

Alexandre Giannecchini Romagnolo

**INTERAÇÃO DE CÉLULAS NKT E B NA INFECÇÃO POR
ARBOVÍRUS**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde.

São Paulo

2024

Alexandre Giannecchini Romagnolo

**INTERAÇÃO DE CÉLULAS NKT E B NA INFECÇÃO POR
ARBOVÍRUS**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde.

Orientadora: Dra. Karina Inacio Ladislau de
Carvalho

São Paulo

2024

Romagnolo, Alexandre Gianecchini

Interação de células NKT e B na infecção por arbovírus /

Alexandre Gianecchini Romagnolo. -- São Paulo, 2024.

xiv, 73 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde
Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *B and NKT cells interaction in arbovirus
infection.*

1. Dengue. 2. Alergia e imunologia. 3. Células T matadoras
naturais. 4. Células produtoras de anticorpos.

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes Azevedo

Alexandre Giannecchini Romagnolo

**INTERAÇÃO DE CÉLULAS NKT E B NA INFECÇÃO POR
ARBOVÍRUS**

Presidente da banca: Dra. Karina Inacio Ladislau de Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Luciana Cavalheiro Marti

Prof. Dr. Helton da Costa Santiago

Profa. Dra. Érika Bevilaqua Rangel

Membros suplentes:

Dr. Ricardo Weinlich

Dra. Cássia Gisele Terrassani Silveira

Aprovada em: 28/03/2024.

Agradecimentos

Obrigado Deus por sempre proteger pessoas próximas a mim e por ter me dado saúde e iluminação para concluir mais este capítulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.518512/2020-00. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); número do apoio: 476088/2009-7, pelo financiamento da pesquisa.

Agradeço a todos os participantes da pesquisa que em momentos de aflição e doença aceitaram doar um pouco de sangue e tempo para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Ao Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein pelo investimento financeiro e pessoal na pesquisa com arbovírus. Aos funcionários e estudantes envolvidos em todo o processo de atendimento e coleta de pacientes.

Agradeço à toda equipe do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa por todo o apoio necessário para organizar e executar os experimentos. Também agradeço de coração aos colegas da pós-graduação que me apoiaram e me ajudaram com minhas dúvidas e aprendizado. Em especial aos colegas Lucas Pires Garcia Oliveira e Rafaela Xavier Gomes, graças a vocês consegui chegar até aqui.

Agradeço muito à minha namorada Renata Aline Del Nero por sempre estar do meu lado desde quando eu decidi embarcar nesta aventura até o último dia. Graças à sua atenção, carinho, paciência e cuidados comigo pude enfrentar todos os dias sabendo que poderia contar com sua linda risada.

Agradeço profundamente à minha orientadora Dra. Karina Inácio de Carvalho pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela paciência na orientação deste doutorado. Graças aos seus conhecimentos que parecem infinitos aprendi muito e mais importante ainda, quero continuar a aprender mais!

Por fim, mas não menos importante, agradeço principalmente aos meus amigos e à minha família por sempre me apoiar nessa jornada! Principalmente meus pais, Sebastião e Beatriz, e minha irmã Laís. Ainda não criaram palavras para descrever a gratidão por todo apoio e carinho que recebi de vocês nesta jornada.

“You are the height of immune system development. Although, your immune system is not really inside of you. *It is you*. It is an expression of your biology protecting itself and making your life possible. So when we are talking about your immune system, we are talking about *you*.”

Philipp Dettmer

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
Resumo	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	18
2 MÉTODOS	19
2.1 O estudo	19
2.2 Casuística.....	19
2.3 Aspectos éticos	20
2.4 Coleta do material	20
2.4.1 Sangue periférico	20
2.4.2 Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	21
2.4.3 Soro, plasma e <i>buffy coat</i>	22
2.4.4 Descongelamento de PBMC	23
2.5 Marcação de células e citometria de fluxo	23
2.6 Estratégia de análise de <i>gates</i> para grupos celulares	24
2.7 Análise estatística.....	27
3 RESULTADOS	28
3.1 Grupos de estudo e suas características.....	28
3.2 Dados laboratoriais.....	28
3.3 Comparações de linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e células iNKTs entre os grupos.....	32
3.4 Ativação celular pela expressão de CD38	34
3.4.1 Linfócitos T	35
3.4.2 Linfócitos T CD4 ⁺	36
3.4.3 Linfócitos T CD8 ⁺ ativados	37
3.4.4 Ativação das células iNKTs	37
3.4.5 Ativação das subpopulações de células iNKTs	38
3.5 Linfócitos T CD4 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺ não apresentam diferença na expressão de CD27	40
3.6 Análise de linfócitos B.....	41

3.6.1 Linfócitos B (CD3 ⁻ CD19 ⁺)	41
3.6.2 Células B de memória e subpopulações <i>switched</i> e <i>unswitched</i>	42
3.6.3 Células B <i>naïve</i> e subpopulações anérgica e em descanso.....	44
3.6.4 Células B transicionais	45
3.6.5 Há mais plasmoblastos em circulação no Grupo Dengue Aguda em relação ao Grupo Sintomáticos Não Dengue	46
3.7 Correlação das células iNKTs com as células B em circulação dos participantes ..	47
4 DISCUSSÃO	55
5 CONCLUSÕES	64
6 REFERÊNCIAS	65
Abstract	
Apêndices	

Lista de figuras

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica do vírus da dengue (partículas circulares) em um tecido	1
Figura 2. Esquema de estrutura e composição genética do vírus da dengue	3
Figura 3. Ciclo do vírus da dengue	5
Figura 4. Classificação da doença dengue pela Organização Mundial da Saúde de acordo com sintomas	6
Figura 5. Diferentes níveis de vírus, resposta do corpo e anticorpos de acordo com as diferentes fases da dengue	7
Figura 6. Esquema do ciclo de infecção, reprodução e liberação do vírus da dengue em uma célula	8
Figura 7. Resposta inata e adaptativa envolvendo as células T ao vírus da dengue ...	10
Figura 8. Interações entre células iNKTs com outros leucócitos	15
Figura 9. Meios pelos quais as células iNKT pode ativar as células B	16
Figura 10. Fluxo de estratégia de <i>gates</i> CD3 ⁺ para análise de citometria de fluxo.....	25
Figura 11. Fluxo de estratégia de <i>gates</i> CD3 ⁻ para análise de citometria de fluxo	26
Figura 12. Resultados de hemograma entre os grupos de Dengue Aguda e Sintomáticos Não Dengue	30
Figura 13. Porcentagem de linfócitos T e seus respectivos subpopulações.....	33
Figura 14. Análise comparativa de quantidade absoluta de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ entre os grupos Dengue Aguda e Grupo Sintomáticos Não Dengue	34
Figura 15. Positividade de CD38 em linfócitos T CD3 ⁺ entre os grupos Dengue Aguda e Grupo Sintomáticos Não Dengue	35
Figura 16. Positividade de CD38 em linfócitos T CD4 ⁺ dos participantes.....	36
Figura 17. Positividade de CD38 em linfócitos T CD8 ⁺ dos participantes.....	37
Figura 18. Positividade de CD38 em células iNKTs dos participantes	38
Figura 19. Porcentagem de subpopulações de células iNKTs expressando CD4 e CD8 em relação à população de células CD3 ⁺	39
Figura 20. Expressão de CD38 pela subpopulação de iNKT duplo negativa para CD4 e CD8	40
Figura 21. Positividade de CD27 em linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ entre os grupos avaliados	41

Figura 22. Porcentagem de células B (CD19 ⁺) em relação à população de células CD3 ⁺	42
Figura 23. Comparação de porcentagem de células B de memória entre os grupos ...	43
Figura 24. Diferenças significativas para as populações de célula B de memória <i>switched</i> e <i>unswitched</i> entre os grupos	44
Figura 25. Porcentagem de células B naïve e subpopulações anérgica e em descanso em relação à população de células CD19 ⁺	45
Figura 26. Porcentagem de células B transicional em relação à população de células CD19 ⁺	46
Figura 27. Porcentagem de plasmoblastos (CD27 ⁺ CD38 ⁺) em relação à população de células CD19 ⁺	47
Figura 28. Correlação entre células iNKTs com células B em circulação entre grupos Dengue Aguda e Sintomáticos Não Dengue	48
Figura 29. Ausência de correlação significativa entre células iNKTs ativadas com células B em circulação entre grupos Dengue Aguda e Sintomáticos Não Dengue.....	50
Figura 30. Correlações significativas entre células iNKTs ativadas com células B em circulação entre grupos Dengue Aguda e Sintomáticos Não Dengue	52
Figura 31. Valores de ciclos de quantificação de PCR ao longo de correlações significativas	54

Lista de abreviaturas

APC	Célula apresentadora de antígeno (<i>Antigen presenting cells</i>)
APRIL	Ligantes A indutores de proliferação (<i>A proliferation-inducing ligand</i>)
BAFF	Fatores de ativação da célula B (<i>B cell-activating factor</i>)
BCR	Receptores de células B (<i>B cell receptor</i>)
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CD	Grupamento de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
CD40L	Proteína CD40 ligante
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
Ct PCR	Ciclos de quantificação de PCR
DA	Dengue aguda
DC	Células dendríticas
DENV	Vírus da dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Duplo negativa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
G	Gravidade, também se refere a unidade de força de centrifugação
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HBSS	Solução salina balanceada de Hank (<i>Hanks' balanced salt solution</i>)
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
IFN	Intérferon
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucinas
iNKT	Célula T invariante <i>natural killer</i> (<i>Invariant Natural Killer T cell</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>)
NK	<i>Natural killer</i>
NM	Nanômetro

NS	Não estrutural (<i>Non-structural</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Acido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
SND	Sintomáticos Não Dengue
T _{FH}	T auxiliares foliculares (<i>T follicular helper</i>)
TRL	Receptor tipo Toll (<i>Toll like receptor</i>)
α-GalCer	α-galactosilceramida

Resumo

Introdução: A disseminação global da dengue, causada pelo vírus da dengue e transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*, destaca-se como uma preocupação crescente devido ao aumento significativo de casos, atingindo 5,2 milhões em 2019 além da prevalência em 128 países. A ausência de um tratamento específico enfatiza a importância da prevenção e estudos da resposta imune na dengue para descobrir biomarcadores e desenvolver vacinas eficientes. **Objetivos:** Estudar os efeitos e alterações da frequência e atividade das células iNKTs (rápidas produtoras de grande quantidade de citocinas) e B (produtoras de anticorpos) durante a infecção por dengue através da diferença entre pacientes e Grupo Sintomáticos Não Dengue não dengue. **Métodos:** Sangue periférico foi coletado de pessoas que procuraram tendas de atendimento e hidratação montadas pelo Hospital Israelita Albert Einstein durante o surto de dengue de 2015 na cidade de São Paulo. Células mononucleares do sangue periférico foram separadas para mais tarde e foram marcadas para citometria de fluxo. A partir dos exames laboratoriais foram criados dois grupos: pacientes com dengue aguda e participantes do Grupo Sintomáticos Não Dengue não dengue. Os dados de citometria foram comparados por teste paramétrico de Mann-Whitney e para correlação teste de Spearman (significância $p \leq 0,05$). **Resultados:** Todos participantes do Grupo Dengue Aguda testaram positivos para dengue, enquanto nenhum do Grupo Sintomáticos Não Dengue. Este resultado é reforçado pelo fato de que o Grupo Dengue Aguda apresentou redução significativa de leucócitos totais e plaquetas em comparação ao Grupo Sintomáticos Não Dengue. Não houve diferenças entre os grupos para frequência de linfócitos T, $CD4^+$, $CD8^+$ e células iNKTs, mas o Grupo Dengue Aguda apresentou ativação de células T $CD8^+$ e células iNKTs, principalmente a subpopulação de iNKTs $CD4^-CD8^-$. O Grupo Dengue Aguda apresentou menor frequência de células B, mas dentro da população de células B transitórias e plasmoblastos. Os participantes do Grupo Sintomáticos Não Dengue não apresentaram nenhuma correlação entre estas células enquanto os pacientes do Grupo Dengue Aguda apresentaram correlações positivas entre maior estado de ativação das células iNKTs e as frequências de células B transitórias e plasmoblastos. Dentro desta correlação positiva, observou-se que quanto maior a carga viral dos pacientes, maior é a ativação de células iNKTs e maior a frequência de plasmoblastos. **Conclusões:** A

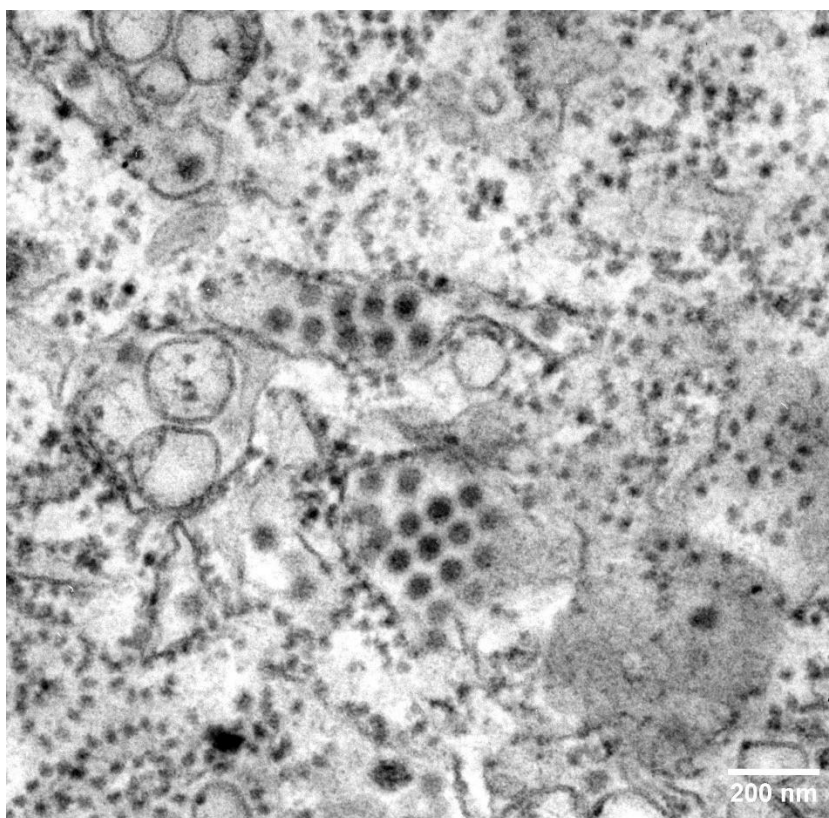
atividade das células iNKTs e interação com células B é essencial para a resolução na infecção pelo vírus da dengue.

Descritores: Dengue; Alergia e imunologia; Células T matadoras naturais; Células produtoras de anticorpos

1 INTRODUÇÃO

A doença dengue é causada pelo agente etiológico conhecido como vírus da dengue (DENV), demonstrados na figura 1. Apesar dos possíveis primeiros registros desta doença serem asiáticos,⁽¹⁾ acredita-se que a origem do vírus causador desta doença seja proveniente do continente africano.⁽²⁾ O DENV é transmitido pelos mosquitos hematófagos *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, sendo o segundo mais adaptado ao ambiente urbano e o principal vetor global.^(3,4)

De acordo com os registros históricos dos estudos epidemiológicos desta doença, Bancroft foi o primeiro a observar a correlação da presença do mosquito *A. aegypti* com a doença dengue, em 1906 na Austrália.⁽⁵⁾ No ano seguinte, Ashburn et al. demonstraram experimentalmente que o microorganismo causador da dengue era menor que bactérias, sugerindo pela primeira vez que esta doença era causada por um vírus.⁽⁶⁾



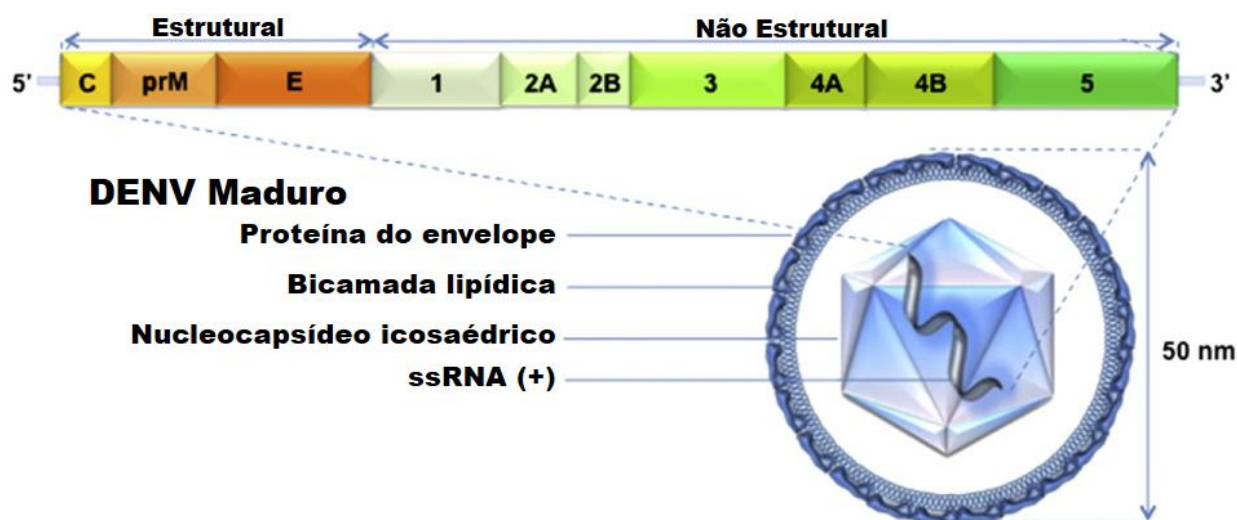
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library (PHIL). Atlanta: CDC; 2010 [cited 2024 Feb 26]. Available from: <https://phil.cdc.gov/>⁽⁷⁾

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica do vírus da dengue (partículas circulares) em um tecido

Os estudos sobre a doença avançaram significativamente durante a segunda guerra mundial. O grande número de soldados norte-americanos afetados pela dengue no sudeste asiático fez com que o exército dos Estados Unidos encomendasse pesquisas sobre esta doença para a produção de uma possível vacina. Para estas pesquisas, Sabin conseguiu adaptar o vírus para um modelo animal com ratos e observou que havia diferentes sorotipos do vírus.^(8,9) Hoje sabemos que há 4 diferentes sorotipos nomeados de DENV-1 a DENV-4.⁽²⁾

O DENV pertence à família viral Flaviviridae e, similarmente aos vírus da mesma família, possui um formato esférico que varia entre 40 a 60 nanômetros (nm) de diâmetro. Ao centro da estrutura viral há um nucleocapsídeo icosaédrico de 30nm de diâmetro que contém o RNA viral, e este nucleocapsídeo é envolto por um envelope composto de uma bicamada lipídica onde estão ancoradas as proteínas do envelope.^(10,11) O DENV possui um genoma próximo de 11.000 bases e seu material genético possui informações para a produção de 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não estruturais (NS).⁽¹²⁾

As proteínas estruturais são conhecidas pelas letras C, prM e E. A proteína C irá formar o capsídeo que irá conter o material genético do DENV, a proteína prM produzir uma membrana precursora para a montagem do vírus e a proteína E irá constituir o envelope.⁽¹⁰⁾ Já as 7 proteínas NS são nomeadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, cada uma com uma função na formação de novas unidades virais dentro da célula infectada. A proteína NS1 interage por meios ainda não completamente esclarecidos com as proteínas NS4A e NS4B para estimular a replicação viral;⁽¹³⁾ NS2A é responsável por clivar a proteína NS1 logo após sua síntese;⁽¹⁴⁾ NS3 é uma proteína tipo helicase específica de RNA viral para otimizar a replicação;⁽¹⁵⁾ NS5 é a maior das proteínas NS e atua na atividade de RNA polimerase e no processo de metilação do novo RNA viral.⁽¹⁶⁾ A figura 2 apresenta um esquema simplificando a estrutura e genes do DENV.



