19/10/2018

Yahoo Mail - Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-18-00763 - [EMID:de9253072b4fa701]

Assunto: Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-18-00763 - [EMID:de9253072b4fa701]

De: JMM (em@editorialmanager.com)

Para: isabelacinquini@yahoo.com.br

Data: sexta-feira, 19 de outubro de 2018 17:23 BRT

CC: "Lucimeire Silveira" lucinelliufg@hotmail.com.br, "Valeria Christina Feres" vcrisrezende@gmail.com, "Adriana Guilarde" adrianaguilarde@gmail.com, "Benigno Alberto Moraes da Rocha" benigno.rocha@gmail.com, "João Victor Carvalho" batalha.biotech@gmail.com, "Silvio Ricon-Filho" silvioriconf@gmail.com, "Celina Maria Martelli" turchim@gmail.com

Ms. No. JMM-D-18-00763

ASSOCIATION OF ANTI-DENV IgG ANTIBODIES WITH DENGUE SEVERITY

Isabela Junqueira, M.D.; Lucimeire Silveira, PhD; Valeria Christina Feres, PhD; Adriana Guilarde, PhD; Benigno Alberto Moraes da Rocha, PhD; João Victor Carvalho, bachelor; Silvio Ricon-Filho, bachelor; Celina Maria Martelli, PhD

Dear Mrs. Junqueira,

Your submission entitled "ASSOCIATION OF ANTI-DENV IgG ANTIBODIES WITH DENGUE SEVERITY" has been received by Journal of Medical Microbiology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://jmm.editorialmanager.com/>.

Your manuscript reference number is JMM-D-18-00763. Please use this in all correspondence relating to this manuscript.

Thank you for submitting your work to Journal of Medical Microbiology.

Yours sincerely,

Journal of Medical Microbiology

IMPORTANT INFORMATION:

Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed Licence to Publish form. In addition, for papers reporting new sequence data, papers will not be published online until the sequence data are released in public databases.

Please make sure you check the details you have entered into the Editorial Manager site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used when your accepted PDF is published online.

In compliance with data protection regulations, please contact the publication office if you would like to have your personal information removed from the database.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética

F. ALEXANDRE SANTOS SETOR LÍQUIDO UNIVERSARIO - CEP: 74.685-050 - FONE: 3269-8138 - FAX: 3269-8126
CUIABÁ - GOIÁS

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Dengue Haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, 2nd ed., p. 1-84, 1997.

WRAMMERT, J. N. et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. **Journal of Virology**, v. 86, n. 6, p. 2911–18, 2012.

YOSHIDA, T. et al. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. **Archives of Virology**, v. 158, p. 1209-20, 2013.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053–7, 2000.

YOUNT, W. J. et al. Studies on human antibodies. IV. Selective variations in subgroup composition and genetic markers. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 127, p. 633, 1968.

YU, I.-M. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5871, p. 1834–7, 2008.