Fonte: Traduzido e adaptado de Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, Nelson MA, Herring BL, Hapel AJ, et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol Ther.* 2013;137(2):266–82. Figure 1. The structural and genomic features of dengue virus (DV); p. 268.⁽¹¹⁾

Figura 2. Esquema de estrutura e composição genética do vírus da dengue

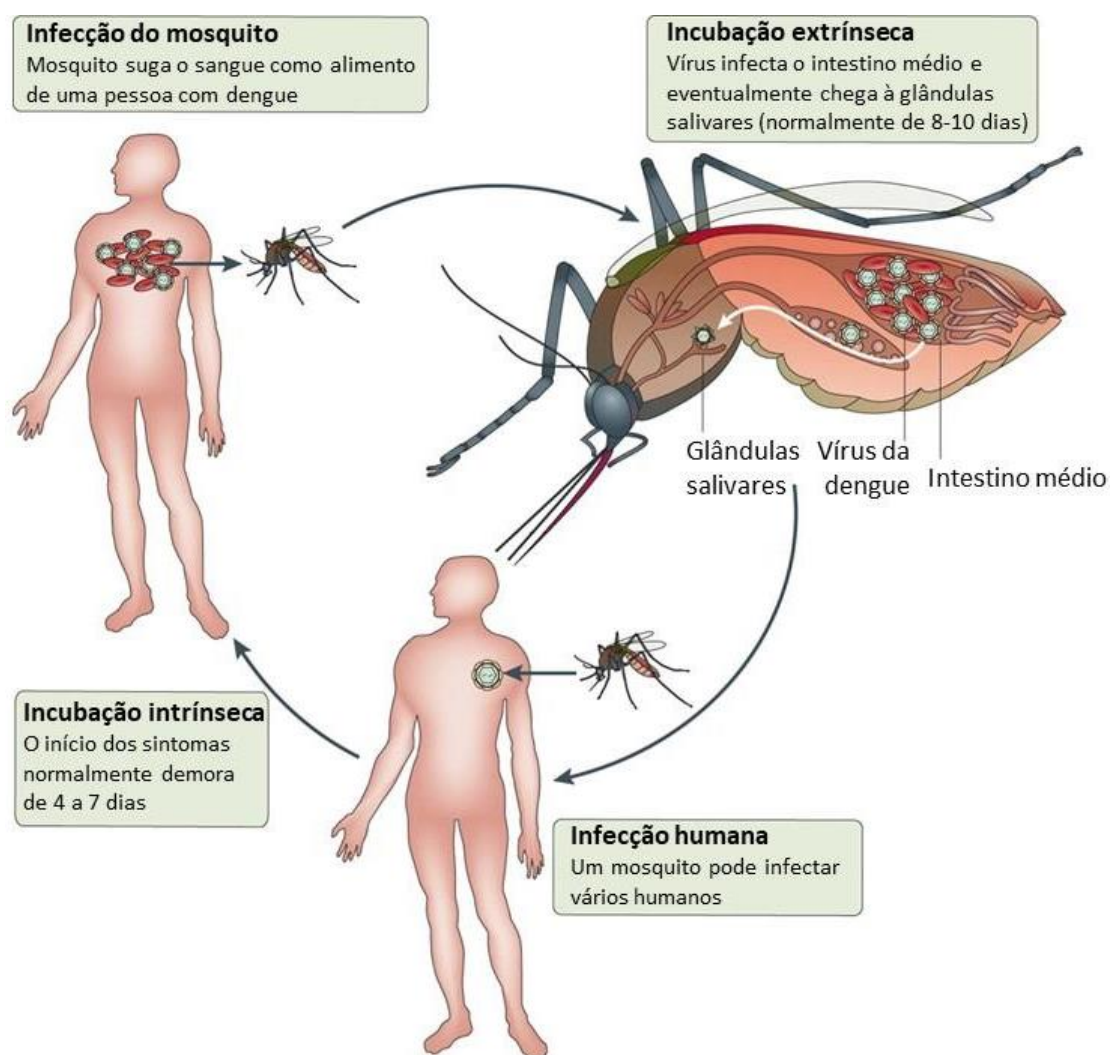
A doença causada por este vírus, está presente em 128 países onde vivem mais de 3,9 bilhões de pessoas.⁽¹⁷⁾ De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência de dengue cresceu drasticamente por todo o globo nas últimas décadas: de 505.430 casos em 2000 para 5,2 milhões em 2019, e em 2023 registrou seu maior pico de casos anual: 6,5 milhões de casos.⁽¹⁸⁾ A maioria dos surtos ocorreram no Brasil, China e Índia,⁽¹⁹⁾ e mais especificamente no Brasil, de acordo com a Organização Pan Americana de Saúde, um braço da OMS para os países da América Latina, no período de 2014 a 2022, foram registrados 5,77 milhões de casos de dengue e 4.908 óbitos por causa desta doença.⁽²⁰⁾ Porém, os números globais tendem a piorar. Devido ao aquecimento global, várias partes do planeta que são atualmente inóspitas ao mosquito transmissor passarão a ter temperaturas médias mais elevadas, permitindo o avanço do mosquito para novas regiões. A quantidade de pessoas que moram nestas regiões onde as temperaturas serão mais propícias ao mosquito totalizam aproximadamente 1 bilhão de indivíduos e, conseqüentemente, serão expostos à possível transmissão do DENV.⁽²¹⁾

Apesar dos crescentes números de infecções por todo o globo, ainda não há um tratamento específico para a dengue, sendo a prevenção a melhor estratégia. De acordo com a OMS, uma vacina ideal deve proteger contra os 4 sorotipos com apenas uma dose, ter um efeito duradouro e não ter efeitos adversos graves significativos.⁽²²⁾ A preocupação para uma vacina tão eficaz advém da reação

aumentada dependente de anticorpos na qual os anticorpos produzidos para um sorotipo de DENV não neutraliza outro e pode exacerbar os sintomas numa infecção heteróloga.^(23,24)

A primeira vacina liberada para uso comercial em vários países foi a Dengvaxia® produzida pela Sanofi Pasteur, porém seu uso é restrito para pessoas que já estiveram doentes com dengue e mesmo assim ainda apresenta uma baixa eficácia.⁽²⁵⁾ Outra nova vacina liberada pela ANVISA para uso nacional foi a Qdenga®.⁽²⁶⁾ Esta vacina produzida pela farmacêutica japonesa Takeda apresentou eficácia principalmente em crianças e adolescentes entre 4 a 16 anos residentes em 8 países epidêmicos para dengue num período de mais de 4 anos. Os estudos demonstraram uma eficácia de 64% em pessoas já expostas a dengue e 53,5% em participantes que nunca tiveram dengue. Entretanto a eficácia só foi demonstrada para DENV1 e DENV2 e dados não conclusivos para DENV3 e DENV4 para participantes sem exposição prévia ao vírus.⁽²⁷⁾ A vacina Butantan-DV, desenvolvida pelo instituto brasileiro Butantan, demonstrou resultados mais promissores. A eficácia desta vacina foi de aproximadamente 80% entre participantes que nunca foram previamente infectados pelo DENV e de aproximadamente 90% com histórico de infecção prévia. Porém, assim como a vacina da Takeda, não houve dados suficientes para averiguar eficácia contra os sorotipos DENV3 e DENV4.⁽²⁸⁾ Além do destaque destas 3 vacinas, há diversas outras em desenvolvimento.⁽²⁹⁾

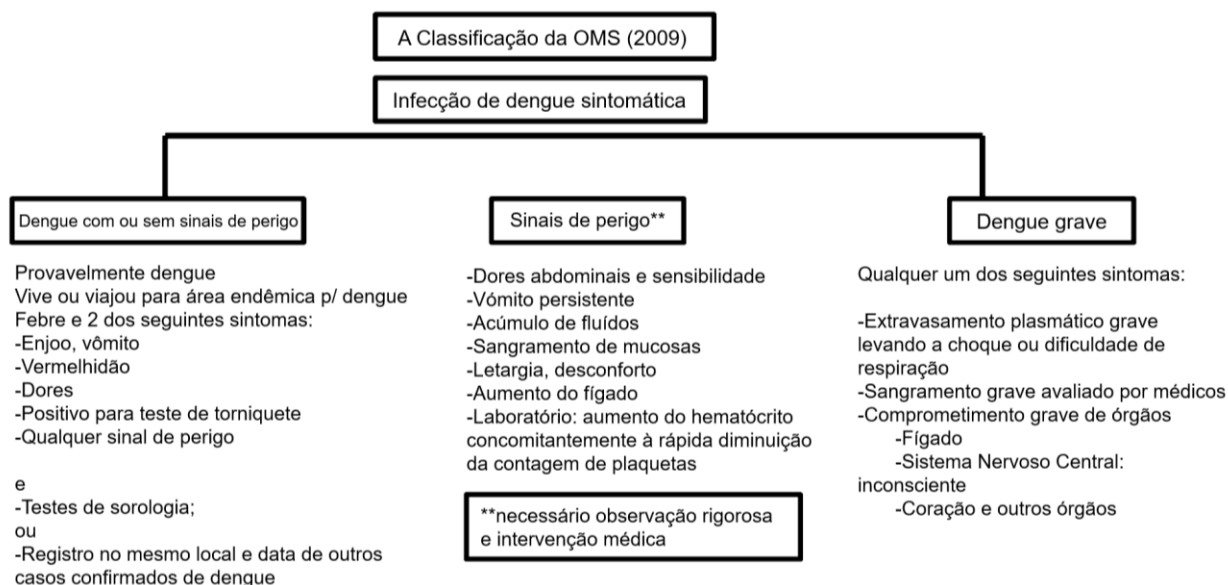
Além de vacinas, um dos meios viáveis de combate à infecção por DENV é contra o vetor, pois o ciclo de infecção do DENV em humanos depende da transmissão deste por mosquito *Aedes aegypti*. O mosquito fêmea desta espécie se infecta ao se alimentar do sangue de uma pessoa doente no período de alta viremia. No mosquito, o DENV se dissemina por vários tecidos até chegar nas glândulas salivares. Quando este mosquito infectado se alimenta do sangue de uma nova pessoa ainda não infectada, ele inocula a saliva com o DENV presente e fecha o ciclo de infecções conforme esquematizado na figura 3.⁽³⁰⁾



Fonte: Traduzido e adaptado de Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16055. Figure 2. The urban dengue virus cycle in humans and mosquitoes; p. 5.⁽³⁰⁾

Figura 3. Ciclo do vírus da dengue

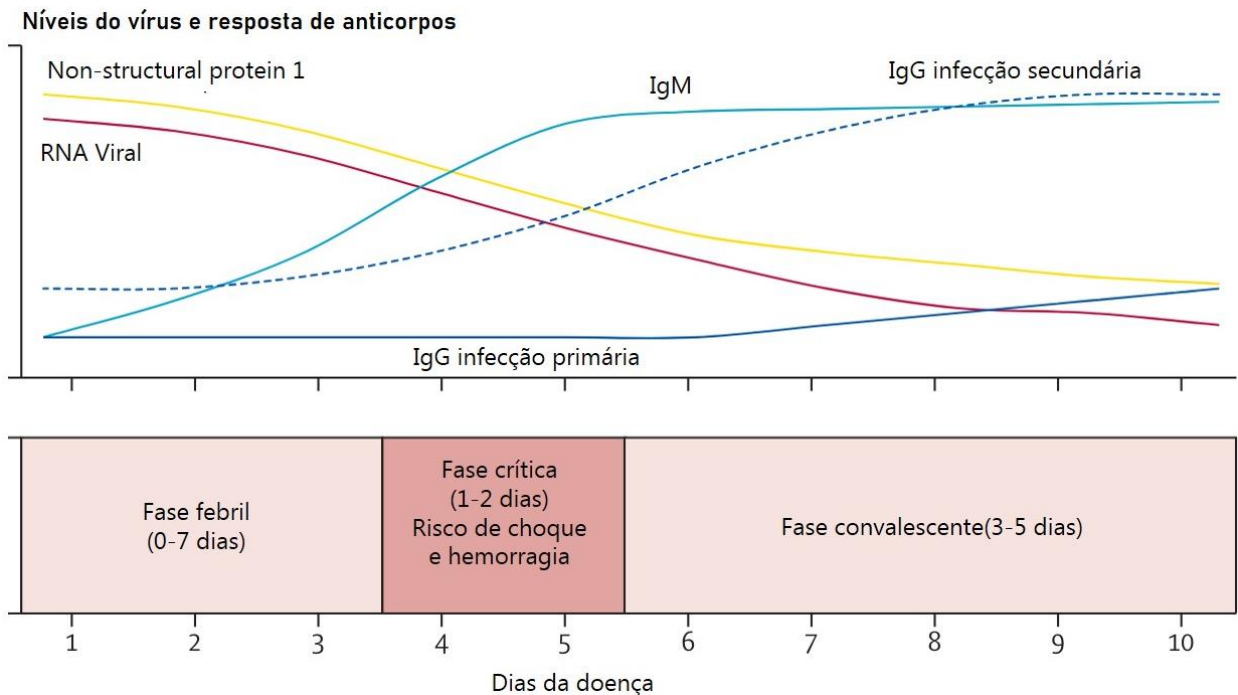
Após ser infectado pelo DENV, os indivíduos podem ser assintomáticos, ou seja, não apresentarem sintomas. Mas aqueles que apresentam sintomas podem ser classificados, de acordo com a OMS, como pacientes com dengue ou dengue grave (Figura 4). Pacientes com dengue apresentam febre e pelo menos 2 sintomas, tais como náusea, vômito, vermelhidão pela pele e dores. Outros sinais que podem ser considerados como sinais de perigo incluem dores abdominais, sangramento de mucosas, aumento do fígado e exames laboratoriais que indiquem aumento rápido do hematócrito e diminuição na contagem de plaquetas. Pacientes com dengue grave apresentam qualquer um dos seguintes sintomas: extravasamento plasmático intenso com dificuldade de respiração, sangramento intenso, choque hipovolêmico ou avaliação clínica que demonstre comprometimento de órgãos.⁽³¹⁾



Fonte: Traduzido e adaptado de Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, et al. Dengue--how best to classify it. Clin Infect Dis. 2011;53(6):563–7. Figure 2. Dengue classification according to the World Health Organization guidelines issued in 2009; p. 564.⁽³¹⁾

Figura 4. Classificação da doença dengue pela Organização Mundial da Saúde de acordo com sintomas

O decorrer dos sintomas da dengue passa por 3 fases clínicas: febril, crítica e convalescente. A fase febril dura de 2 a 7 dias, é quando ocorre o período de maior viremia, febre e principais sintomas. Depois dos primeiros dias de sintomas, o paciente pode se recuperar para a fase convalescente, ou pode desenvolver a fase crítica. Na fase crítica há o início da defervescência, mas novos sintomas aparecem e outros já presentes podem se intensificar. Nesta fase há aumento da permeabilidade vascular o que acarreta dor abdominal intensa, vômitos mais persistentes, acúmulo de líquidos, letargia e aumento do hematócrito. Nessa fase pode ocorrer o choque devido à perda de volume de plasma, podendo comprometer a funcionalidade de diversos órgãos.^(32,33) As 3 fases estão esquematizadas na figura 5.



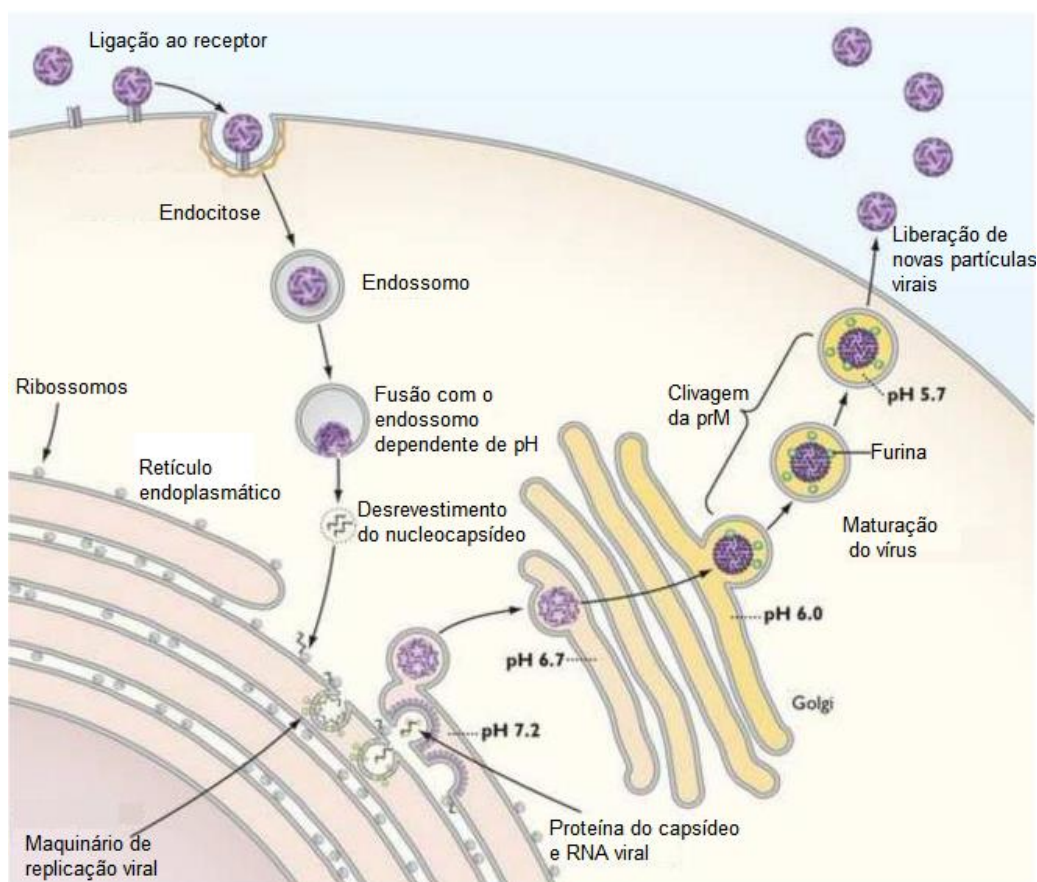
Fonte: Traduzido e adaptado de Paz-Bailey G, Adams LE, Deen J, Anderson KB, Katzelnick LC. Dengue. Lancet. 2024;403(10427):667–82; p. 5.⁽³⁴⁾

Figura 5. Diferentes níveis de vírus, resposta do corpo e anticorpos de acordo com as diferentes fases da dengue

Uma vez dentro do organismo, o DENV possui a capacidade de infectar diversas células e usar o maquinário celular interno delas para se reproduzir. Num estudo com ratos que foram inoculados com DENV de forma intradermal, foi observado que o DENV infecta primeiro as células de Langerhans presentes na região subcutânea e 48h depois infecta os monócitos recrutados ao local da infecção.⁽³⁵⁾ Já em outro estudo, desta vez com fragmentos de pele humana em cultivo, foi observado que após 48h da inoculação do vírus, 90% das células positivas para a presença da proteína viral E eram células CD45⁺ e HLA-DR⁺, ou seja, células apresentadoras de antígenos (APC) da pele. De acordo com este mesmo estudo, mais especificamente, das células CD45⁺ HLA-DR⁺, as mais infectadas foram as células dendríticas CD14⁺ e células de Langerhans.⁽³⁶⁾ APCs migram para linfonodos para apresentar antígenos à outras células do sistema imune,⁽³⁷⁾ porém, na infecção pelo DENV, estas células também estão infectadas e este processo migratório ajuda a disseminar o vírus.

Para o vírus conseguir infectar uma célula, a proteína E presente na superfície do envelope viral facilita a ligação do DENV a receptores específicos presentes na superfície de células suscetíveis.⁽³⁸⁾ Após a ligação à célula, o vírus é internalizado por endocitose e a queda do pH dentro do endossomo contendo o vírus induz uma alteração estrutural da proteína E que irá mediar a fusão do envelope viral

com a camada interna da vesícula.⁽³⁹⁾ Cria-se um canal livre para o material genético ser liberado no citoplasma celular. A fita simples positiva de RNA viral é traduzida pelos ribossomos, sintetizando uma longa poliproteína.⁽⁴⁰⁾ Observações feitas com microscópio eletrônico mostram que a poliproteína viral sintetizada é clivada e aderida ao retículo endoplasmático rugoso e em seguida as proteínas não estruturais sintetizam o novo RNA viral dentro de vesículas derivadas da membrana do retículo endoplasmático.⁽⁴¹⁾ Neste momento, algumas proteínas NS1 podem ser liberadas pela célula e serem usadas para o diagnóstico da doença.⁽⁴²⁾ O novo vírus formado sofre um processo de maturação enquanto é transportado ao aparelho de Golgi e depois é secretado por exocitose, já apto a infectar novas células. Todo este ciclo de infecção e reprodução viral numa célula está representado de forma simplificada na figura 6. Porém o corpo de uma pessoa infectada não fica inerte ao processo de invasão e replicação do DENV em suas células, ele dispõe do sistema imunológico para se opor às ações do vírus.



Fonte: Traduzido e adaptado de Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2012;2(2):168–75. Figure 2. The maturation of flaviviruses; p. 170.⁽⁴³⁾

Figura 6. Esquema do ciclo de infecção, reprodução e liberação do vírus da dengue em uma célula

O sistema imunológico é capaz de responder à infecção viral por meio de um complexo conjunto de células, órgãos e tecidos.⁽⁴⁴⁾ De forma simplificada, o sistema imune pode ser dividido em duas frentes de atuação, a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa pois possui células capazes de uma rápida resposta contra diversos elementos já conhecidos graças a diversos receptores pré-definidos sem a necessidade de contato prévio com o antígeno.

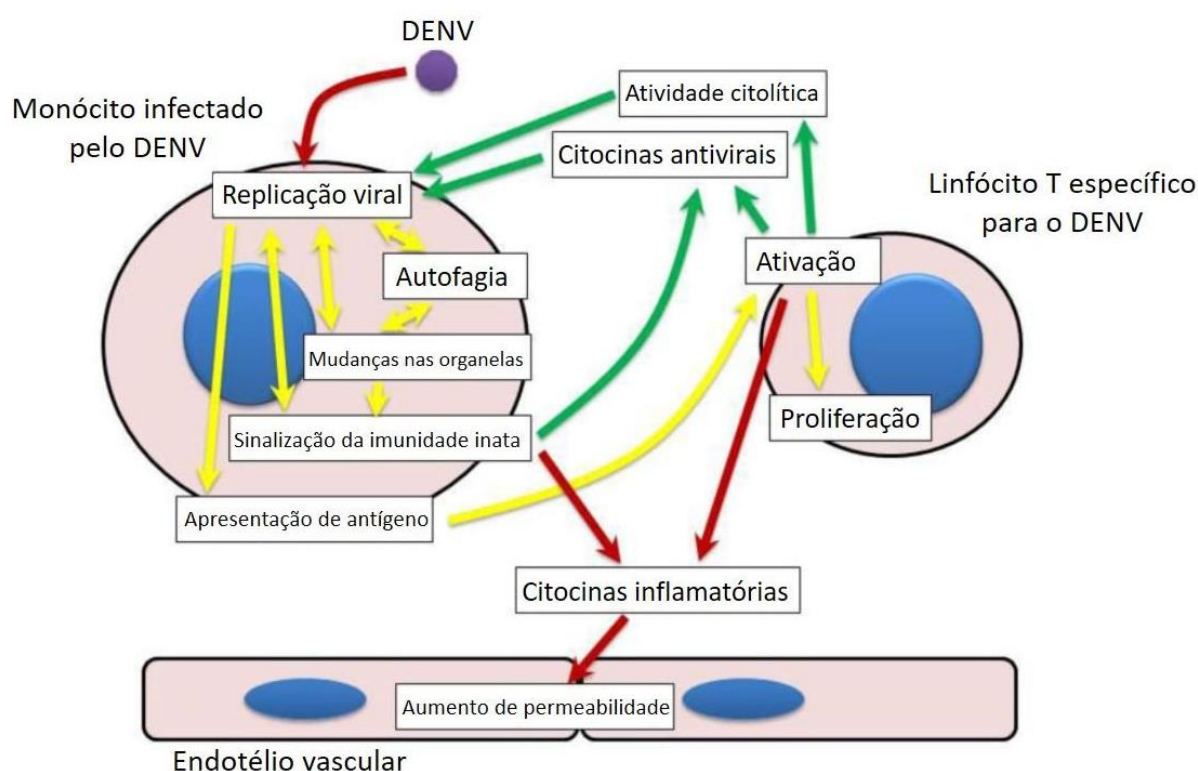
A outra linha de defesa, a resposta imune adaptativa, inicia suas ações em conjunto com a inata, porém seus resultados aparecem mais tarde. Ela é mais específica contra os patógenos que escapam e sobrevivem à resposta inata, utilizando-se de um sistema de reorganização genética para gerar novos receptores contra os antígenos. Apesar da resposta mais tardia, desenvolvem memória e anticorpos específicos para uma resposta imediata numa eventual reinfecção. Apesar das diferenças, estes dois sistemas trabalham juntos para lidar com diferentes tarefas.

Como primeira resposta do sistema imune inato após a infecção do DENV, macrófagos englobam o vírus e passam a produzir a citocina interferon (IFN). A citocina IFN é um importante imunorregulador antiviral para a resposta imune não específica e também para promover o início da resposta imune adaptativa. Há três tipos de IFN: tipo 1 inclui IFN α , IFN β e IFN ω ; tipo 2 inclui o IFN γ ; e tipo 3 inclui IFN $\lambda 1$, $\lambda 2$ e $\lambda 3$. Os IFN do tipo 1 são conhecidos pelas suas atividades antivirais e os do tipo 3 apresentam uma atividade similar ao do tipo 1. A maioria das células infectadas por vírus são capazes de sintetizar IFN α e IFN β para interferir contra a replicação viral e o IFN do tipo II são produzidos pelas células T e células *natural killers* (NK) ativadas.⁽⁴⁵⁾

Outras células do sistema inato, as células dendríticas (DC), fagocitam o vírus, migram aos linfonodos. Nos linfonodos, passam a produzir IFN do tipo 1 e 2 para promover a apresentação de antígenos e iniciar a resposta imune adaptativa.⁽⁴⁶⁾ O DENV também possui mecanismos de evasão das atividades do IFN do tipo 1, podendo inibir sua resposta, porém as vias alternativas ativadas pelos IFNs do tipo 3 são capazes de diminuir a replicação viral.⁽⁴⁷⁾

Enquanto as células do sistema imune inato utilizam de seus recursos para combater a infecção, outras células começam a atuar para iniciar a resposta imune das células do sistema adaptativo. Nos linfonodos, células APC apresentam partes do vírus como partes do envelope viral e também pelas proteínas

NS3 e NS5 às células T virgem para ativá-las.⁽⁴⁸⁾ Mais especificamente, as células T CD8⁺ ou conhecidas como células T citotóxicas, capazes de eliminar células contaminadas, podem ser ativadas pela apresentação de partes do DENV durante a fase aguda da doença e se expandirem.⁽⁴⁹⁾ Algumas células T CD4⁺ ativadas pela presença de antígenos do DENV se desenvolvem para as células T auxiliares foliculares (T_{FH}), com a função de ajudar o desenvolvimento das células B. Um esquema simplificado da infecção do DENV e as primeiras respostas do sistema imune estão na figura 7.



Setas verdes são vias de respostas protetivas contra a infecção ou doença, setas vermelhas indicam as vias que são associadas com a dengue grave, e setas amarelas são vias que estão associadas tanto a proteção quanto patenogênese.

Fonte: Traduzido e adaptado de Rothman AL, Medin CL, Friberg H, Currier JR. Immunopathogenesis versus protection in dengue virus infections. *Curr Trop Med Reports*. 2014;1(1):13–20. Figure 1. Innate and adaptive immune responses to dengue virus and their relationships to protection or disease; p. 14.⁽⁵⁰⁾

Figura 7. Resposta inata e adaptativa envolvendo as células T ao vírus da dengue

As células B, além de serem capazes de criar memória imunológica, são responsáveis pela produção de imunoglobulinas (Ig), também conhecidas como anticorpos. Os anticorpos produzidos pelas células B podem neutralizar a capacidade do vírus de interação com a célula hospedeira, sendo os principais alvos as proteínas estruturais E, prM e C.^(51,52) O desenvolvimento das células B se inicia na medula óssea

a partir de células tronco hematopoiéticas. Durante o processo de diferenciação destas células, também ocorre uma série de rearranjos em genes específicos da expressão dos receptores de célula B (BCR). Este processo leva à geração de um grande repertório de BCR e Igs, com capacidade de reconhecer mais de 5×10^{13} diferentes antígenos.

Depois que deixam a medula óssea, as células B ainda imaturas, conhecidas como células B de transição ou transicionais, migram para o baço para finalizar o desenvolvimento inicial. Uma vez completado o processo de maturação no baço, as células B retornam à circulação e vão para os linfonodos. Antes de serem ativadas, estas células são conhecidas como células B *naïve*.^(53,54) As células B *naïve* podem ser subclassificadas em dois tipos, as células B *naïve resting* (em descanso) e anérgicas. As células *naïve resting* são as células B maduras que não apresentaram auto reatividade e expressam BCR com capacidade de reconhecer antígenos apresentados a elas. Já as células B que apresentam auto reatividade são deletadas por deleção clonal ou podem continuar vivas mas com funcionalidade reduzida, tornando-as inativas. Estas são as células B *naïve* anérgicas.⁽⁵⁵⁾

As células B ativadas pelo contato com um antígeno podem se diferenciar em células B foliculares ou células B da zona marginal. As células B da zona marginal conseguem produzir e secretar anticorpos IgM contra antígenos a base de carboidratos e fosfolipídios em 1 a 3 dias.⁽⁵⁶⁾ Já as células B foliculares estão localizadas no centros germinativos dentro dos folículos nos linfonodos. Nestes locais, se encontram células dendríticas foliculares especializadas em apresentar antígenos que podem ser reconhecidos pelos receptores das células B. Ao encontrar um antígeno que é reconhecido pelos receptores da célula B, estas são ativadas. Em alguns casos, as células B também precisam receber estímulos por contato com as células T provenientes da zona de células T do linfonodo, mais especificamente das células T auxiliares. Um destes sinais, por exemplo, ocorre pela proteína CD40 ligante (CD40L) expressa na superfície das células T que se ligam ao CD40 da superfície das células B, ativando-as. Uma vez ativadas, as células B passam pelo processo de mutação somática para a mudança de classe da Ig (também conhecido como mudança de isotipo ou *class switch*), resultando em uma maturação de afinidade entre antígeno e anticorpo. Células B *naïve* que expressavam IgD e IgM, passam a expressar IgG, IgE ou IgA após a mudança de isotipo.⁽⁵⁷⁾

A célula B ativada também inicia um processo de expansão clonal. Os clones que apresentam afinidade ao antígeno são retidos no centro germinativo pelo processo de seleção positiva, mas aquelas que apresentam uma maior afinidade ao antígeno são induzidas à diferenciação em plasmoblastos que irão maturar em células plasmáticas secretoras de anticorpos. Neste processo, as células T_{FH} agem na maturação dos plasmoblastos e a migrarem para fora do centro germinativo.⁽⁵⁸⁾ No caso da infecção por DENV, altos níveis de anticorpos anti-DENV em circulação são importantes mediadores de proteção na dengue sintomática.⁽⁵⁹⁾

Além das células plasmáticas, células B de memória são selecionadas para se manterem no centro germinativo. No caso de reinfecção, as células de memória são capazes de serem ativadas diretamente pelo antígeno e prontamente realizarem uma replicação clonal para elevar o número de células produtoras de anticorpos IgG de alta afinidade.^(60,61)

As células B de memória *switched* são originárias do centro germinativo e passaram pelo processo de mudança de isotipo de imunoglobulina secretada para ser mais específico contra o antígeno para o qual foi selecionada. Já as células B de memória *unswitched* são células com marcadores característicos de memória porém não passaram pelo processo de troca de isotipo e ainda expressam IgM de baixa afinidade.^(61,62) A diferença na frequência destes subtipos de células B em circulação podem ser indicativos para o comportamento do sistema imune numa infecção. Por exemplo, na infecção viral de SARS-CoV-2, foi observado que maiores níveis de células B de memória *unswitched* e *switched* prevêm uma recuperação mais cedo da doença COVID-19.⁽⁶³⁾

Em virtude destas funcionalidades das células B, um indivíduo infectado pelo DENV apresentará níveis de IgM detectáveis em circulação de 3 a 5 dias após a infecção, e ainda será detectável em níveis menores até 3 meses depois. Já níveis de IgG aparecem por volta de 7 dias depois da infecção e, apesar da concentração em circulação diminuir com o passar do tempo, ainda são detectáveis anos depois.⁽⁵¹⁾

As populações de células B descritas acima podem ser rastreadas e quantificadas no sangue periférico de acordo com seus respectivos marcadores de superfície. Por exemplo, as células B de transição são caracterizadas pela expressão superficial de várias moléculas de superfície como CD19, CD38, IgD e IgM. O mesmo pode ser feito para classificar outras células observadas de acordo com a combinação

específica de seus marcadores de superfície. A tabela 1 traz uma lista das subpopulações de células B, um resumo de suas funções e a combinação específica de marcadores de superfície para cada célula.

Tabela 1. Populações de células B no sangue periférico

População de célula B (CD19 ⁺)	Marcadores de superfície	Função/propriedades
Transição	CD38 ⁺⁺ IgD ⁺ IgM ⁺	Célula B recém produzida na medula óssea, não ativada e não funcional
<i>Naïve Resting</i>	IgD ⁺ CD27 ⁻ IgM ⁺	Célula B madura funcional, ainda não apresentada à um antígeno
<i>Naïve Anérgicas</i>	IgD ⁺ CD27 ⁻ IgM ⁻	Célula B que apresentou auto reatividade e foram inativadas
<i>Memória Switched</i>	IgD ⁻ e CD27 ⁺ IgM ⁻	Alta capacidade de diferenciação em células plasmáticas para expressar IgG, IgA ou IgE
<i>Memória Unswitched</i>	IgD ⁻ CD27 ⁺ IgM ⁺	Capacidade de diferenciação em células plasmáticas que expressam IgM
Plasmoblastos	CD27 ⁺ e CD38 ⁺	Novas células produtoras e secretoras de anticorpos

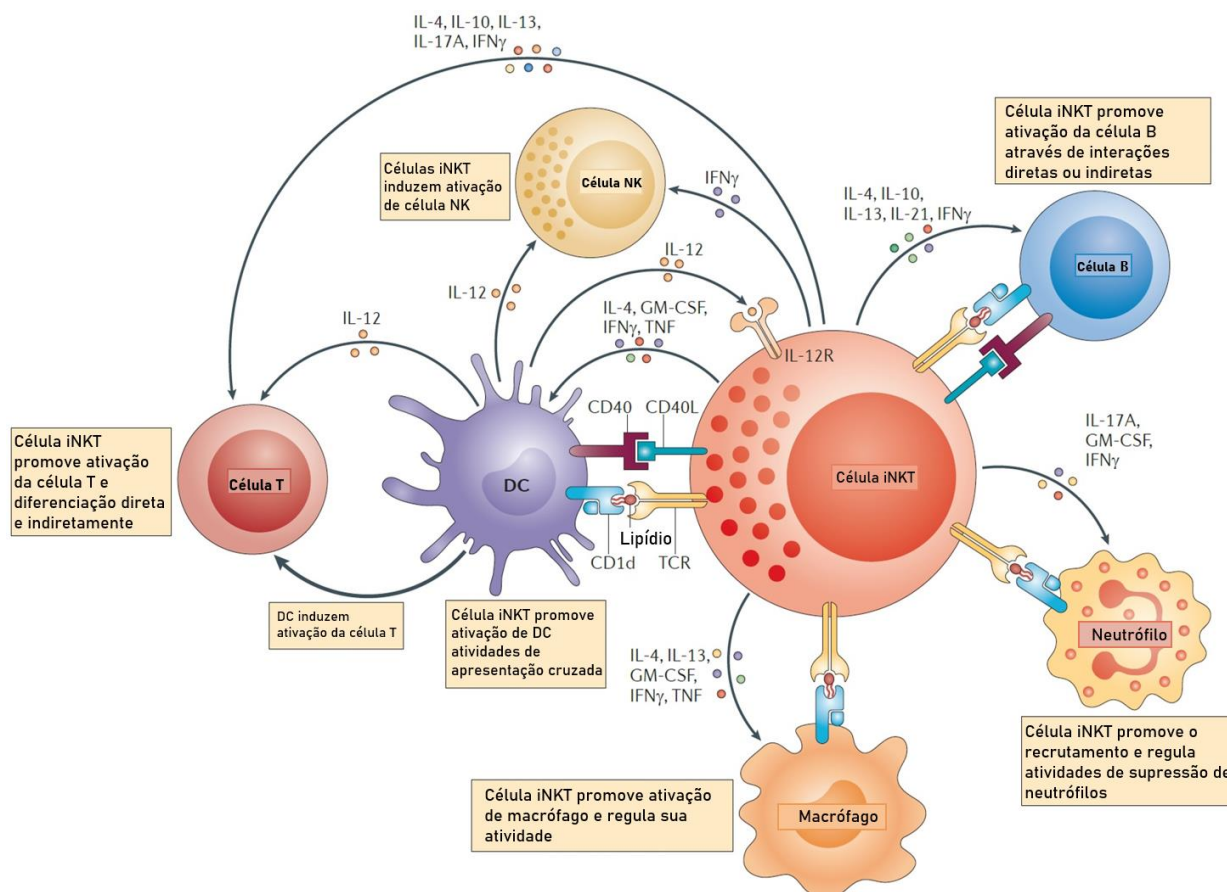
Fonte: Traduzido e adaptado de Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and opportunities for consistent classification of human B cell and plasma cell populations. Front Immunol. 2019;10. Table 1. Classification of blood human B cells using seven core markers; p. 5.⁽⁶⁴⁾

A versatilidade da célula B se expande também para a função de apresentadora de antígenos. Peptídeos são internalizados nas células B por endocitose após a ligação ao BCR para passar por um processo de dissociação. Depois são agregados à proteínas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) para serem apresentados a outras células do sistema imune.⁽⁶⁵⁾ Além de MHC, as células B também expressam uma proteína de superfície apresentadora de antígeno de estrutura similar ao MHC, a molécula CD1. Há 5 diferentes proteínas CD1 em humanos (CD1a-CD1e). As proteínas CD1 são classificadas em 3 grupos: grupo 1 composto pelas CD1a, CD1b e CD1c; grupo 2 composto pela CD1d e o grupo 3 pela CD1e. A proteína CD1d é expressa por APCs e por outras células como monócitos e células B.⁽⁶⁶⁾ As proteínas MHC são altamente polimórficas e cada uma se liga a peptídeos de tamanho e formato único, já as proteínas CD1 são capazes de se ligar e apresentar uma limitada gama de lipídios. Tanto lipídios das próprias células assim como derivado de origem extracelular já foram identificados como ligantes às proteínas CD1 do grupo 1, como por exemplo, glicoesfingolipídeos e fosfolipídios, porém apenas alguns destes possuem a capacidade de estimular células T.⁽⁶⁷⁾ Já a proteína CD1d é capaz de se ligar a uma gama mais restrita de lipídios, e há uma célula especializada em reconhecer lipídios apresentados apenas pela proteína CD1d, a célula T invariante *natural killer* (iNKT).

As células iNKTs são um subtipo das células T com papel na regulação do sistema imune inato e adaptativo. Elas foram primeiramente observadas (porém ainda não descritas) em camundongos no final da década de 1980 como células duplo negativas para CD4 e CD8 mas com marcadores de células T ativas.⁽⁶⁸⁾ Nos anos seguintes, além de descobrirem que também expressavam marcadores de superfície NK1.1, típicos de células NK murinas, foi observado a expressão de TCR com a cadeia estrutural invariante V α 14J α 18.^(69,70) Em seguida, uma série de pesquisas com camundongos identificou que o ligante que estas células reconheciam era uma molécula apresentadora de antígeno tipo MHC porém não convencional pois era não-polimórfico e hidrofóbico.^(70,71) Posteriormente, foi determinado que se tratava da molécula murina CD1.⁽⁷²⁾ Uma célula de características similares também foi observada em humanos, a qual era estimulada por glicolipídios apresentados pela proteína CD1d e possui um TCR de cadeia estrutural invariante V α 24J α 18.⁽⁷³⁾

As iNKTs estão presentes em vários órgãos e tecidos em diferentes quantidades. Em camundongos e humanos, as iNKTs já foram observadas no fígado, medula óssea, baço, linfonodos,⁽⁷⁴⁾ pulmões, tecido adiposo e no intestino.⁽⁷⁵⁾ Enquanto no fígado de murinos as iNKTs chegam a compor 30% dos linfócitos, em humanos este percentual é menor, por volta de 1%.⁽⁷⁶⁾ No sangue periférico humano, a porcentagem varia de 0,003 à 1% dos linfócitos circulantes.^(77,78) Apesar da baixa frequência, quando estimuladas por glicolipídios, estas respondem rapidamente com a produção de diferentes citocinas e quimiocinas. Experimentalmente, já foram observadas a produção de várias citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-21, TNF- α , o fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e quimiocinas CC ligante 2 e 5.⁽⁷⁹⁾

As interações das iNKTs com outras células do sistema imune podem ocorrer por diferentes vias. Numa destas interações, há uma troca de ativações mútuas concomitantemente entre DC e iNKTs na qual DCs apresentam antígenos lipídicos pela molécula CD1d às iNKTs enquanto o CD40L da iNKT se ligam ao receptores de CD40 das DCs, fazendo com estas secretem IL-12 para ativar as iNKTs. Esta troca mútua de ativações entre DCs e iNKTs levam à ativação de células NK, células B, e de células T CD4⁺ e CD8⁺.⁽⁷⁴⁾ Além de uma relação bidirecional de ativação entre iNKTs e macrófagos, as iNKTs também interagem positivamente com neutrófilos ao recrutá-los para zonas de infecção e ativá-los. A figura 8 representa as interações entre a iNKT com outras células do sistema imune.

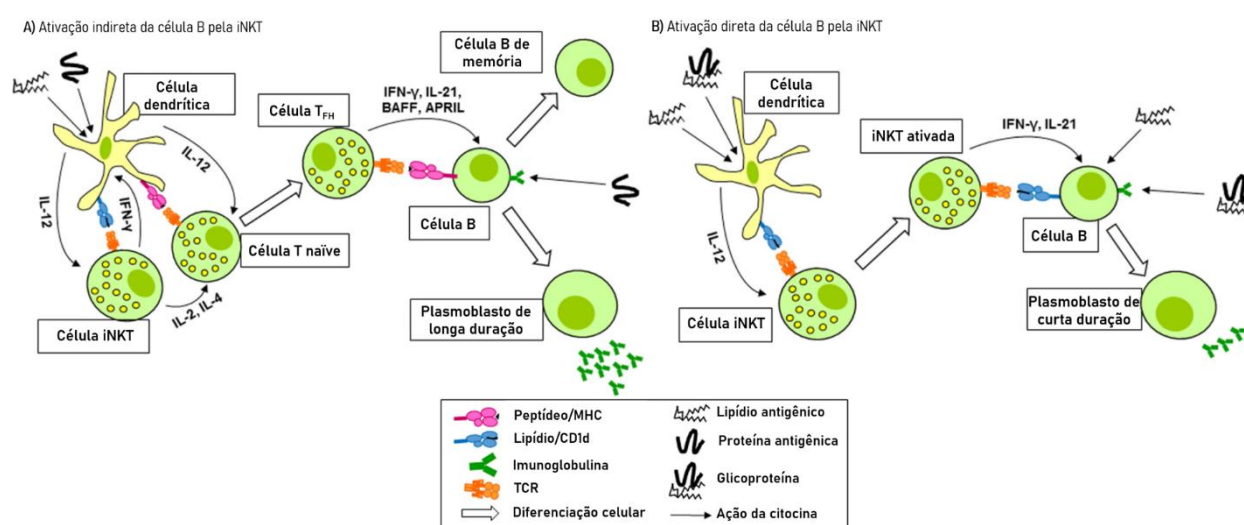


Fonte: Traduzido e adaptado de Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(2):101-17. Figure 5 Interactions between iNKT cells and other leukocytes; p. 111.⁽⁸⁰⁾

Figura 8. Interações entre células iNKTs com outros leucócitos

As iNKTs também podem ser subclassificadas pelos marcadores de superfície CD4 e CD8. Os subtipos podem apresentar em sua superfície apenas a molécula CD4 (CD4⁺CD8⁻), ou apenas CD8 (CD4⁻CD8⁺), ou duplo negativa (CD4⁻CD8⁻) e até, inclusive, duplo positivo para as duas moléculas (CD4⁺CD8⁺),⁽⁷⁸⁾ entretanto, não há muitos estudos sobre a atividade da subpopulação dupla positiva. Estas diferentes subpopulações variam em quantidade e também em perfil de produção de citocinas. Os subtipos mais comuns são as iNKTs DN seguidas por iNKTs CD8⁺ e iNKTs CD4⁺. Estes 3 subtipos das células iNKTs são capazes de secretar citocinas de resposta Th1 e Th2, porém em diferentes quantidades. As células iNKTs CD8⁺ tendem a produzir mais citocinas típicas de resposta Th1, enquanto iNKTs CD4⁺ secretam predominantemente citocinas de resposta imune Th2. As células iNKTs DN exibem um perfil de secreção de citocinas intermediário entre Th1 e Th2.⁽⁸¹⁾ Independente do perfil de citocinas secretadas, já foi observado que as atividades das três subpopulações de células iNKTs são capazes de induzir a secreção de anticorpos pelas células B.⁽⁸²⁾

As células iNKTs podem ativar, regular e manter a resposta imunológica das células B de forma direta, ou seja, através de contato entre elas, e de forma indireta através de estimulação de outras células que irão ativar as células B. Na forma indireta, ou não cognitiva, as iNKTs são ativadas pelas DC, elas migram para a zona marginal e nas regiões inter foliculares dos linfonodos onde interagem com as células. Em seguida, através da secreção de IL-2 e IL-4, as células iNKTs estimulam para que as células T adquiram funções de células TFH que irão estimular as células B através do contato direto com elas e secreção de IFN- γ e IL-21. Já na interação de forma direta, ou cognitiva, onde há contato direto entre as células, o receptor da célula B reconhece antígenos contendo lipídios e os internalizam para mais tarde serem apresentados pelo CD1d às células iNKTs. Uma vez estimulada por lipídios apresentados pelas células B, as iNKTs passam a expressar CD40L e também assumem um papel similar às células Tfh pois passam a secretar IFN- γ e IL-21 (mas não IL-4) para estimular as células B.⁽⁸³⁾ Um resumo das atividades entre as iNKTs com as células B na figura 9.



A) Ativação da célula B pela célula iNKT de forma indireta; B) ativação da célula B pela célula iNKT de forma direta.

Fonte: Traduzido e adaptado de Doherty DG, Melo AM, Moreno-Olivera A, Solomos AC. Activation and regulation of B cell responses by invariant natural killer T cells. *Front Immunol.* 2018;9:1360. Figure 2 | Invariant natural killer T (iNKT) cells provide non-cognate and cognate help for antigen-specific B cells; p. 5.⁽⁸³⁾

Figura 9. Meios pelos quais as células iNKT pode ativar as células B

Devido à extensa gama de interações com diferentes células do sistema imune, não surpreende a importância da atividade das células iNKTs na resolução de diversas doenças virais. Uma pesquisa com camundongos deficientes

para células iNKTs demonstrou uma piora na infecção pulmonar pelo vírus da influenza A em relação ao controle e, quando administrado células iNKTs, voltavam a apresentar resposta imunes adequadas e supressão da infecção viral.⁽⁸⁴⁾ Numa outra pesquisa similar com influenza A, camundongos deficientes para iNKTs não apresentavam resposta adequada de células T CD8⁺ e tinham uma mortalidade maior.⁽⁸⁵⁾ Em mais pesquisas com modelo animal analisando os efeitos do vírus da herpes, também foi observado sintomas agravados e resposta imune deficitária em animais sem as células iNKTs.⁽⁸⁶⁾ A mesma tendência também foi observado no caso de infecção pelo vírus respiratório sincicial, no qual animais sem iNKTs apresentavam quadros piores do que os controles.⁽⁸⁷⁾ Pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem suas células iNKTs infectadas,⁽⁸⁸⁾ o que reduz drasticamente o número destas células em circulação,⁽⁸⁹⁾ agravando o quadro da síndrome da imunodeficiência adquirida.

Uma das características das células iNKTs é que elas são estimuladas por um glicolípido chamado α -galactosilceramida (α -GalCer). Este glicolípido é extraído da esponja marinha *A. mauritanus* e foi observado como primeiro ligante das células iNKTs em estudos para tratamentos de câncer.^(90,91) A molécula α -GalCer é um potente ativador das células iNKTs pois quando se liga ao TCR invariante destas células, elas produzem e secretam diversas citocinas. Devido a estas características, este glicolípido é comumente usado para o estudo das capacidades das células iNKTs.⁽⁹²⁾

Foi observado que a administração de α -GalCer em animais infectados com o vírus da influenza A ativou as iNKTs, promoveu uma melhora significativa da doença e a diminuição dos níveis de concentração do vírus nos pulmões.⁽⁹³⁾ Na hepatite B viral, iNKTs ativadas por α -GalCer diretamente inativaram a replicação do vírus e indiretamente ao aumentar a atividade antiviral das células NK.⁽⁹⁴⁾ Há, inclusive, uma melhor resposta imune contra um peptídeo do envelope do HIV quando as iNKTs são ativadas pela α -GalCer.⁽⁹⁵⁾

Entretanto, especificamente no caso da infecção pelo DENV, a literatura é escassa e contraditória. Em Sri Lanka, um estudo observou aumento na circulação das células iNKTs em pacientes com dengue aguda comparada com controles saudáveis e que há uma correlação positiva de títulos de anticorpos IgG contra dengue com a quantidade destas células.⁽⁹⁶⁾ Em outro estudo na Tailândia observou-se uma relação com a ativação de células iNKTs e a severidade de dengue e

os autores sugerem que níveis de ativação destas células contribuem para a patogenicidade da dengue grave. Além disso, em análises *ex vivo*, as células iNKTs de pacientes com dengue aguda tinham uma produção de IFN- γ reduzida após a estimulação com α -GalCer.⁽⁹⁷⁾ Diversos estudos de metabolômica tem observado que a infecção pelo DENV é capaz de alterar a fisiologia do corpo humano. Como consequência, há a variação de níveis de diferentes metabólitos em circulação, inclusive diversos glicolipídios.⁽⁹⁸⁾ Estas alterações podem influenciar a atividade das células iNKTs e, conseqüentemente, o estímulo correto das células B.

Considerando o fato das células iNKTs possuírem a capacidade de estimular as células B produzirem anticorpos com maior capacidade de neutralização contra antígenos, se cria a hipótese de que há uma alteração no perfil imunológico destas células na infecção por dengue, o que influenciaria a capacidade do sistema imune em responder adequadamente à esta patologia.

1.1 Objetivos

1. Estudar os efeitos e alterações da atividade das células iNKT e B durante infecção por dengue, com foco nos perfis celulares e de produção de citocinas envolvidas nas atividades das células iNKTs e células B;
2. Avaliar a frequência e o perfil do estado de ativação das células CD3⁺, incluindo células CD4⁺, CD8⁺ e células iNKTs entre os grupos avaliados;
3. Avaliar a frequência das células B e suas subpopulações em grupos com infecção aguda de dengue e participantes sintomáticos não dengue;
4. Averiguar a presença de correlações positivas ou negativas significativas entre as células de interesse nos grupos estudados.

2 MÉTODOS

2.1 O estudo

Este estudo de coorte foi desenvolvido com com participação voluntária de indivíduos com suspeita de dengue recrutados em tendas de atendimento e hidratação montadas pelo Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) em conjunto com a prefeitura de São Paulo durante um surto de dengue em 2015. Após o atendimento inicial realizado pelos profissionais do HIAE, o estudo intitulado “Epidemiologia e Patogênese na infecção por Arbovírus”.

Foram realizados exames clínicos: teste rápido de dengue, exame de carga viral e tipificação do sorotipo de dengue por PCR, exame de ELISA para detecção de imunoglobulinas contra dengue, hemograma, testes para outras doenças infecciosas. Vários pacientes passaram por uma consulta de retorno nas tendas de atendimento com uma média de 5 dias após o primeiro atendimento com uma nova coleta de amostras de sangue. As amostras de todos os participantes foram processadas e preservadas para os experimentos.

2.2 Casuística

Neste estudo foram utilizadas amostras de indivíduos com sintomas de infecção viral com exames positivos ou negativos para dengue. A inclusão e exclusão de voluntários ocorreu conforme os seguintes critérios.

Critérios de inclusão:

- Idade igual ou maior a 18 anos;
- Indivíduos com sorologia negativa para HIV, HTLV, sífilis, hepatite B, C, chikungunya e zika.

Critérios de exclusão:

- Indivíduos incapazes de ler ou compreender o TCLE;
- Indivíduos que não assinaram o TCLE;
- Menores de 18 anos.

2.3 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa para o qual foram coletadas as amostras de sangue foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do HIAE e registrado pelo identificador CAAE: 55109116.2.0000.0071 e SGPP número 2658-16. Nenhum indivíduo que procurou ajuda nos centros obteve qualquer atendimento diferenciado, independente de participar ou não do projeto de pesquisa. O projeto e a proposta de participação ocorreram apenas após o atendimento pelo qual os pacientes procuraram ter ocorrido. As amostras só foram coletadas após a leitura, preenchimento e assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável.

2.4 Coleta do material

2.4.1 Sangue periférico

Foram coletados 90 mililitros (mL) de sangue periférico através da punção venosa num dos membros superiores dos participantes. A coleta de sangue foi realizada por meio da técnica de coleta a vácuo em tubo contendo EDTA jateado nas paredes internas (concentração final de 1,8mg/mL de sangue). Todo material coletado foi processado em até 24h após a coleta e os produtos extraídos da amostra de sangue coletada foram armazenados no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do HIAE. Do sangue total coletado, foram utilizados 10mL para a realização de exame de hemograma no aparelho XP-300 (Sysmex®, Japão) para prover concentrações e quantidades de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas de cada participante. Para aferir a infecção pelo DENV, RNA foi extraído de 140µL de plasma usando o kit *Qiagen viral RNA kit*® (Qiagen®, EUA). Carga viral foi determinada por PCR em tempo real usando o kit *SuperScript III platinum SYBR green one-step qRT-PCR*® (Invitrogen®, USA) com *primers* para os 4 sorotipos do DENV. Reações e leituras foram feitas pelo equipamento ABI 7300 RT-PCR (Applied Biosystems®, Brasil). Limites de detecção para este exame foram ajustados para 100 cópias/mL.

2.4.2 Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico podem ser separadas para análise como descrito abaixo. Estas células são comumente conhecidas no meio acadêmico pela abreviação em inglês PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

Numa câmara de fluxo estéril, 50mL do sangue coletado foi diluído em 50mL em solução salina balanceada de Hank (HBSS) (GIBCO® - ThermoFisher) e homogeneizado. Esta diluição foi dividida em 3 partes que foram cuidadosamente depositadas sobre 15mL de solução de gradiente de densidade (Ficoll® Paque Plus – Sigma-Aldrich) num tubo de fundo cônico de 50mL, formando duas fases sem que as soluções se misturassem. Os tubos foram centrifugados a 952 de força centrífuga relativa (também conhecida como força G), temperatura ambiente, durante 40 minutos, aceleração de 4 e desaceleração de 0.

Após a centrifugação, há a formação de uma nuvem de células sobre a solução de gradiente de densidade. Estas células são as células mononucleares do sangue periférico (CMSP), mais conhecidas no meio acadêmico pela abreviação inglesa PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Estas foram coletadas com uma pipeta Pasteur estéril para um tubo de fundo cônico de 15mL. Completou-se o volume de 15mL com HBSS no tubo contendo PBMC e foi centrifugado a uma velocidade de 520G, temperatura ambiente, durante 10 minutos, aceleração e desaceleração de 9. Após a centrifugação, há a formação de um *pellet* de células no fundo do tubo, o que permite o descarte do líquido sobrenadante. Depois as células foram homogeneizadas com mais 15mL de HBSS e centrifugadas sob as mesmas condições. Após a segunda lavagem, as células foram incubadas por dois minutos com 3mL de solução de lise de hemácias (Ammonium-Chloride-Potassium ACK Lysing Buffer - GIBCO® - ThermoFisher). Passados dois minutos, foi adicionado 10mL de meio de cultura R-10 (meio RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de tampão HEPES, 1% de Piruvato de Sódio, 1% de Penicilina com Estroptomicina e 1% de L-Glutamina) para a inativar a solução lisante de hemácias. Foi realizado uma nova centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10mL de meio de cultura R-10.

Neste momento, desta nova solução, foi aferido a viabilidade das células. Dez microlitros (μL) foram homogeneizados com 10 μL de corante *Trypan Blue* (Azul de Tripán). A contagem de células viáveis foi feita no aparelho *Countess® II Automated Cell Counter* (ThermoFisher). Uma nova centrifugação a 520 G, temperatura ambiente por 10 minutos e aceleração de 9 foi feita. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a partir da informação de concentração de células viáveis aferida no aparelho de contagem, as células são ressuspensas em meio de cultura próprio para congelamento (meio RPMI com 30% de SFB e 10% de DMSO) num volume para que a nova solução tenha uma concentração de 1×10^7 células/mL. Homogeneizadas na nova concentração no meio de congelamento, as células foram transferidas para criotubos. Estes criotubos ficaram primariamente em um *freezer* a -80°C por 24h, depois foram transferidos para tanques de nitrogênio líquido (temperatura média de -196°C) e ficaram armazenados neste estado até serem utilizados em experimentos.

2.4.3 Soro, plasma e *buffy coat*

Amostra de sangue coletada num tubo com EDTA foi centrifugada por 10 minutos em temperatura ambiente a 952 G. Após a centrifugação, há uma separação dos elementos do sangue sendo o plasma o líquido na fase superior. O plasma foi coletado com pipetas de Pasteur, transferidos para criotubos de 2mL e armazenados em *freezers* a -80°C .

Sangue coletado no tubo com gel separador foi centrifugado por 10 minutos, temperatura ambiente a 952 G. Após a centrifugação, a amostra de sangue estará separada em 3 fases, sendo a primeira o plasma, um líquido semi transparente, e a segunda uma fina camada de células sobre o gel, o *buffy coat*. O plasma foi coletado com uma pipeta Pasteur e transferido para criotubos de 2mL e o *buffy coat* foi coletado e transferido para criotubos de 2mL. Todos os tubos foram armazenados a -80°C .

2.4.4 Descongelamento de PBMC

Criotubos contendo PBMC foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em gelo seco. Os criotubos foram descongelados em banho maria a 36°C enquanto eram levemente agitados. No momento em que o material congelado se desprendia do fundo do criotubo, este era levado a uma câmara de fluxo, adicionado 1mL de meio R-10 e homogeneizado. Em seguida, esta nova solução foi transferida para 9mL de meio R-10 num tubo de fundo cônico de 15mL. Todos tubos de fundo cônico identificados com as amostras foram centrifugados por 10 minutos a 583 G em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada tubo foi descartado e as células foram ressuspensas em 2mL de meio R-10. A partir desta nova suspensão foi aferido a viabilidade das células descongeladas. 10μL foram misturados com 10μL de corante azul de Tripán e a contagem de células viáveis foi feita no aparelho *Countess® II Automated Cell Counter* (ThermoFisher). Depois elas foram lavadas mais uma vez e ressuspensas cada uma em um volume de acordo com suas viabilidades para ter uma concentração final de 3×10^6 células por 100μL.

2.5 Marcação de células e citometria de fluxo

Após o descongelamento das células e ajuste de concentração, 100μL contendo 3×10^6 células foi transferido para uma placa de fundo V com 96 poços e centrifugado a 300g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 180μL de solução de tampão fosfato-salino (PBS) com 1% de SFB (*FACS Buffer*). Esta nova solução contendo as células passaram por outra centrifugação com as mesmas configurações anteriores. Após desprezar o sobrenadante as células foram ressuspensas para ficarem incubadas por 30 minutos com 100μL de *FACS Buffer* contendo os seguintes anticorpos: anti-CD38 em Brilliant Blue 605 (clone HB7, BD Bioscience), anti-CD27 em Alexa Fluor 700 (clone 0323, eBioscience), anti-CD14 em ECD (clone RM052, Beckman Coulter), tretrâmero CD1d em APC (NIH repositório), anti-TCR Vα24 em PE (clone C15, Beckman Coulter), anti-CD3 em Super Bright 702 (clone OKT3 eBioscience), anti-CD8 em PE-Cyanine7 (clone RPA-T8, eBioscience), anti-CD4 em Super Bright 645 (clone RPA-T4, eBioscience), anti-IgD em FITC (clone IA6-2,

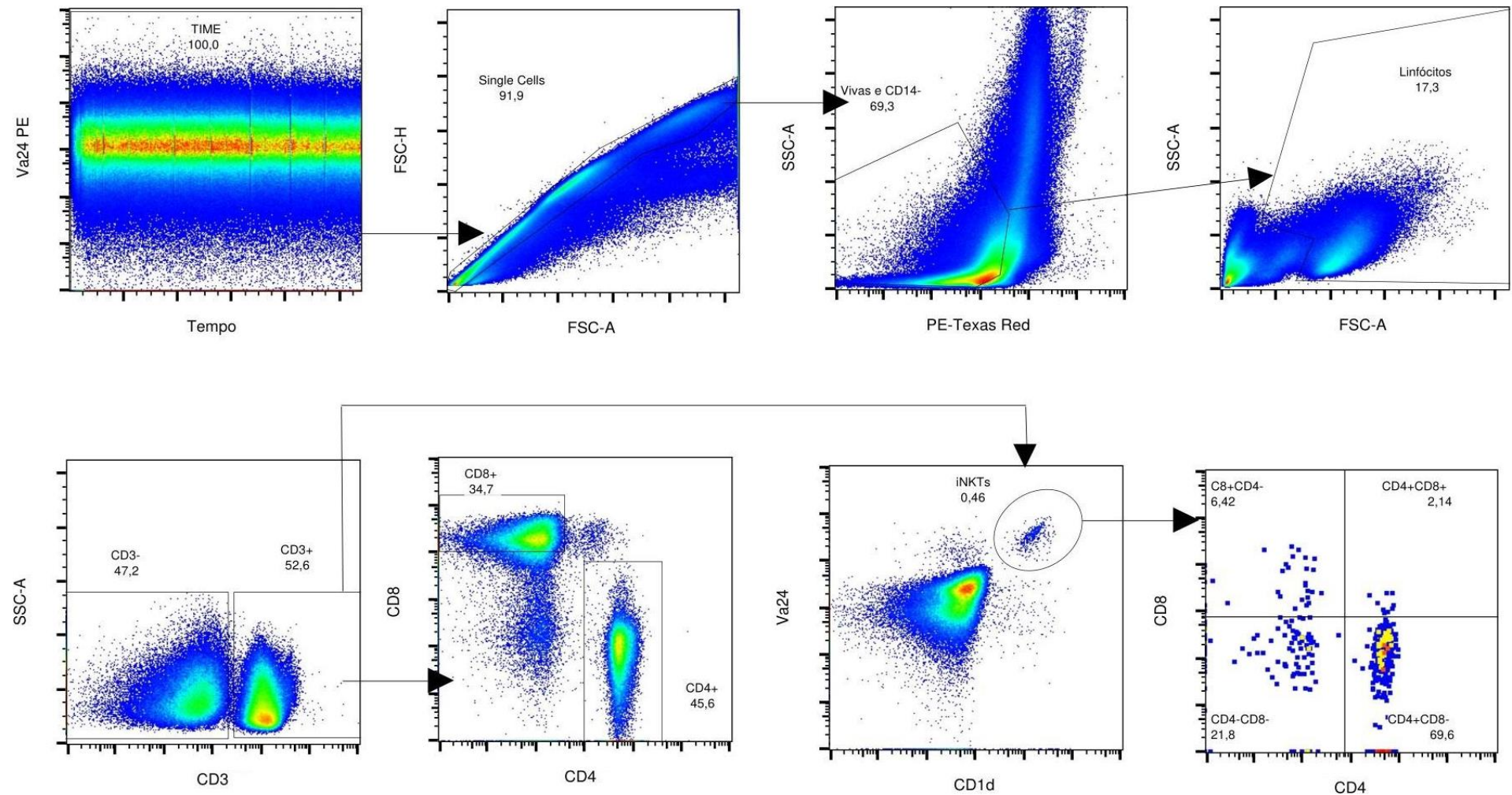
eBioscience), anti-IgM em Brilliant Violet 510 (clone MHM-88, BioLegend) e anti-CD19 em APC-CH7 (clone SJ25C1, BD Bioscience). Para excluir as células mortas, foi usado o marcador de viabilidade LIVE/DEAD *Fixable red dead cell stain kit* (Thermo Fisher) em todas as amostras. Após a incubação, as células foram lavadas e fixadas com PBS com 1% de formol para serem adquiridas por citometria de fluxo.

As amostras foram adquiridas dentro de 24h após a marcação no citômetro Attune NXT® (Thermo Fisher Scientific, EUA) com o *software Attune NxT Flow Cytometer Software* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Previamente à aquisição das amostras, o citômetro de fluxo passou por testes de controle de qualidade para garantir uma leitura correta durante o experimento. Devido à característica de alguns marcadores de superfície não apresentarem clara distinção de positividade ou negatividade na fluorescência, foi utilizada a estratégia de *gates fluorescence minus one* (FMO) para os marcadores de CD38 e CD27. Nesta estratégia, uma amostra foi marcada sem o anticorpo anti-CD38 e outra amostra sem o anticorpo anti-CD27 para a criação de limites de negatividade para estes marcadores, conforme demonstrado nos apêndice 1 e apêndice 2. Após a aquisição das amostras, os dados foram analisados no *software FlowJo® 10.5.3* (BD Biosciences) para a análise dos dados da citometria através dos *gates* de grupos celulares.

Para análise de número absoluto de células, foi utilizado o método de duas plataformas (*dual platform method*), na qual a porcentagem de células de interesse multiplica o número de linfócitos totais obtidos do exame de hemograma.

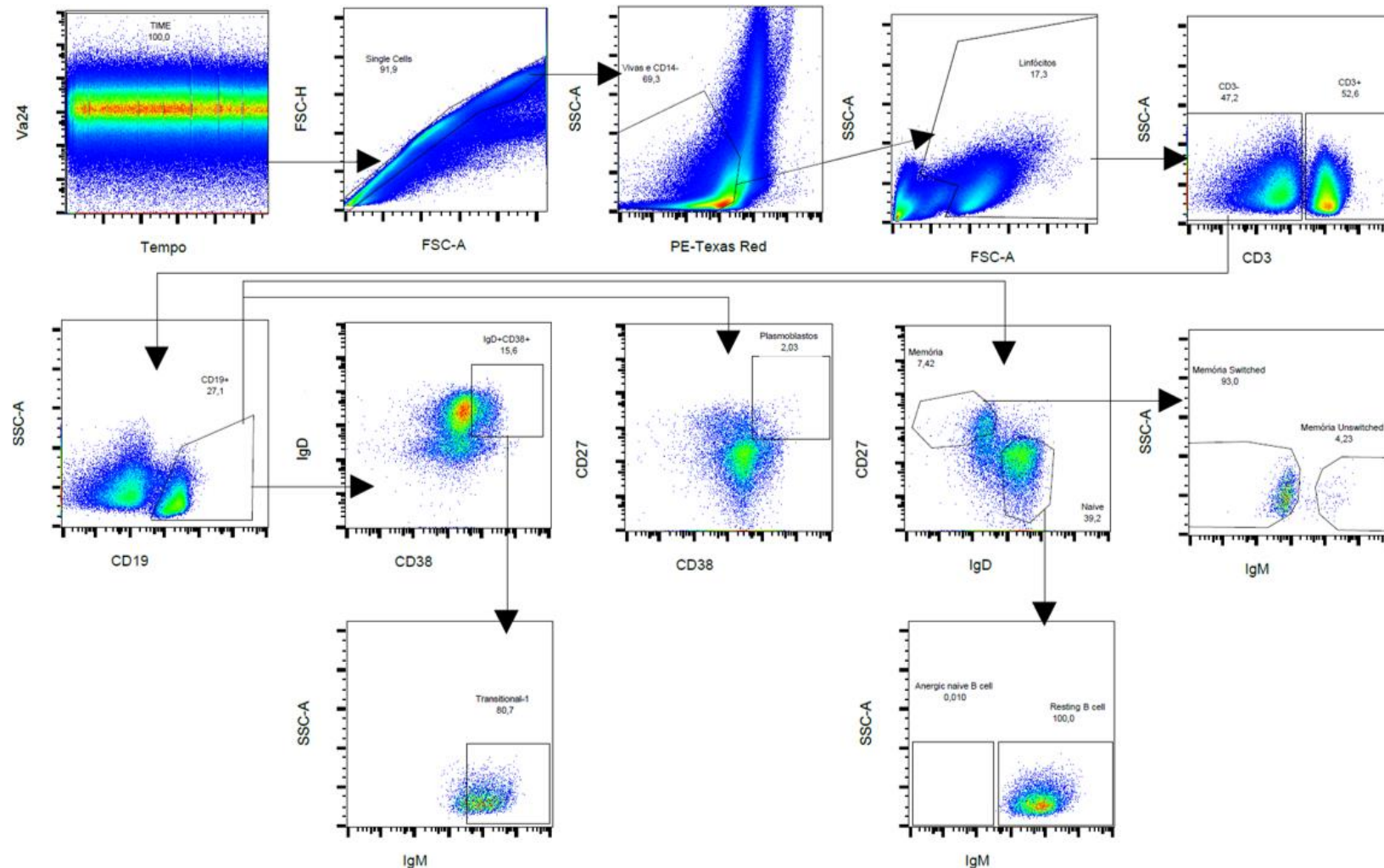
2.6 Estratégia de análise de *gates* para grupos celulares

A estratégia de análise de *gates* utilizada para a análise de linfócitos T em circulação e suas respectivas subpopulações se encontra na figura 10. Para a análise das células B, os *gates* iniciais para tempo, *singlets*, linfócitos, e negatividade para CD14 e LIVE/DEAD® são as mesmas apresentadas na figura 10. A estratégia para os *gates* para a quantificação das células B e suas respectivas subpopulações seguem as características de marcadores descritos na tabela 1 e está representado na figura 11.



Gate de tempo por marcador PE → eventos dentro do *gate* de células únicas FSC-A x FSC-H (*singlets*) → seleção de células negativas para CD14 e LIVE/DEAD® → seleção de linfócitos dos eventos de SSC-A x FSC-A → seleção de linfócitos T CD3⁺ → seleção de linfócitos positivos para CD4⁺, positivo para CD8 em CD4 x CD8. As células iNKTs são selecionadas no cruzamento de Va24 por CD1d e a partir delas positividade para CD4 ou CD8 no cruzamento de CD4 por CD8.

Figura 10. Fluxo de estratégia de *gates* CD3⁺ para análise de citometria de fluxo



Gate de tempo por marcador PE → eventos dentro do gate de células únicas FSC-A x FSC-H (*singlets*) → seleção de células negativas para CD14 e LIVE/DEAD® → seleção de linfócitos dos eventos de SSC-A x FSC-A → seleção de linfócitos T CD3⁻ → seleção de linfócitos CD19⁺ → seleção de células B de memória por CD27 x IgD → seleção de células B de memória *switched* e *unswitched* por positividade de IgM x SSC-A; células B *naïves* por CD27 x IgD → seleção de células *naïves* anérgica e em descanso por positividade de IgM x SSC-A; seleção de células B Transicional por CD38 x IgD → positividade de IgM x SSC-A; seleção de plasmoblastos por CD27 x CD38.

Figura 11. Fluxo de estratégia de *gates* CD3⁻ para análise de citometria de fluxo

2.7 Análise estatística

Os dados gerados na análise de *gates* foram posteriormente realizados no *software* Prism® 8.4.2 (GraphPad). Após a averiguação da distribuição dos pelo teste de Shapiro-Wilk, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparações de grupos e testes de correlação de Spearman. Para todos os testes, o valor de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Os resultados estão apresentados pela mediana e interquartil (IQR) dos valores.

3 RESULTADOS

3.1 Grupos de estudo e suas características

Para este estudo, dois grupos foram estabelecidos: indivíduos com Dengue Aguda (DA, n=33) e indivíduos que apresentavam sintomas, no entanto testaram negativos para dengue. Esse grupo foi chamado de Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND, n=42), nomenclatura de acordo com diversas publicações de coorte com dengue.^(99–101) Após determinação da nomenclatura, foi realizado testes de distribuição paramétrica ou não paramétrica para os dados dos grupos que seriam comparados. Todos os resultados dos testes de Teste de Shapiro-Wilk apresentaram um valor-p menor que 0,05 e, portanto, para os próximos testes comparativos de diferença estatística, foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney.

Não há diferença estatística entre os grupos DA e SND em relação à idade ($p=0,5466$) e aos dias de sintomas ($p=0,3005$). A distribuição de sexo entre os dois grupos é próxima, com 52% participantes do sexo feminino no Grupo DA e 59% de participantes do sexo feminino no Grupo SND. Os exames laboratoriais de teste de dengue foram negativos para a presença de NS1+, carga viral, IgM e IgG para todos os participantes do Grupo SND. Para o Grupo DA, todos participantes apresentavam positividade para pelo menos 2 ou mais exames, exceto para exames de IgG que eram todos negativos. Todos os pacientes do Grupo DA estavam infectados com o sorotipo DENV1. Estes dados estão sumarizados na tabela 2.

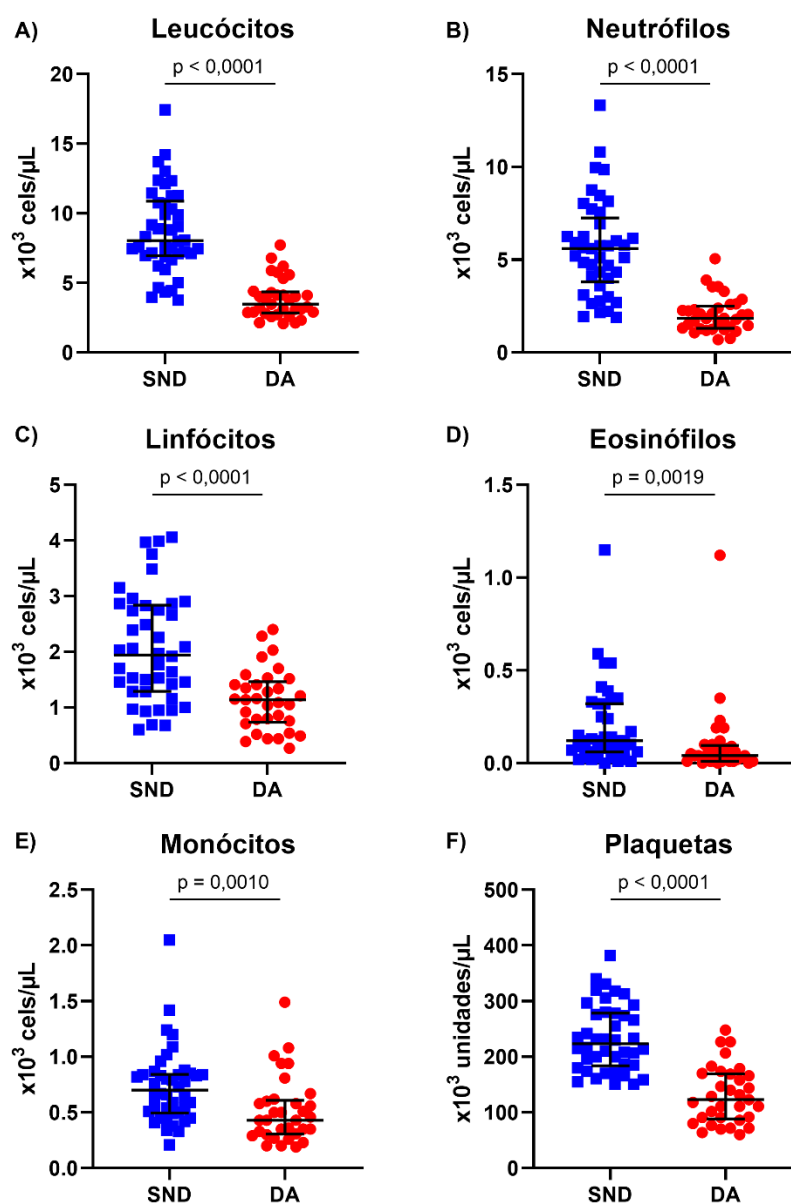
3.2 Dados laboratoriais

O teste de hemograma revela que leucócitos totais (Figura 12A) apresenta diferença estatística significativa com um menor número destas células no Grupo DA em relação ao SND ($p<0,0001$). Mais especificamente, neste exame, foram observados menor frequência de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas (Figura 12B-D) no Grupo DA em relação ao SND.

Tabela 2. Características de idade, sexo e resultados laboratoriais para cada grupo

Nº de participantes		Sexo		Idade (anos) Mediana e interquartis	NS1+	Carga viral detectada	ELISA IgM+	ELISA IgG+	Dias com sintomas Mediana e interquartis
		Masculino n (%)	Feminino n (%)						
DA	33	16 (48)	17 (52)	40 (26-50,5)	27	33 (DENV1)	22	0	6 (4-7)
SND	42	17 (41)	25 (59)	42 (27,75-56,25)	0	0	0	0	4 (3-8)
				p=0,5466					
									p=0,3005

DA: Dengue Aguda; SND: Grupo Sintomático Não Dengue; NS1: proteína *non-structural* do DENV; ELISA: *enzyme-linked immunoassay*. Teste de Mann Whitney. *Há diferença estatística significativa com valor- $p < 0,05$.



A) Box-plot para a quantidade de células de milhões de leucócitos por microlitro (μL) de sangue demonstrando a diferença ($p < 0,0001$) entre os grupos Dengue Aguda (DA) e Grupo Sintomático Não Dengue (SND), no qual DA apresenta mediana de $3,48 \times 10^6$ células/ μL (interquartil 2,84–4,36) e SND apresenta mediana de $8,035 \times 10^6$ células/ μL (6,95–10,88). **B)** Box-plot para a diferença na quantidade de milhares de neutrófilos por μL de sangue ($p < 0,0001$), mediana do Grupo DA é de $1,84 \times 10^3$ células/ μL (1,3–2,49) e do Grupo SND $5,61 \times 10^3$ células/ μL (3,81–7,255). **C)** Box-plot para a diferença entre grupos ($p < 0,0001$) na quantidade de milhares de linfócitos por μL de sangue, mediana de Grupo DA $1,14 \times 10^3$ células/ μL (0,735–1,465), mediana do SND $1,945 \times 10^3$ células/ μL (1,29–2,84). **D)** Box-plot para a diferença entre grupos ($p = 0,0019$) na quantidade de milhares de eosinófilos por μL de sangue, mediana do Grupo DA $0,04 \times 10^3$ células/ μL (0,01–0,095), mediana do Grupo SND $0,12 \times 10^3$ células/ μL (0,06–0,32). **E)** Box-plot mostrando a diferença ($p = 0,0010$) entre a quantidade milhares de células por μL de sangue, mediana DA $0,43 \times 10^3$ células/ μL (0,305–0,61) e mediana SND 0,7 (0,4975–0,8425). **F)** Box-plot mostrando a diferença ($p < 0,0001$) entre a quantidade milhares de unidades por μL de sangue, mediana DA 123×10^3 unidades/ μL (88,5–169,5) e mediana Grupo SND $223,5 \times 10^3$. DA $n = 33$; SND $n = 42$; Porcentagem de células obtidas através de citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; considera-se que há diferença estatística quando o valor- $p < 0,05$.

Figura 12. Resultados de hemograma entre os grupos de Dengue Aguda e Sintomáticos Não Dengue

A mediana e interquartis dos valores de todos os exames do hemograma dos participantes dos dois grupos se encontram na tabela 3. Não foi observado diferença entre os grupos para as análises de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e basófilos.

Tabela 3. Exame de hemograma

	DA (n=33)	SND (n=42)	Valor-p
Eritrócitos (10^3 células/ μ L)	4,98 (4,775-4,98)	4,81 (4,578-5,265)	0,1308
Hemoglobina (g/dL)	14,7 (13,95-15,7)	14,7 (13,8-15,4)	0,6768
Hematócrito (%)	42,7 (40,5-44,45)	42,15 (39,8-44,15)	0,5900
Leucócitos (10^3 células/ μ L)	3,48 (2,84-4,36)	8,035 (6,958-10,88)	<0,0001*
Neutrófilos (10^3 células/ μ L)	1,84 (1,3-2,49)	5,61 (3,81-7,255)	<0,0001*
Eosinófilos (10^3 células/ μ L)	0,04 (0,01-0,095)	0,12 (0,06-0,32)	0,0019*
Basófilos (10^3 células/ μ L)	0,02 (0,01-0,06)	0,03 (0,01-0,05)	0,2587
Linfócitos (10^3 células/ μ L)	1,14 (0,735-1,465)	1,945 (1,29-2,84)	<0,0001*
Monócitos (10^3 células/ μ L)	0,43 (0,305-0,61)	0,7 (0,4975-0,8425)	0,0010*
Plaquetas (10^3 unidades/ μ L)	123 (88,5-169,5)	223,5 (183,8-278,5)	<0,0001*

Valores apresentados em mediana e interquartis para os grupos Dengue Aguda (DA) e Sintomático Não Dengue (SND). Teste de Mann Whitney. *Há diferença estatística significativa com valor-p<0,05.

O questionário sobre sintomas revela a maioria dos participantes apresentavam febre (94% Grupo DA e 67% no SND), dores musculares (82% no Grupo DA e 93% no SND) e dor de cabeça (76% no Grupo DA e 67% no SND). Não houve registro de sintomas mais graves ou a necessidade de internação de nenhum participante. Os sintomas e porcentagens em relação ao número de participantes para cada grupo se encontra na tabela 4.

Tabela 4. Sintomas dos participantes

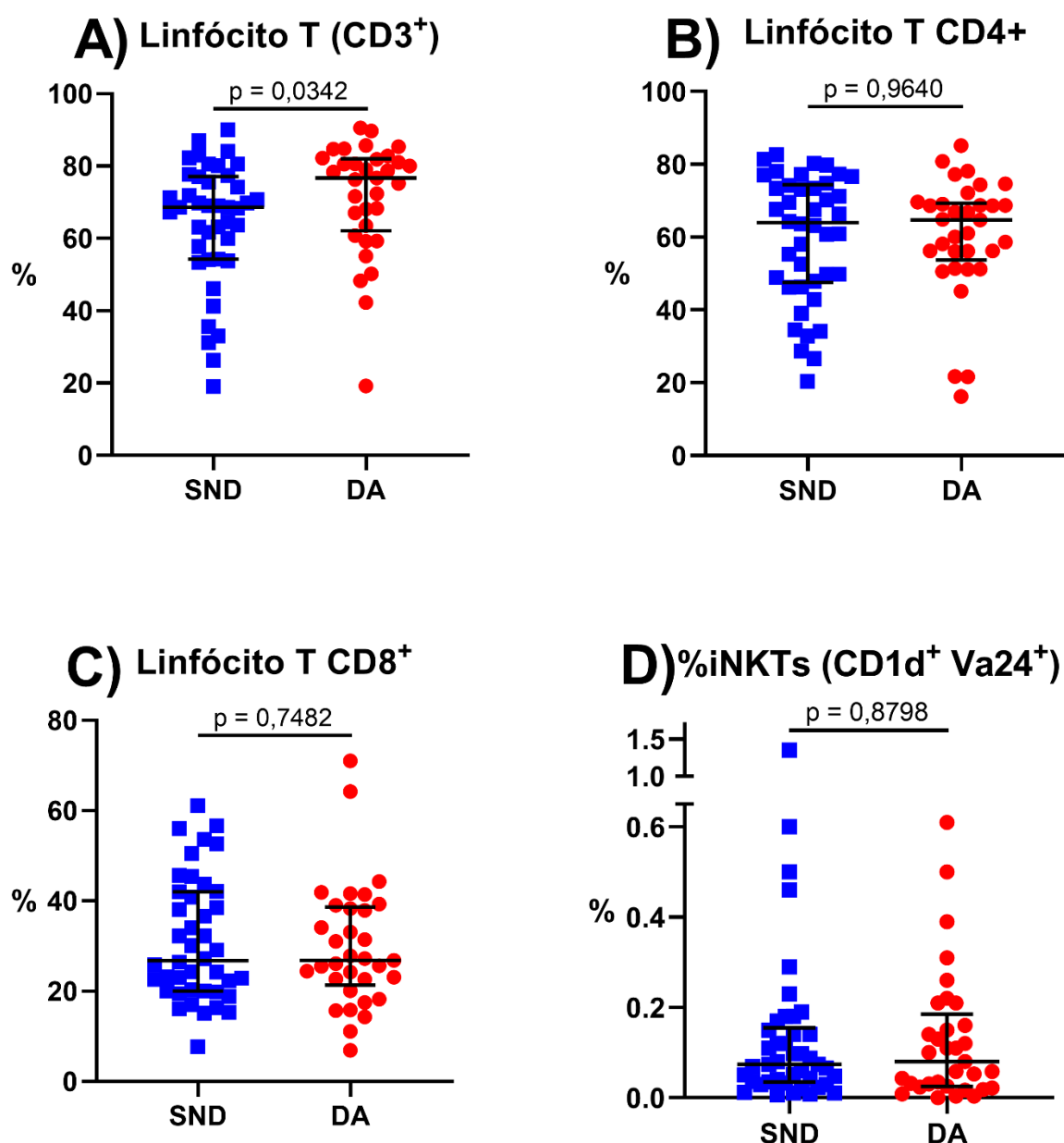
Sintomas	Participantes	
	DA n(%)	SND n(%)
Febre	31 (94)	28 (67)
Dor muscular	27 (82)	39 (93)
Dor de cabeça	25 (76)	28 (67)
Náusea	22 (67)	19 (45)
Dor atrás dos olhos	19 (58)	21 (50)
Calafrios	18 (55)	22 (52)
Dores nas articulações	13 (39)	20 (48)
Letargia	12 (36)	5 (12)
Dor abdominal	12 (36)	19 (45)
Tosse	9 (27)	16 (38)
Vômito	9 (27)	9 (21)
Coriza recente	8 (24)	12 (29)
Diarreia	5 (15)	10 (24)
Dor de garganta	5 (15)	12 (29)
Erupção cutânea	4 (12)	1 (2)
Sangramento	3 (9)	5 (12)

DA: Dengue Aguda, n=33. SND: Sintomático Não Dengue, n=42.

3.3 Comparações de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células iNKTs entre os grupos

O primeiro passo realizado após adquirir PBMC por citometria de fluxo foi avaliar a porcentagem dos linfócitos T e suas subpopulações. A estratégia de *gates* utilizado para analisar PBMC no programa *FlowJo* já foi descrita na figura 10. A partir das células viáveis e CD14 negativas, foi observado que há diferença significativa ($p=0,0342$) entre a porcentagem de células T CD3⁺ entre os grupos DA e SND (Figura 13A). Neste caso, há maior porcentagem de células T CD3⁺ em circulação no Grupo DA com mediana de 76,70% (interquartis 54,25–71,10), enquanto que a mediana do Grupo SND é de 68,60% (interquartis 62,15–82,05).

A partir do *gate* de linfócitos T CD3⁺ foi feito a análise da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e não foi observada diferença significativa entre os grupos DA e SND para as porcentagens de linfócitos T CD4⁺ (Figura 13B; $p=0,9640$) e para as porcentagens de linfócitos T CD8⁺ (Figura 13C; $p=0,7482$). Também a partir do *gate* de linfócitos T CD3⁺, a análise de células iNKTs mostrou não haver diferença na porcentagem destas células entre os grupos DA e SND (Figura 13D; $p=0,8798$).



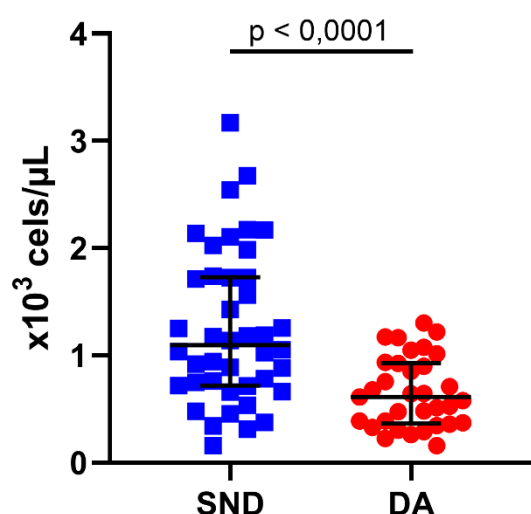
A) Box-plot com diferença estatística ($p=0,0342$) na porcentagem de linfócitos T (células CD3 positivas a partir do *gate* de CD14 negativas) do sangue periférico de pacientes do Grupo Dengue Aguda (DA) com mediana de 76,70% (interquartis 54,25–71,10) e Grupo Sintomático Não Dengue (SND) com mediana de 68,60% (interquartis 62,15–82,05); **B)** Box-plot sem diferença ($p=0,9640$) entre porcentagem de linfócitos T CD4⁺ dentro do *gate* de linfócitos T entre o Grupo DA (mediana 64,70%, interquartis 53,70–69,30) e o Grupo SND (mediana 63,95%, 47,50–74,35). **C)** Box-plot com as porcentagens de linfócitos T CD8⁺ a partir do *gate* de linfócitos T para o Grupo DA (mediana 26,80%, 21,35–38,65) e Grupo SND (mediana 26,80%, 20,00–42,03), sem diferença estatística ($p=0,7482$). **D)** Box-plot de porcentagem de iNKTs a partir do *gate* de linfócitos T CD3⁺ para os grupos DA (mediana 0,080%, 0,024–0,185) e SND (mediana 0,0740%, 0,0345–0,1550), sem diferença significativa ($p=0,8798$). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas através de citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; considera-se que há diferença estatística quando o valor- $p < 0,05$.

Figura 13. Porcentagem de linfócitos T e seus respectivos subpopulações

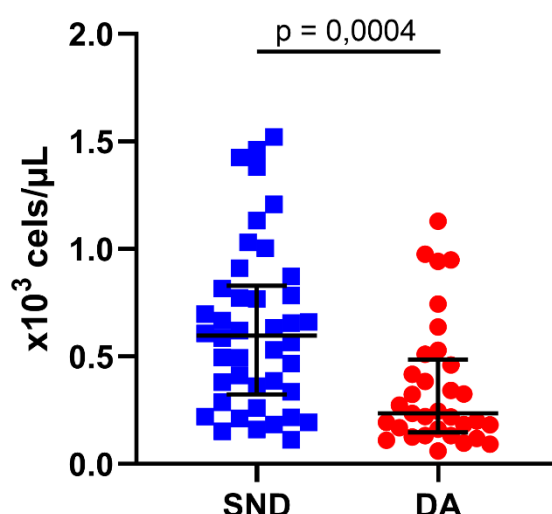
Além das análises de porcentagem, foram feitas análises de números absolutos de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Foi observado que a mediana de 10^3 células

por milímetro cúbico para os linfócitos T CD4⁺ observado no Grupo DA foi de 0,6126 (interquartis 0,3638 - 0,9294), um valor significativamente menor do que a mediana de 1,729 (interquartis 0,7185 - 1,729) do Grupo SND (Figura 14 A). O mesmo efeito foi observado para a análise de linfócitos T CD8⁺ entre os grupos. A mediana de 0,2356 x 10³ células por milímetro cúbico (interquartis 0,1478 - 0,4862) de células T CD8⁺ do Grupo DA é significativamente menor que a mediana de 0,5967 x 10³ células por milímetro cúbico (interquartis 0,3239 - 0,8298) do Grupo SND (Figura 14 B).

A) Linfócito T CD4⁺ totais



B) Linfócito T CD8⁺ totais



A) Box-plot com diferença significativa ($p < 0,0001$) entre a quantidade absoluta de milhares de células T CD4⁺ por milímetro cúbico de sangue dos grupos SND (mediana 1,729, interquartis 0,7185 - 1,729) e DA (mediana 0,6126, interquartis 0,3638 - 0,9294). **B)** Box-plot de número absoluto de 10³ células T CD8⁺ por milímetro cúbico de sangue para os grupos DA (mediana 0,080%, 0,024–0,185) e SND (mediana 0,0740%, 0,0345–0,1550), sem diferença significativa ($p = 0,8798$) com diferença significativa ($p = 0,0352$) entre as porcentagens de linfócitos T que expressam CD38 dos grupos DA (mediana 0,5967, interquartis 0,3239 - 0,8298) e SND (mediana de 4,7%, 2,163–19,53). DA $n = 33$; SND $n = 42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; diferença estatística quando $p < 0,05$.

Figura 14. Análise comparativa de quantidade absoluta de células T CD4⁺ e CD8⁺ entre os grupos Dengue Aguda e Grupo Sintomáticos Não Dengue

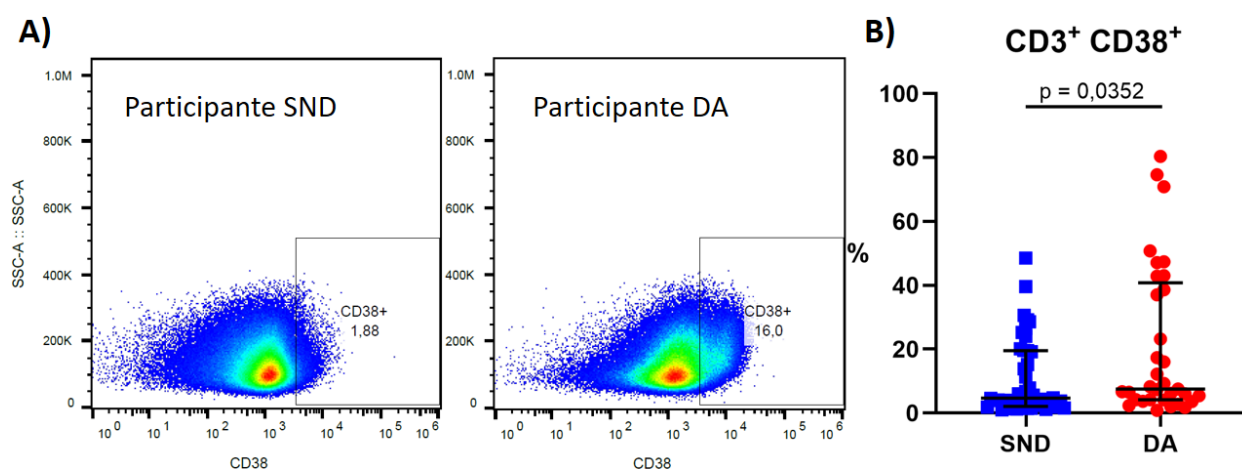
3.4 Ativação celular pela expressão de CD38

A molécula transmembranária CD38 é uma proteína presente em várias células do sistema imune humano. Na análise de linfócitos T maduros por citometria de fluxo, sua maior presença caracteriza a ativação celular.

3.4.1 Linfócitos T

Após observar que o Grupo DA possui maior porcentagem de linfócitos T em circulação, o próximo passo realizado foi averiguar se havia diferenças no estado de ativação destas células. O *gate* de positividade de CD38 foi montado no cruzamento da expressão de CD38 por SSC-A a partir do *gate* de CD3⁺. Entretanto, como não há uma clara definição de separação de populações com maior expressão de CD38, foi utilizado a estratégia FMO (Apêndice 1A).

A estratégia de *gates* iniciais continua a mesma, conforme demonstrado na figura 10. A partir do *gate* de linfócitos T (CD3⁺), foi feito o cruzamento de expressão de CD38 por SSC-A já com um *gate* de positividade de CD38 pré-determinada por FMO (Figura 15A). Foi observado que os pacientes do Grupo DA possuíam os linfócitos T num maior estado de ativação (mediana 7,58%, interquartis 4,175–40,75) comparado aos pacientes do Grupo SND (mediana 4,7%, 2,163–19,53). A figura 15B destaca esta diferença significativa ($p=0,0352$).

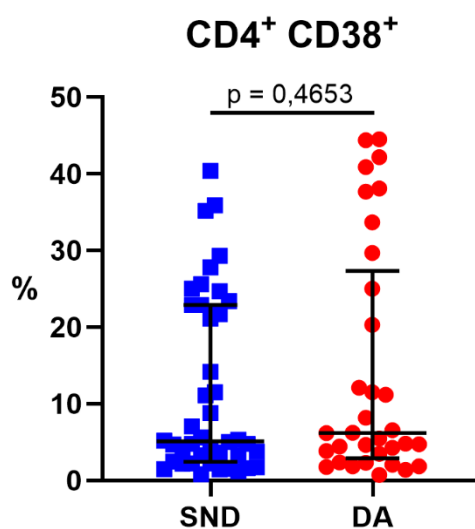


A) Dot-plot de eventos registrado por SSC-A x CD38 com *gate* de positividade de T expressando CD38 em sua superfície de pacientes do Grupo Dengue Aguda (DA) e pacientes do Grupo Sintomático Não Dengue (SND). **B)** Box-plot com diferença significativa ($p=0,0352$) entre as porcentagens de linfócitos T que expressam CD38 dos grupos DA (mediana 7,58%, interquartis 4,175–40,75) e SND (mediana de 4,7%, 2,163–19,53). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; diferença estatística quando $p<0,05$.

Figura 15. Positividade de CD38 em linfócitos T CD3⁺ entre os grupos Dengue Aguda e Grupo Sintomáticos Não Dengue

3.4.2 Linfócitos T CD4⁺

O próximo passo foi averiguar quais subpopulações de linfócitos T que poderiam estar ativadas. Seguindo os mesmos princípios do item 3.4.1 e estratégia de *gates* conforme a figura 10, foi feito um *gate* para CD38 pré determinada pela estratégia FMO (Apêndice 1B) no cruzamento de expressão de CD38 x SSCA a partir do *gate* de CD4⁺CD8⁻. Os dados de citometria de fluxo revelam que não há uma maior expressão de marcadores de CD38 na superfície dos linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos do Grupo DA comparado aos indivíduos do Grupo SND ($p=0,0007$), conforme demonstrado na figura 16.

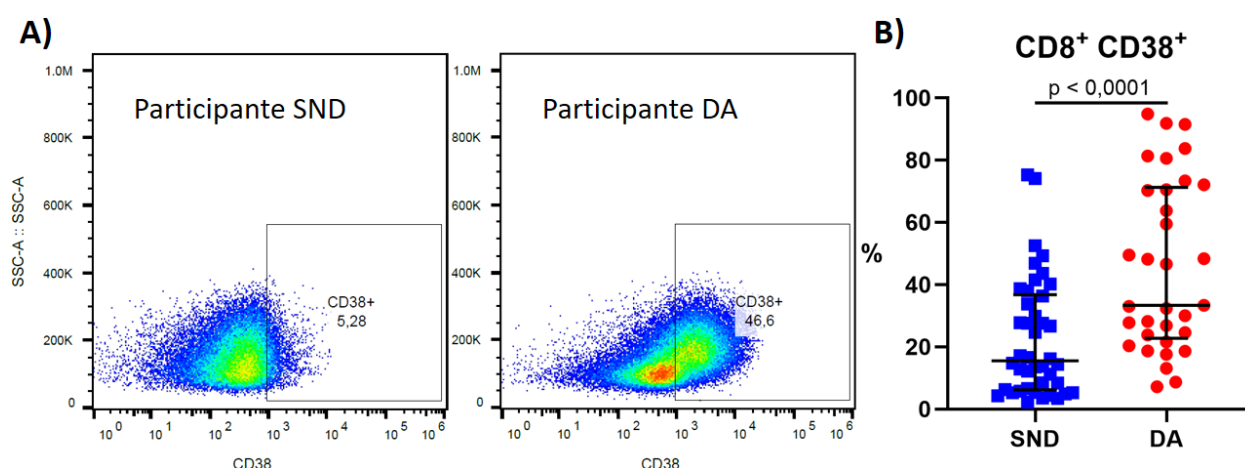


Box-plot demonstrando que não há diferença significativa ($p=0,4653$) entre as porcentagens de linfócitos T CD4⁺ que expressam CD38 nos pacientes dos grupos DA (mediana 6,17%, interquartis de 2,915–27,35) e SND (mediana de 5,090%, 2,425–22,90). Dengue Aguda $n=33$; Grupo Sintomáticos Não Dengue $n=42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney para diferença significativa quando $p<0,05$.

Figura 16. Positividade de CD38 em linfócitos T CD4⁺ dos participantes

3.4.3 Linfócitos T CD8⁺ ativados

Para averiguar a ativação das células T CD8⁺, foi novamente utilizado a estratégia de *gates* FMO (Figura 10 e Apêndice 1C). A positividade de expressão de CD38 foi feita a partir do *gate* CD8⁺CD4⁻ e é possível observar por meio do cruzamento da expressão de CD38 por SSC-A (Figura 17A). A análise da porcentagem de linfócitos T CD8⁺ dos pacientes do Grupo DA (mediana 33,4%, interquartis 22,75–71,30) estavam significativamente mais ativados ($p < 0,0001$) do que os linfócitos T CD8⁺ dos participantes SND (mediana 15,50%, interquartis 6,183–36,80), conforme observado na figura 17B.



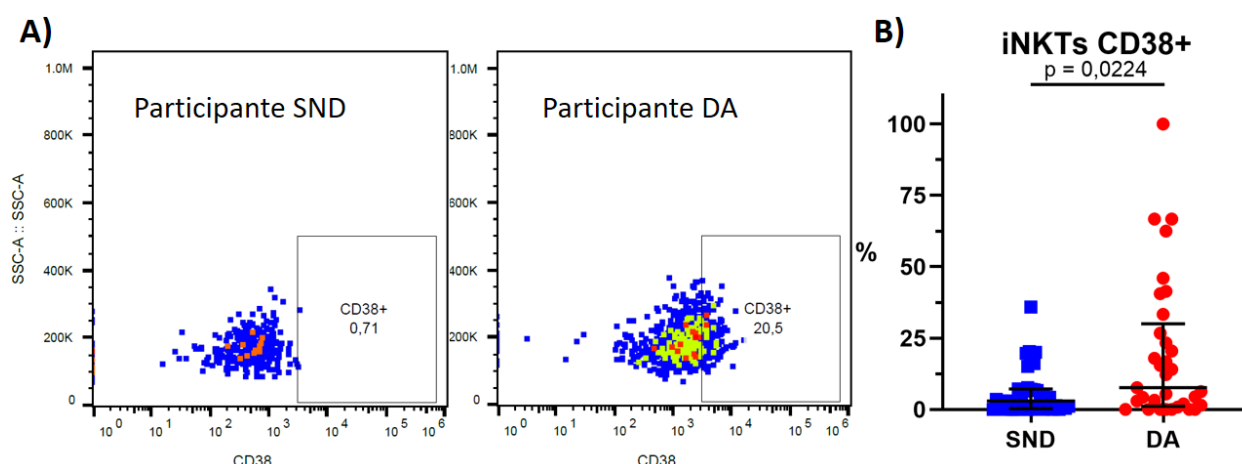
A) Dot-plot de eventos SSC-AxCD38 de linfócitos T CD8⁺ de pacientes do Grupo Dengue Aguda (DA) e pacientes do Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND) com *gate* de positividade para CD38 pré-determinada por FMO. **B)** Box-plot com diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as porcentagens de linfócitos T CD8⁺ que expressam CD38 nos pacientes do Grupo DA (mediana 33,40%, interquartis de 22,75–71,30) e SND (mediana de 15,50%, 6,183–36,80). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas através de citometria de fluxo; teste de Mann Whitney para averiguar se há diferenças estatística. Diferença é considerada significativa quando $p < 0,005$.

Figura 17. Positividade de CD38 em linfócitos T CD8⁺ dos participantes

3.4.4 Ativação das células iNKTs

A próxima avaliação foi em relação ao estado de ativação das células iNKTs por meio da expressão da moléculas de superfície CD38⁺. Seguindo a mesma estratégia de *gates* e FMO (Apêndice 1D), observa-se que estas células demonstravam maior expressão de CD38 em sua superfície dentre os pacientes do Grupo DA em relação aos participantes SND (Figura 18A). A análise estatística revela

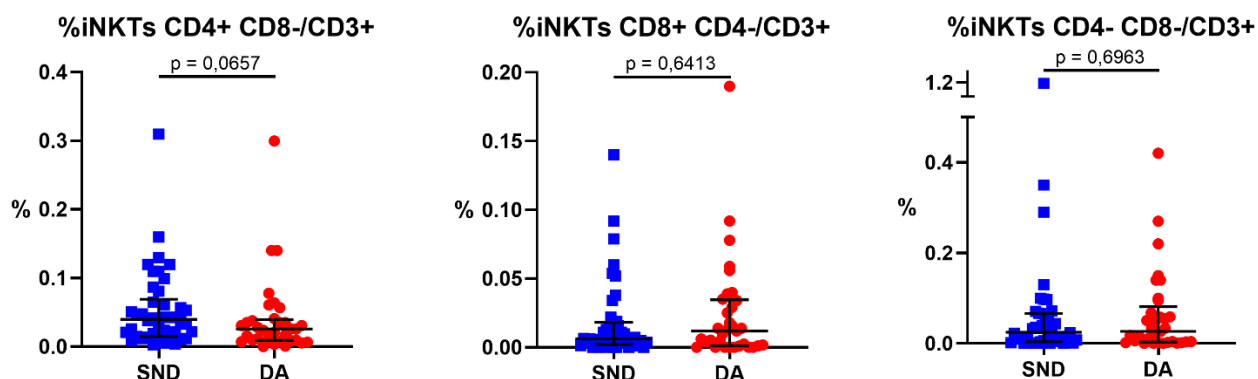
que as células iNKTs estão significativamente mais ativadas dentre os pacientes do Grupo DA do que os pacientes SND, conforme observado na figura 18B.



A) Contour-plot de eventos SSC-AxCD38 a partir do gate de iNKTs de pacientes do Grupo Dengue Aguda (DA) e pacientes do Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND) com gate de positividade para CD38 pré-determinada por FMO. **B)** Box-plot com diferença significativa ($p=0,0224$) entre as porcentagens de células iNKT que expressam CD38 nos pacientes dos grupos DA (mediana 2,95%, interquartis de 0,31–7,16) e SND (mediana de 7,69%, interquartis 1,19–30,00). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney para diferença significativa quando $p<0,05$. **Figura 18.** Positividade de CD38 em células iNKTs dos participantes

3.4.5 Ativação das subpopulações de células iNKTs

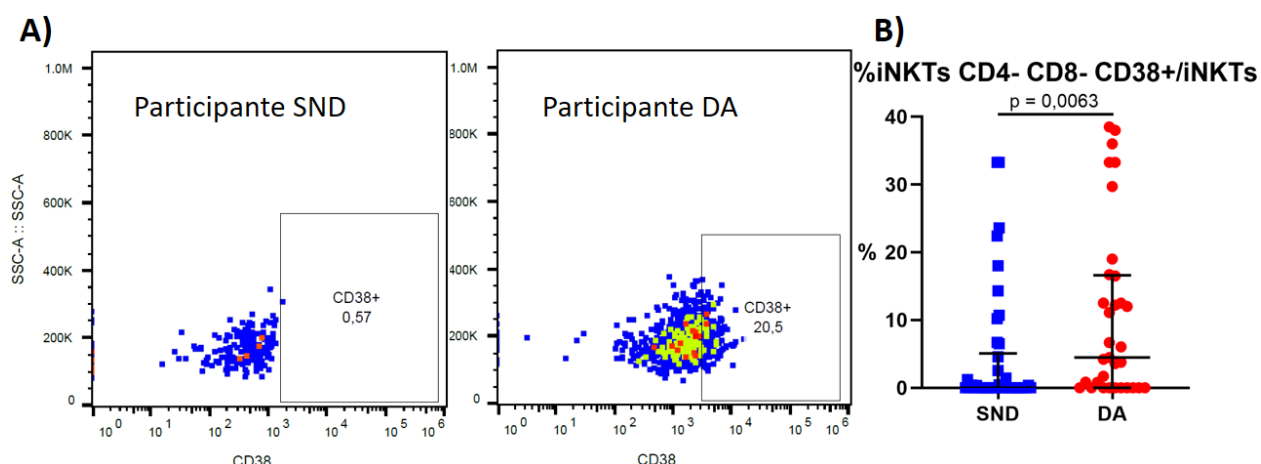
As células iNKTs também podem ser subdividas e avaliadas conforme expressões de CD4 e CD8 em sua superfície, pois cada uma destas subpopulações apresentam diferentes comportamentos na sinalização do sistema imune. Não foi averiguado diferenças significativas entre os dois grupos nas porcentagens das supopulações de células iNKTs que expressam CD4⁺ (Figura 19A), CD8⁺ (Figura 19B) e na subpopulação dupla negativa (DN) na expressão de CD4 e CD8 em relação à população de células que expressam CD3⁺ (Figura 19C).



A) *Box-plot* sem diferença estatística ($p=0,0657$) na porcentagem de células iNKTs que expressam CD4 em sua superfície em relação às células CD3⁺ do sangue periférico de pacientes do Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND) com mediana de 0,04% (interquartis 0,01475–0,069) e Grupo Dengue Aguda (DA) com mediana de 0,026% (interquartis 0,009195–0,0395). **B)** *Box-plot* sem diferença ($p=0,6413$) entre porcentagem de células iNKTs que expressam apenas CD8⁺ dentro do *gate* de linfócitos T (CD3⁺) entre o Grupo SND (mediana 0,0063%, interquartis 0,0021–0,0183) e o Grupo DA (mediana 0,012%, 0,00103–0,0345). **C)** *Box-plot* com as porcentagens da subpopulação de células iNKTs duplo negativas na expressão das moléculas CD4 e CD8 a partir do *gate* de linfócitos T (CD3⁺) para o Grupo SND (mediana 0,025%, 0,003578–0,06625) e Grupo DA (mediana 0,027%, 0,003–0,0815), sem diferença estatística ($p=0,6963$). DA n=33; SND n=42; porcentagem de células obtidas através de citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; considera-se que há diferença estatística quando o valor- $p < 0,05$.

Figura 19. Porcentagem de subpopulações de células iNKTs expressando CD4 e CD8 em relação à população de células CD3⁺

Enquanto ao avaliar a expressão da molécula CD38 na superfícies destas subpopulações celulares não foi observado diferença significativa entre os grupos DA e SND para as iNKTs que expressam CD4 ou CD8, foi observado maior expressão de CD38 por parte das células iNKTs DN para CD8 e CD4 pelo Grupo DA em relação ao SND (Figura 20A). A estratégia de *gates*, novamente, foi realizada por meio da FMO para a expressão de CD38⁺ (Apêndice 2). Esta maior expressão de CD38 é estatisticamente significativa ($p=0,0063$; Figura 20B) em relação à população de células iNKTs.

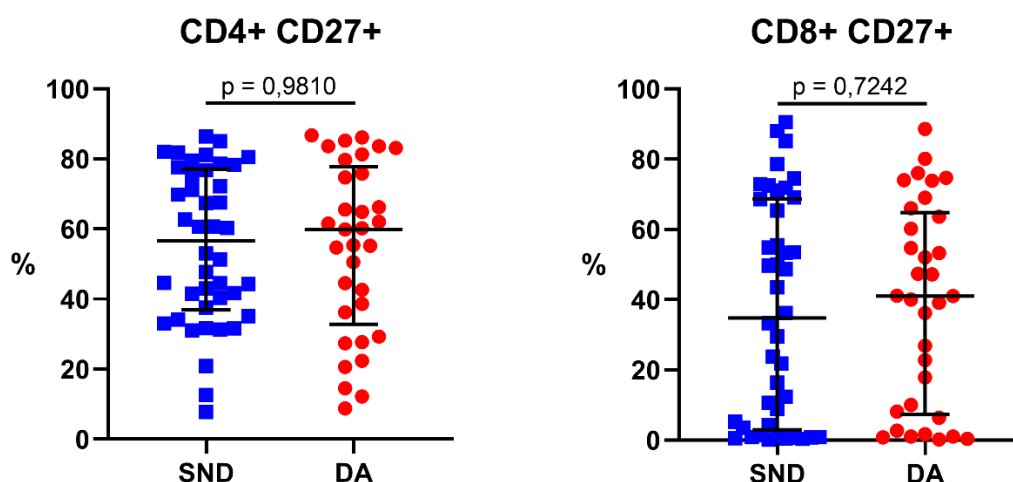


A) Dot-plot de eventos registrado por SSC-A x CD38 com *gate* de positividade (determinada por FMO) de células iNKTs duplo negativas para CD4 e CD8 de T expressando CD38 em sua superfície de pacientes do Grupo Dengue Aguda (DA) e pacientes do Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND). **B)** Box-plot com diferença significativa ($p=0,0063$) entre as porcentagens de células iNKTs DN para CD4 e CD8 expressando CD38 em sua superfície em relação à frequência de células iNKTs totais dos participantes SND (mediana 00,00%, interquartis 0,000–5,070) e DA (mediana de 4,47%, 0,000–16,60). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; diferença estatística quando $p<0,05$.

Figura 20. Expressão de CD38 pela subpopulação de iNKT duplo negativa para CD4 e CD8

3.5 Linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ não apresentam diferença na expressão de CD27

A molécula CD27 é expressada na maioria das células T do sangue periférico e pertence à família de receptores das citocinas TNF. A ativação das células T induz o aumento da expressão de CD27 (determinado por FMO, Apêndice 3) na superfície destas células. Entretanto não foi observado nenhuma diferença estatística entre os grupos DA e SND ao avaliar a expressão de CD27 por células T CD4⁺ ($p=0,9810$) e por células T CD8⁺ ($p=0,7242$), conforme observado pelos *box-plot* da figura 21.



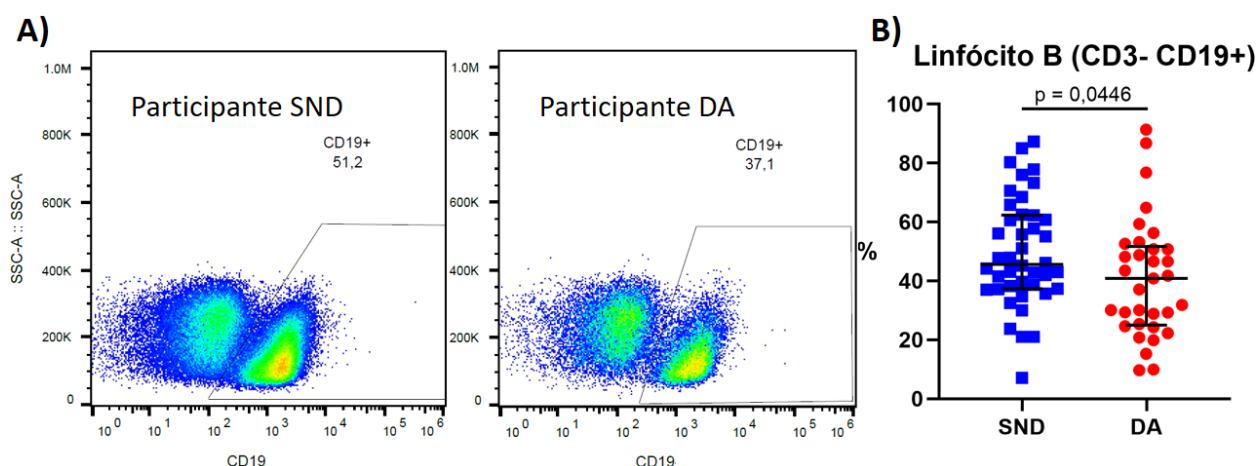
A) Box-plot sem diferença estatisticamente significativa para a expressão de linfócitos T CD4⁺ ($p=0,9810$) entre o Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND) (mediana 56,65% interquartis 36,90–77,00) e o Grupo Dengue Aguda (DA) (mediana 59,90% interquartis 32,75–77,75%). **B)** Box-plot comparativo entre os grupos SND (mediana 34,75%, interquartis 2,995–68,73) e DA (mediana 41,00%, interquartis 7,28–64,80) que demonstra não haver diferença significativa ($p=0,7242$). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; diferença estatística quando $p<0,05$. **Figura 21.** Positividade de CD27 em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ entre os grupos avaliados

3.6 Análise de linfócitos B

Após a avaliação dos linfócitos T e suas subpopulações, o próximo passo foi a avaliação dos linfócitos B em circulação e seus respectivos subtipos celulares de acordo com as características de marcadores apresentados na tabela 1. Para tal, utilizou-se da citometria de fluxo e as estratégias de *gates* apresentados na figura 11. Para as estratégias de *gates* que envolvem a avaliação de maior expressão das proteínas CD38 e CD27, foi utilizado a estratégia de *gates* FMO (Apêndice 4) para previamente determinar os limites de positividade de expressão destas moléculas.

3.6.1 Linfócitos B (CD3⁻ CD19⁺)

De acordo com as análises, foi observado diferença estatística significativa entre os grupos DA e SND ($p=0,0446$; Figura 22) de células CD19⁺ em relação às células CD3⁻, na qual o Grupo SND apresenta mediana maior (45,65%, interquartis 37,35–62,35) comparada à mediana do Grupo DA (40,90%, interquartis 25,00–51,70), conforme demonstrado na figura 22B.



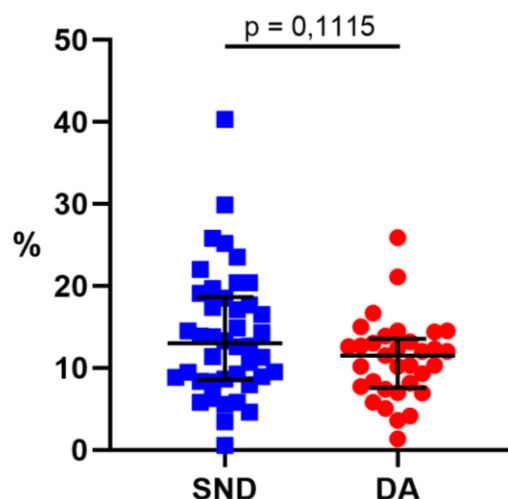
A) Dot-plot de eventos registrado por SSC-A x CD19 com *gates* de positividade para CD19 em relação às células CD3⁻ de pacientes do Grupo Dengue Aguda (DA) e pacientes do Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND). **B)** Box-plot com diferença significativa ($p=0,0446$) entre as porcentagens de células B em relação à frequência de células CD3⁻ totais dos participantes SND (mediana 45,65%, interquartis 37,35–62,35) e DA (mediana 40,90%, interquartis 25,00–51,70). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; diferença estatística quando $p<0,05$.

Figura 22. Porcentagem de células B (CD19⁺) em relação à população de células CD3⁻

3.6.2 Células B de memória e subpopulações *switched* e *unswitched*

Dentro da população dos linfócitos B, foi analisada a porcentagem da população de células B de memória identificadas pelas marcações de superfície CD27⁺ e IgD⁻. Não foi observado uma diferença estatística ($p=0,1115$) entre os grupos DA e SND, conforme demonstrado na figura 23.

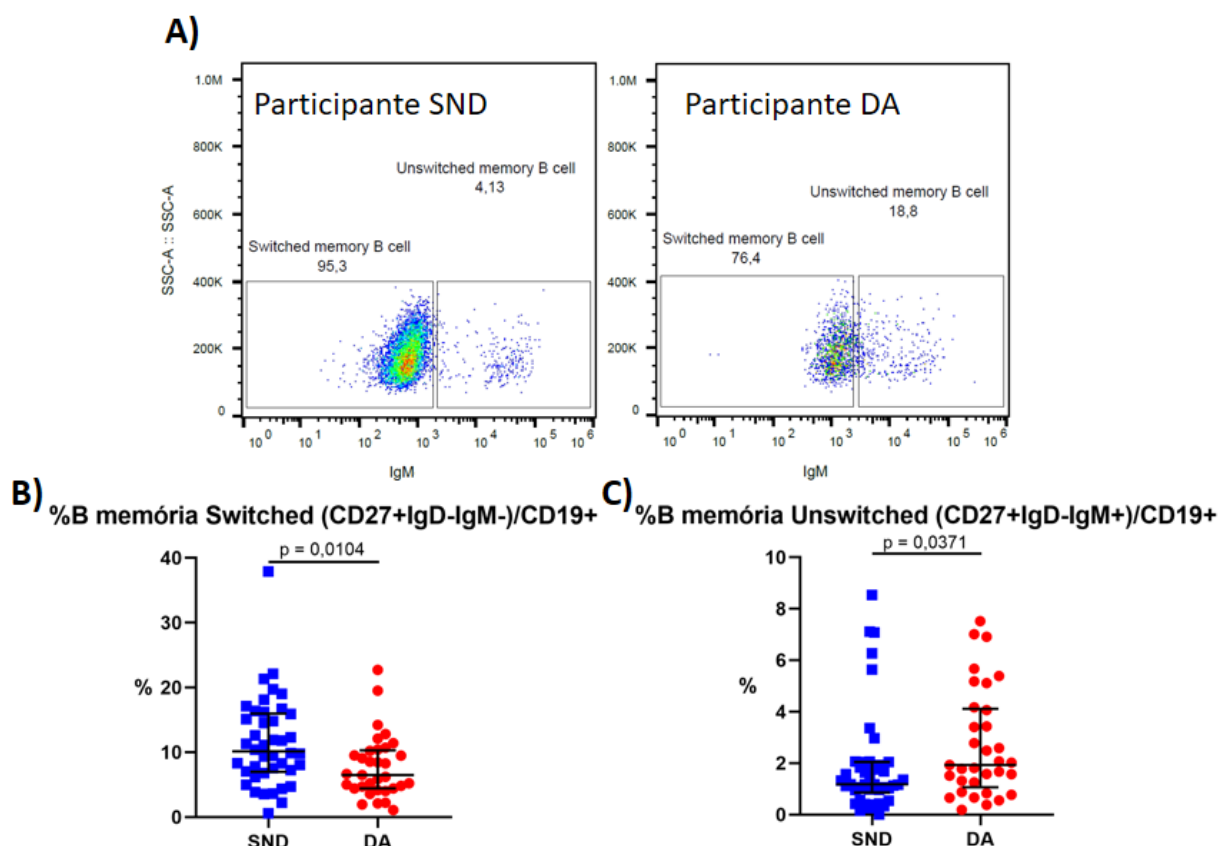
Célula B de memória (CD27⁺ IgD⁻)



Box-plot das porcentagens de células B de memória em relação à população de células CD3⁺ CD19⁺, demonstrando que não há diferença significativa ($p=0,1115$) entre os pacientes dos grupos SND (mediana 13,00%, interquartis de 8,578–18,65) e Dengue Aguda (mediana de 11,50%, interquartis 7,550–13,55). Dengue Aguda $n=33$; Grupo Sintomáticos Não Dengue I $n=42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney para diferença significativa quando $p<0,05$.

Figura 23. Comparação de porcentagem de células B de memória entre os grupos

Mas ao avaliarmos as subpopulações de células B de memória conhecidas como células B de memória *switched* (CD27⁺ IgD⁻ IgM⁻) e *unswitched* (CD27⁺ IgD⁻ IgM⁺) em relação à população de células CD19⁺, observa-se que há mais células B de memória *unswitched* no Grupo DA ($p=0,0371$) e, conseqüentemente, há mais células B de memória *switched* no Grupo SND ($p=0,0104$), conforme observado na figura 24.



A) Dot-plot de eventos registrado por SSC-A x IgM com *gate* de positividade para IgM em relação às células B de memória do Grupo Dengue Aguda (DA) e pacientes do Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND). **B)** Box-plot com diferença significativa ($p=0,0104$) entre as porcentagens de células B de memória *switched* em relação à frequência de células CD19⁺ totais dos participantes SND (mediana 10,14%, interquartis 6,990–15,98) e DA (mediana 6,470%, interquartis 4,420–10,30). **C)** Box-plot comparando porcentagens de células B de memória *unswitched* em relação à frequência de células CD19⁺ totais, onde a mediana do Grupo SND (1,180%, interquartis 0,8550–2,050) é menor significativamente ($p=0,0371$) em relação à mediana do Grupo DA (1,930, interquartis 1,065–4,115). DA n=33; SND n=42; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; diferença estatística quando $p<0,05$.

Figura 24. Diferenças significativas para as populações de célula B de memória *switched* e *unswitched* entre os grupos

3.6.3 Células B *naïve* e subpopulações anérgica e em descanso

Outro tipo de células B avaliada seguindo a tabela 1 foram as células B *naïve* (CD27⁻ IgD⁺) e suas subpopulações *naïve* anérgica (CD27⁻ IgD⁺ IgM⁻) e *naïve* em descanso (CD27⁻ IgD⁺ IgM⁺). De acordo com as análises, não foram observados diferenças significativas entre os grupos DA e SND para a porcentagem de células B *naïve* ($p=0,9260$) e suas subpopulações anérgica ($p=0,0615$) e em descanso ($p=0,9092$) em relação ao total de células B CD19⁺, conforme demonstrado na figura 25.

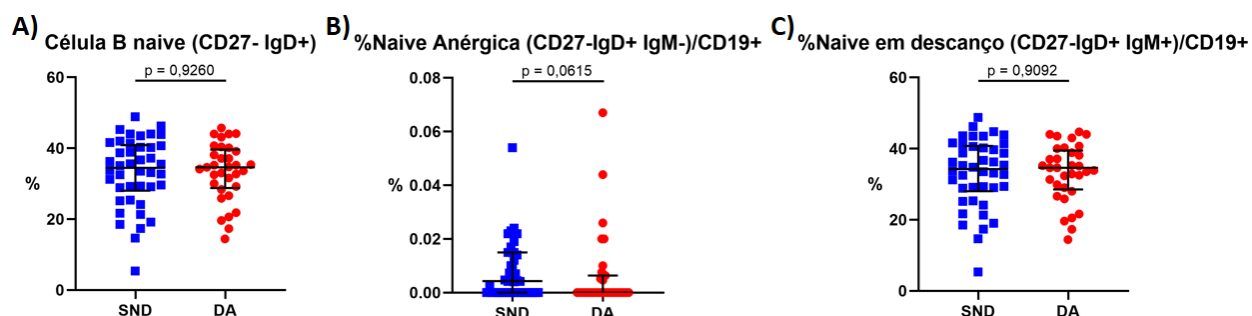
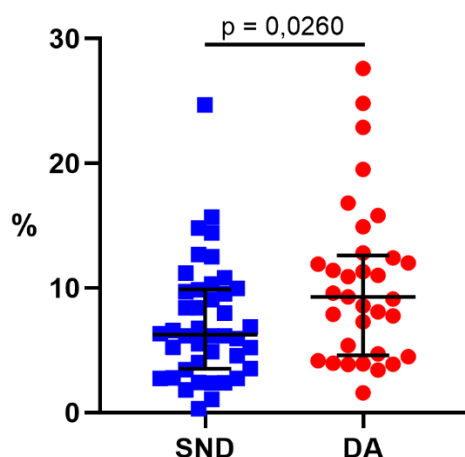


Figura 25. Porcentagem de células B naïve e subpopulações anérgica e em descanso em relação à população de células CD19⁺

3.6.4 Células B transicionais

A próxima subpopulação de células B avaliada foram as células B transicionais em relação à população de células CD19⁺ que, conforme a tabela 1, são caracterizadas pela expressão de CD38⁺, IgD⁺ e IgM⁺. A comparação entre os grupos revelou haver uma diferença estatística significativa de maior porcentagem destas células em circulação no Grupo DA em relação ao Grupo SND ($p=0,0260$), conforme demonstrado pelo gráfico da figura 26.

%B Transicional (CD38+IgD+IgM+)/CD19+

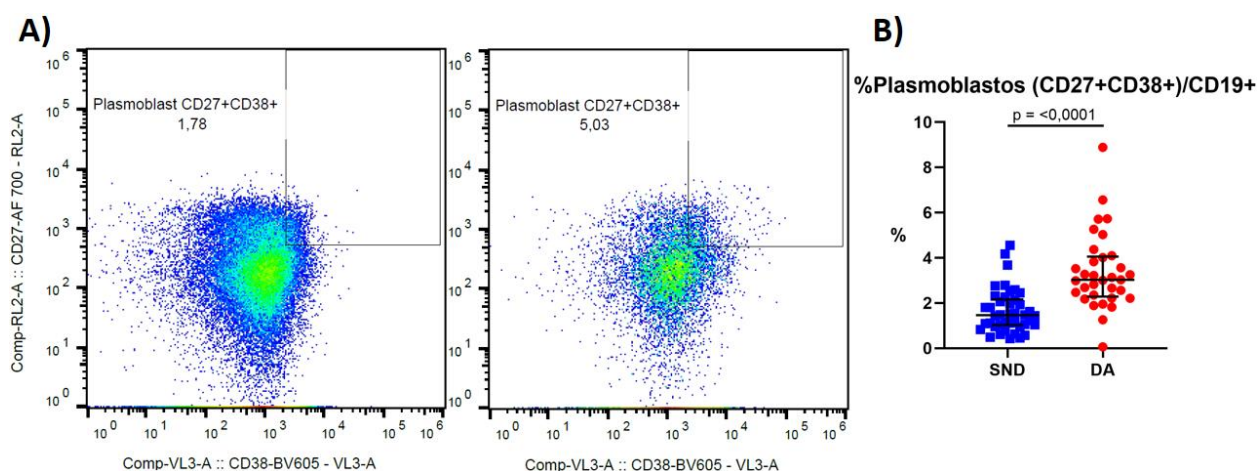


Box-plot comparando porcentagens de células B transicionais em relação à quantidade de células CD19⁺ totais, onde a mediana do Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND) (6,26%, interquartis 3,520–9,885) é estatisticamente menor ($p=0,0260$) em relação à mediana do Grupo Dengue Aguda (DA) (9,29%, interquartis 4,959–12,60). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas através da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; diferença estatística quando $p<0,05$.

Figura 26. Porcentagem de células B transicional em relação à população de células CD19⁺

3.6.5 Há mais plasmoblastos em circulação no Grupo Dengue Aguda em relação ao Grupo Sintomáticos Não Dengue

Pela análise de citometria, foi possível observar uma maior frequência de plasmoblastos determinados pela expressão de CD27⁺ CD38⁺, em relação à população de células CD19⁺ ($p<0,0001$) no Grupo DA (mediana 3,030%, interquartis 2,285–4,055) comparado ao SND (mediana 1,46%, interquartis 1,081–2,165), conforme demonstrado na figura 27.

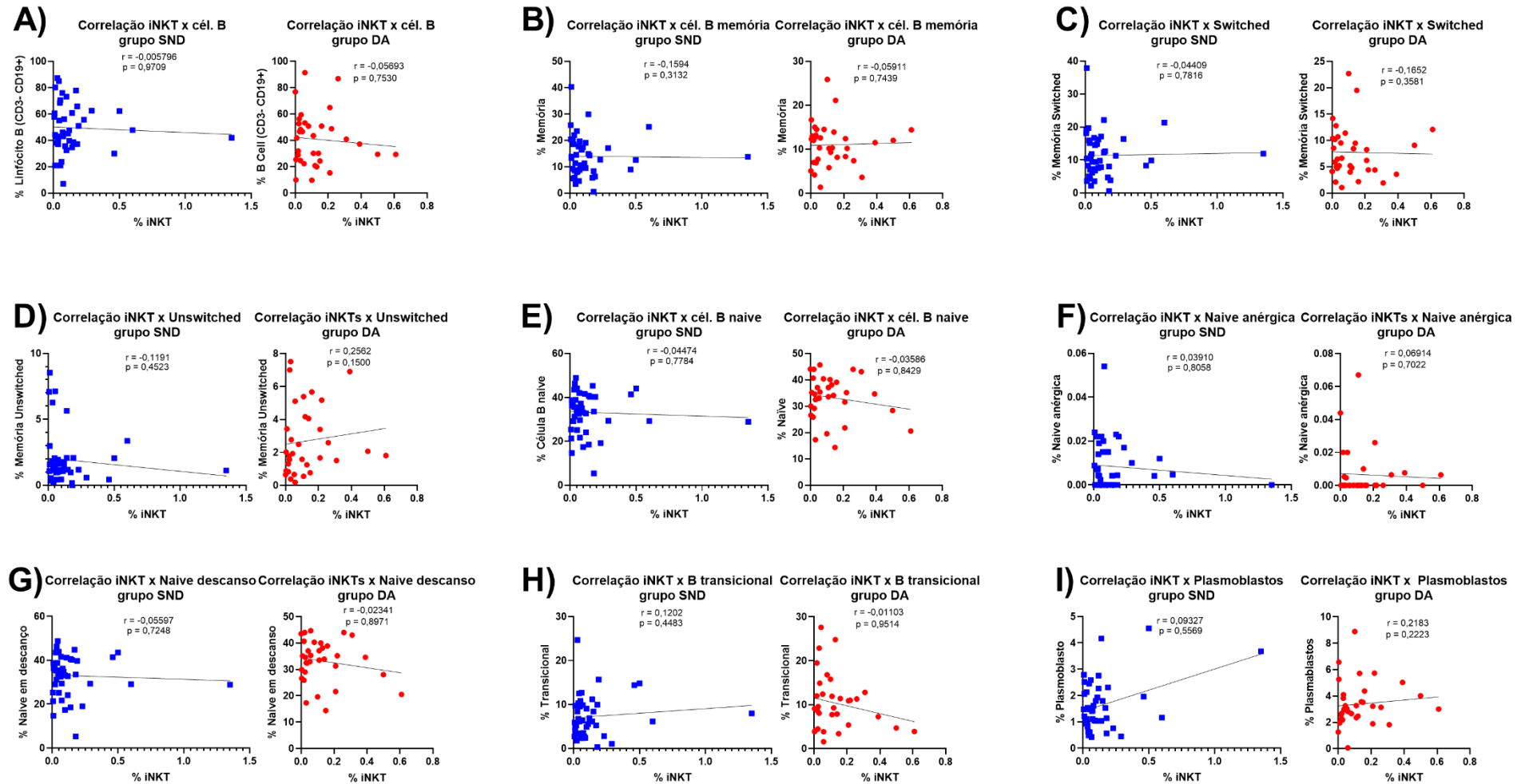


A) Dot-plot de eventos registrado por CD27 x CD19 com *gate* de positividade para CD27⁺ CD38⁺ em relação às células CD19⁺ de pacientes do Grupo Dengue Aguda (DA) e pacientes do Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND). **B)** Box-plot com diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as porcentagens plasmoblastos em relação à quantidade de células CD19⁺ totais dos participantes SND (mediana 1,46%, interquartis 1,018–2,165) e DA (mediana 3,030%, interquartis 2,285–4,055). DA $n=33$; SND $n=42$; porcentagem de células obtidas por meio da citometria de fluxo; teste de Mann Whitney foi utilizado para averiguar diferença significativa; diferença estatística quando $p < 0,05$.

Figura 27. Porcentagem de plasmoblastos (CD27⁺CD38⁺) em relação à população de células CD19⁺

3.7 Correlação das células iNKTs com as células B em circulação dos participantes

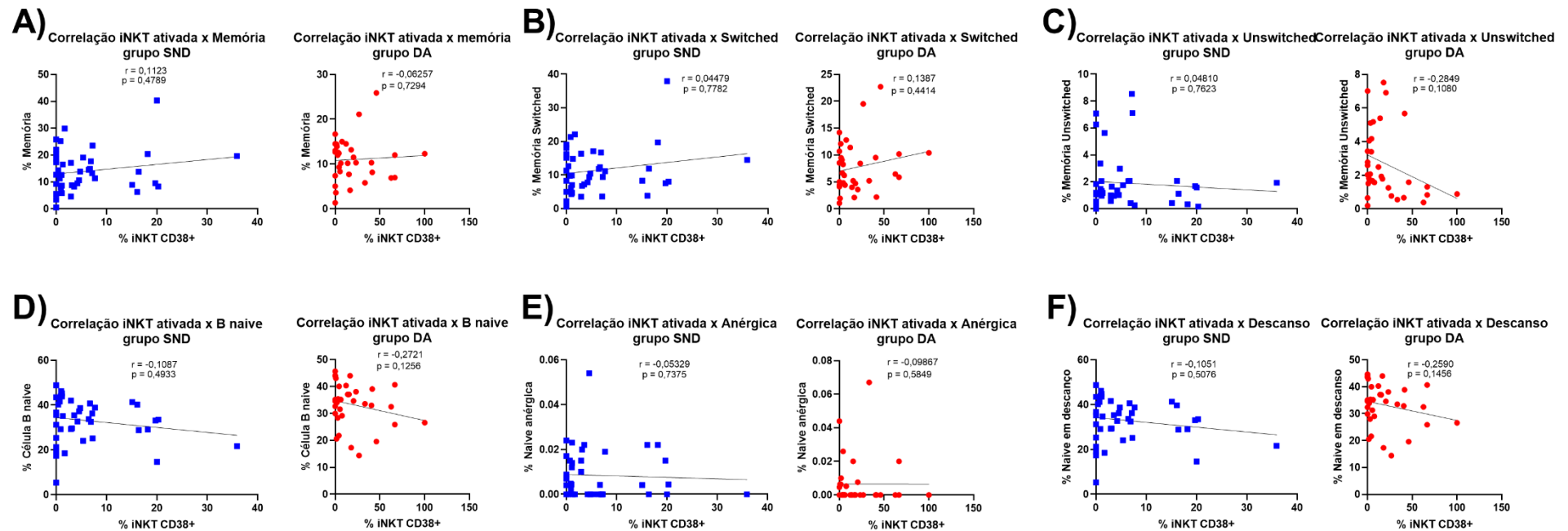
Devido à relação das células iNKTs com as células B, uma relação de estimulação mútua, o próximo passo foi realizar uma análise de correlação entre frequência e nível de estimulação das células iNKTs com as células B e suas subpopulações em circulação através do teste de correlação de Spearman. Observa-se que não há nenhuma correlação significativa entre a porcentagem de células iNKTs em circulação com nenhuma população de células B para ambos os grupos (Figura 28).



Correlação para os grupos Dengue Aguda (DA) e Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND) entre a porcentagem de células iNKTs e porcentagem de **A)** células B (SND $r = -0,005$ e $p = 0,9709$; DA $r = -0,056$ e $p = 0,7530$). **B)** células B de memória (SND $r = -0,1594$ e $p = 0,3132$; DA $r = -0,059$ e $p = 0,7439$). **C)** células B de memória switched (SND $r = -0,44$ e $p = 0,7816$; DA $r = -0,1652$ e $p = 0,3581$). **D)** células B de memória unswitched (SND $r = -0,1191$ e $p = 0,4523$; DA $r = 0,2562$ e $p = 0,1500$). **E)** células B naíve (SND $r = -0,0447$ e $p = 0,7765$; DA $r = -0,0358$ e $p = 0,8429$). **F)** células B naíve anérgica (SND $r = 0,039$ e $p = 0,8058$; DA $r = 0,0691$ e $p = 0,7022$). **G)** células B naíve em descanso (SND $r = -0,05597$ e $p = 0,7248$; DA $r = -0,0234$ e $p = 0,8971$). **H)** células B transicional (SND $r = 0,1202$ e $p = 0,4483$; DA $r = -0,01103$ e $p = 0,9514$). **I)** plasmoblastos (SND $r = 0,09327$ e $p = 0,5569$; DA $r = 0,2183$ e $p = 0,2223$). DA $n = 33$; SND $n = 42$. Teste de correlação Spearman, $p \leq 0,05$.

Figura 28. Correlação entre células iNKTs com células B em circulação entre grupos Dengue Aguda e Sintomáticos Não Dengue

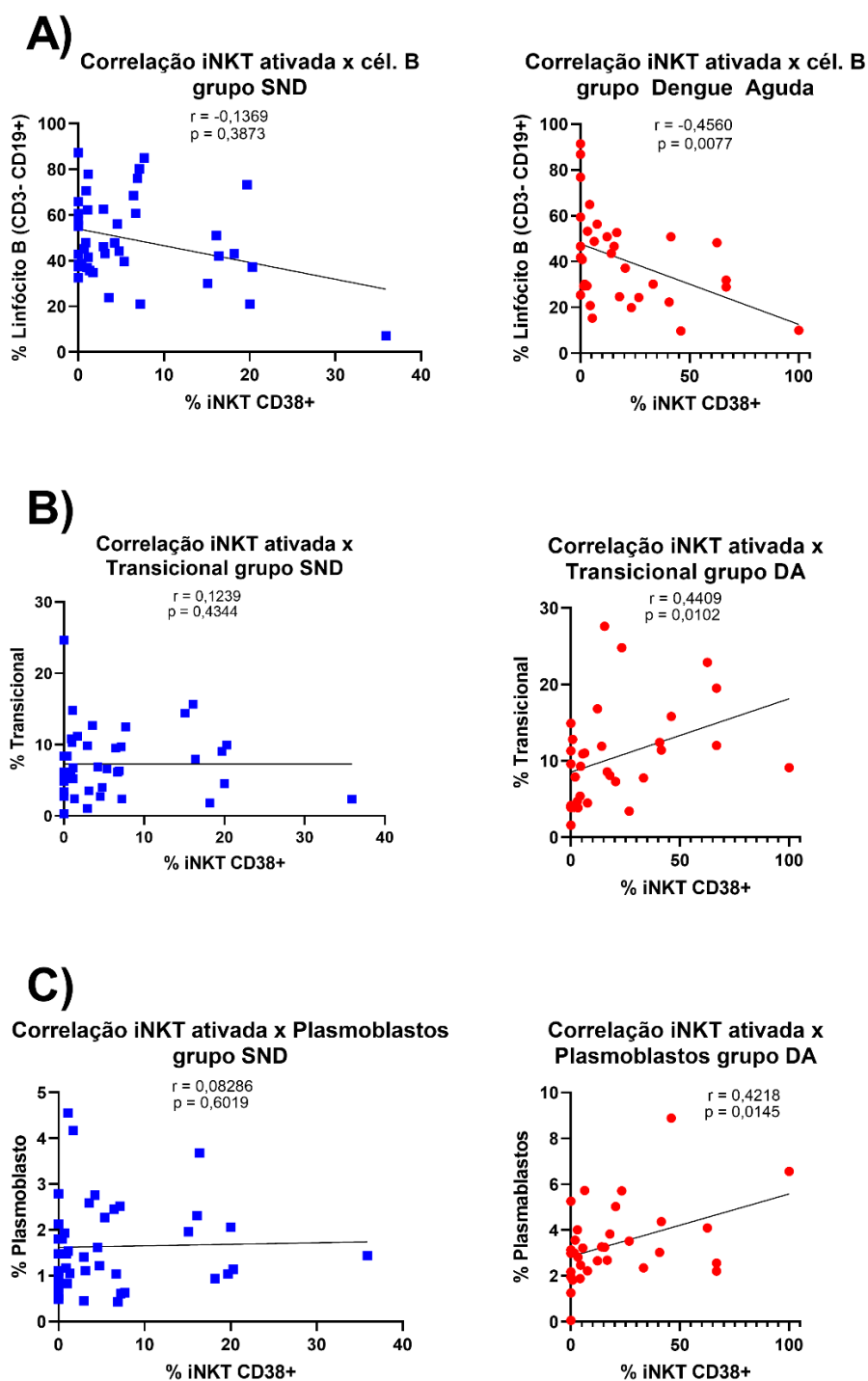
Além das porcentagens de células iNKTs, também é possível buscar por correlações entre a porcentagem de células iNKT ativadas com as subpopulações células B em circulação, já que foi observado diferença estatística significativa com mais células iNKTs ativadas no Grupo DA. Conforme demonstrado na figura 29, os resultados dos testes de correlação de Spearman demonstram que não há nenhuma correlação significativa entre a porcentagem de células iNKTs ativadas em circulação com as subpopulações de células B de memória, incluindo memória *switched* e *unswitched* assim como a subpopulação de célula B *naïve*, incluindo *naïve* anérgica e *naïve* em descanso em ambos os grupos estudados.



Correlação para os grupos Dengue Aguda (DA) e Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND) entre a porcentagem de células iNKTs ativadas e porcentagem de **A)** células B de memória (SND $r=0,1123$ e $p=0,4789$; DA $r=-0,06257$ e $p=0,7294$). **B)** células B de memória *switched* (SND $r=0,04479$ e $p=0,7782$; DA $r=0,1387$ e $p=0,4414$). **C)** células B de memória *unswitched* (SND $r=0,0481$ e $p=0,7623$; DA $r=-0,2649$ e $p=0,1080$). **D)** células B *naïve* (SND $r=-0,1087$ e $p=0,4933$; DA $r=-0,2721$ e $p=0,1256$). **E)** células B *naïve* anérgica (SND $r=-0,0533$ e $p=0,7375$; DA $r=-0,09667$ e $p=0,5849$). **F)** células B *naïve* em descanso (SND $r=-0,1051$ e $p=0,5076$; DA $r=-0,259$ e $p=0,1456$). DA $n=33$; SND $n=42$. Teste de correlação Spearman, $p \leq 0,05$.

Figura 29. Ausência de correlação significativa entre células iNKTs ativadas com células B em circulação entre grupos Dengue Aguda e Sintomáticos Não Dengue

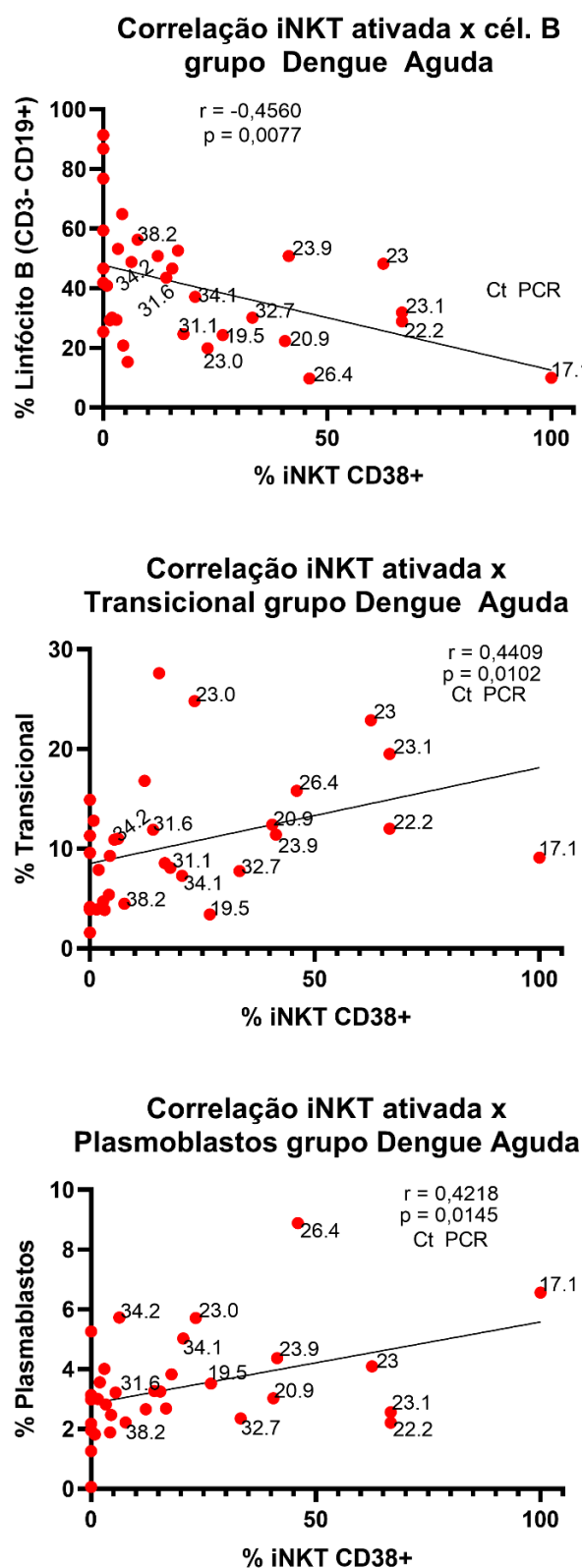
Entranto, foi observado haver correlações significativas entre células iNKTs ativadas e algumas subpopulações de células B. Os testes de correlação de Spearman revelaram haver uma correlação negativa entre a ativação de células iNKTs e a população de células B no Grupo DA ($r=-0,456$, $p=0,0077$), e duas relações positivas entre a ativação das células iNKTs e células B transicionais e plasmoblastos novamente no Grupo DA (respectivamente $r=0,4409$ e $p=0,0102$; $r=0,4218$ e $p=0,0145$) no Grupo DA. Estas correlações significativas não foram observadas no Grupo Sintomáticos Não Dengue (Figura 30).



Correlação para os grupos Dengue Aguda (DA) e Grupo Sintomáticos Não Dengue (SND) entre a porcentagem de células iNKTs ativadas e porcentagem de **A)** células B (SND $r = -0,1369$ e $p = 0,3873$; DA $r = -0,4560$ e $p = 0,0077$). **B)** células B transicional (SND $r = 0,1239$ e $p = 0,4344$; DA $r = 0,4409$ e $p = 0,0102$). **C)** plasmoblastos (SND $r = 0,08286$ e $p = 0,6019$; DA $r = 0,4218$ e $p = 0,0145$). DA $n = 33$; SND $n = 42$. Teste de correlação Spearman, $p \leq 0,05$.

Figura 30. Correlações significativas entre células iNKTs ativadas com células B em circulação entre grupos Dengue Aguda e Sintomáticos Não Dengue

Observando-se uma correlação significativa no Grupo DA entre a ativação de células iNKTs e as células B e algumas de suas subpopulações, foi adicionado à estes gráficos dados de ciclos de quantificação de PCR (Ct PCR) em tempo real dos participantes (Apêndice 5). Ct numa análise de PCR em tempo real refere-se a *Cycle Threshold*, que é o número de ciclos de amplificação necessários para que a quantidade de material genético amplificado alcance um determinado limiar de detecção pré definido. O Ct é frequentemente usado como uma medida quantitativa da quantidade inicial de RNA alvo presente na amostra. Quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade de RNA viral inicial presente na amostra. Os gráficos da figura 31 demonstram haver uma diminuição dos valores de Ct PCR ao longo das correlações.



Correlação para os grupos Dengue Aguda (DA) entre a porcentagem de células iNKTs ativadas e porcentagem de células, células B transicional e plasmoblastos juntamente com valores de Ct PCR respectivos aos indivíduos. DA n=33; teste de correlação Spearman, $p \leq 0,05$.

Figura 31. Valores de ciclos de quantificação de PCR ao longo de correlações significativas

4 DISCUSSÃO

A dengue é uma doença viral, sem tratamento^(22,30) e diagnosticada por meio da combinação de avaliação de sintomas e exames laboratoriais. Como não há tratamentos, é essencial entendermos melhor como o sistema imune responde a esta infecção viral para otimizar o atual manejo de pacientes. Além disso, o contínuo estudo da resposta imune à infecção por DENV pode ajudar a descobrir novos biomarcadores, otimizar novas vacinas, desenvolver possíveis novos tratamentos para esta doença ou até mesmo melhorar o manejo dos sintomas predominantes.

Os sintomas mais prevalentes entre os pacientes desta coorte de dengue aguda foram febre, dor de cabeça e dores musculares. Estes sintomas são justamente os mais comuns conforme descritos pela OMS e também a Organização Pan Americana de Saúde,^(18,32) assim como também pelo trabalho de Deshwal et al.,⁽¹⁰²⁾ e outros diversos trabalhos citados ao longo deste documento. Entretanto, sabe-se que estes sintomas são semelhantes para outras arboviroses da mesma família viral, como zika⁽¹⁰³⁾ e chikungunya⁽¹⁰⁴⁾ que também são epidêmicos no país. Por causa da similaridade de sintomas, é comum ocorrer diagnósticos clínicos cruzados entre estas doenças.^(105,106) Por este motivo, todos os participantes de ambos os grupos também foram testados para estas arboviroses e nenhum foi diagnosticado positivamente. Portanto, se pode ter a certeza que os resultados e conclusões sejam devido à infecção por dengue e não a outro arbovírus.

Apesar dos relatos de sintomas, não foram registradas complicações significativas ou agravamento dos quadros clínicos nos pacientes avaliados neste estudo. Todos os casos de dengue identificados na pesquisa foram atribuídos ao sorotipo DENV1, uma observação consistente com diversos estudos realizados no Brasil e em outros países nos quais indicam que a infecção por este sorotipo tende a apresentar uma manifestação clínica mais leve em comparação com outros sorotipos do DENV.^(107,108)

Este estudo compara um grupo de pacientes infectados exclusivamente por dengue com outro grupo de participantes não afetados por nenhum arbovírus ou outras doenças infecciosas, mas que ainda apresentavam sintomas semelhantes. Dentre os sinais mais frequentes destaca-se a febre, levando à

denominação desse controle como Grupo Sintomáticos Não Dengue. A prática de se utilizar um Grupo Sintomáticos Não Dengue para comparação não só permite observar a resposta imune exclusivas à infecção por DENV, mas também é corroborada por diversos trabalhos que também baseiam seus dados na comparação com grupos formados por indivíduos febris não-dengue.^(109–112)

Além de sintomas e exames laboratoriais, exames de hemograma para ambos os grupos ajudam a reforçar o fato do Grupo DA estar infectado com DENV e os participantes SND não estarem, pois o Grupo DA está com uma menor contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e principalmente plaquetas quando comparado ao SND, o que está de acordo com a Organização Pan Americana de Saúde para pacientes com dengue entre o terceiro e quarto dia.⁽³²⁾

Com os grupos para este estudo definidos, foram realizados os experimentos de citometria de fluxo multiparamétrica para observar e comparar o perfil imunológico dos grupos DA e SND. Não foi observado diferença na frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺, importantes na resposta imunológica contra à infecção por DENV,⁽¹¹³⁾ entre os grupos DA e SND. Os resultados deste trabalho diferem de outros trabalhos que observaram uma menor frequência destas células em pacientes infectados por DENV ao comparar com indivíduos saudáveis.^(114–116) Talvez esta diferença ocorra pelo fato do nosso trabalho usar como comparação indivíduos sintomáticos não dengue enquanto outros trabalhos compararam com indivíduos saudáveis. Isto sugere que em relação à frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ a dengue não se difere de outras infecções febris não-dengue.

O próximo passo foi analisar o estado de ativação celular por meio da quantificação de expressão de CD38 na superfície celular. A molécula CD38 é uma proteína presente na superfície de várias células do sistema imune humano. CD38 é responsável por converter nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) em adenosina difosfato ribose (ADPR), ADPR cíclico e nicotinamida. Os produtos enzimáticos destas reações são mensageiros secundários que mobilizam cálcio envolvido em várias vias de sinalização em diversos contextos celulares.⁽¹¹⁷⁾ Em linfócitos T, já foi observado que há realocização destas moléculas na região de sinapse imunológica de contato com TCR, o que contribui para a modulação de respostas T mediadas por antígenos.⁽¹¹⁸⁾ A frequência de expressão de CD38 na superfície celular depende de vários fatores, entre eles o estado de maturação ou ativação das células CD3⁺.⁽¹¹⁷⁾ No caso das células T maduras, elas possuem baixos níveis de expressão de CD38 em

sua superfície, mas quando estimuladas e passam para um estado ativo de respostas imunes, voltam a aumentar sua frequência de expressão superficial.⁽¹¹⁹⁾

Através da quantificação de expressão de CD38 na superfície celular, este trabalho observou que enquanto as células T CD4⁺ não apresentam diferença significativa entre os grupos avaliados, os linfócitos T CD8⁺ estão significativamente mais ativados no Grupo DA em relação ao SND. O trabalho de Torrentes-Carvalho et al. corrobora nossos dados, pois eles também observaram maior expressão de CD38 em células T CD8⁺, mas não em CD4⁺ ao comparar pacientes com dengue com um grupo controle.⁽¹¹⁵⁾ A ativação de células T CD8⁺ também é observada em outras infecções, tais como na infecção pelo vírus Ebola,⁽¹²⁰⁾ vírus da hepatite C,⁽¹²¹⁾ H1N1,⁽¹²²⁾ e SARS-CoV-2.⁽¹²³⁾ Diferentemente, em outro estudo realizado por Silveira et al. com células do sangue periférico, foi observado que ambas as células T CD4⁺ e T CD8⁺ passaram a expressar mais CD38 em suas superfícies,⁽¹²⁴⁾ entretanto neste trabalho as células obtidas de voluntários saudáveis foram desafiadas por DENV3 *in vitro*, o que diferencia nosso trabalho ao de Torrentes-Carvalho et al. nos quais as células analisadas foram obtidas diretamente de pacientes infectados por DENV.⁽¹¹⁵⁾

Após ter analisado os dados referentes às células T CD4⁺ e T CD8⁺, a atenção se volta às células iNKTs na infecção por DENV. Primeiramente, ao analisar a porcentagem de células iNKTs dentre os linfócitos T, não foi observado diferenças entre os grupos DA e SND. As observações deste trabalho são corroboradas pelos trabalhos de Matangkasombut et al. que compararam as porcentagens de iNKTs em relação aos linfócitos totais e não observaram diferenças entre pacientes com dengue e pacientes com outras doenças febris. Interessantemente, eles também compararam e não observaram diferença entre pacientes com dengue e indivíduos saudáveis.⁽⁹⁷⁾ O mesmo foi observado no trabalho de Kamaladasa et al. no qual não houve diferença significativa na porcentagem de iNKTs entre indivíduos saudáveis e pacientes com dengue.⁽⁹⁶⁾ Estas observações feitas demonstram que a infecção por dengue não leva à alterações nos níveis de iNKTs em circulação.

Já em relação ao estado de ativação das células iNKTs, há uma diferença significativa onde as iNKTs estão mais ativadas nos pacientes com dengue em relação ao Grupo Controle por meio da maior expressão de CD38 em sua superfície. O trabalho de Matangkasombut et al. observaram que as células iNKTs estão mais ativadas nos pacientes com dengue comparados à indivíduos saudáveis, porém não observaram diferenças significativas quando comparado a indivíduos com

outras doenças febris.⁽⁹⁷⁾ Esta diferença talvez decorra deste grupo ter usado CD69 como marcador de ativação celular. O CD69 é de fato expresso na superfície de células T quando estimuladas por antígenos, porém o aumento de sua expressão na superfície celular é passageira e pode durar pouco,^(125,126) enquanto que a expressão de CD38 na superfície destas células é mais consistente e duradoura. Sendo assim, não se sabe se a falta de observação de maior expressão de CD69 no trabalho de Matangkasombut et al. de fato reflete a menor taxa de ativação das células iNKTs similar ao Grupo Sintomáticos Não Dengue ou se a expressão de CD69 foi transiente.

Já o trabalho de Kamaladasa et al. também avaliou o estado de ativação das células iNKTs e também observaram que estas células estão mais ativadas nos pacientes com dengue em relação a indivíduos saudáveis. Entretanto, diferente da avaliação da frequência de células iNKTs em que avaliaram grupos saudáveis com grupo de pacientes com dengue aguda, para esta avaliação haviam 19 indivíduos com dengue sendo que 12 pacientes estavam com dengue aguda e outros 7 estavam com dengue hemorrágica.⁽⁹⁶⁾ A junção destes dois tipos diferentes de pacientes num único grupo torna difícil a conclusão dos resultados observados por Kamaladasa et al. enquanto que em nosso trabalho a melhor distinção dos indivíduos dentro dos grupos avaliados permite ter mais certeza que de fato as células iNKTs estão mais ativadas nos pacientes com dengue em relação ao Grupo Sintomáticos Não Dengue.

Além do estudo das células iNKTs como um todo, também foi analisado suas subpopulações de acordo com as expressões de CD4, CD8 e DN. Neste trabalho, não foi observado diferenças entre os grupos DA e SND para estas 3 subpopulações de iNKTs. O trabalho de Kamaladasa et al. é o único que avalia as subpopulações de iNKTs com dengue e seu resultado demonstra que estas 3 subpopulações variam entre pacientes com dengue aguda e voluntários saudáveis: há mais iNKTs CD8⁺ e iNKTs DN em pessoas saudáveis do que pacientes com dengue aguda e há mais iNKTs CD4⁺ na infecção por DENV do que indivíduos saudáveis.⁽⁹⁶⁾ Entretanto, novamente, esta comparação é feita com um grupo composto de pacientes com dengue aguda e dengue hemorrágica. Portanto nossos dados se mostram mais conclusivos sobre o comportamento da frequência destas células na infecção por dengue.

Também foi observado que as células iNKTs DN estão mais ativadas no grupo infectado por DENV. Não há trabalhos publicados até hoje para

efeito de comparação que demonstraram o estado de ativação destes subtipos em infecções por dengue ou outro arbovírus. Num trabalho realizado por Montoya et al., foi observado em pacientes infectados por HIV e pacientes com tuberculose também apresentam maior expressão de CD38 nas iNKTs DN. Montoya et al. acreditam que estas células são um dos fatores importantes para a reconstituição imunológica em pacientes infectados por HIV-1 ao começarem a receber terapia antiretroviral.⁽¹²⁷⁾ Como as células iNKTs DN são capazes de secretar tanto citocinas de resposta Th1 quanto Th2, pode-se apenas especular por enquanto que é especificamente esta subpopulação de células iNKTs a mais importantes na doença por infecção de DENV.

Porém ainda é necessário observar se a funcionalidade das células iNKTs está levando à mudanças em outras células com que se relacionam no sistema imune. Neste trabalho, as células de interesse para observação são as células B e suas subpopulações.

Primeiramente, se observa que há diminuição das células B em circulação no Grupo DA em relação ao Grupo SND. Já, Lei et al. ao analisarem estas células, observaram que percentualmente há aumento de células CD19⁺ em relação a linfócitos, mas em números absolutos há uma queda em pacientes com dengue ao comparar com indivíduos saudáveis.⁽¹²⁸⁾ Já outro estudo realizado por Pattanapanyasat et al., foi observado que a porcentagem destas células em crianças infectadas com DENV é menor comparado ao Grupo Controle composto por crianças saudáveis.⁽¹²⁹⁾ A divergência de resultados entre estes trabalhos podem decorrer de alguns fatores. O trabalho de Lei et al. comparam pacientes infantis infectados com DENV2 enquanto que nosso trabalho todos os pacientes adultos estavam infectados com DENV1. Além disso, o Grupo Controle de comparação usado é composto por pessoas saudáveis enquanto em nosso trabalho o Grupo Controle é composto com pessoas com sintomas mas não por causa de uma infecção por dengue. Já o trabalho de Pattanapanyasat et al. utilizou um grupo de pacientes com dengue composto tanto por dengue aguda juntamente com dengue hemorrágica para realizar as comparações.⁽¹²⁹⁾ Como o perfil clínico e imunológico são consideravelmente diferentes entre estes estados da doença, não é possível determinar se os resultados deste trabalho são de fato da dengue aguda ou dengue hemorrágica.

A diminuição da frequência destas células em pacientes infectados por dengue como foi observado pelo nosso trabalho pode ser explicado pelo fato das células B serem susceptíveis à infecção pelo DENV,^(130,131) e portanto podem tornarem

alvos para eliminação por células do sistema imune inato como as células NK, levando à diminuição destas pessoas doentes com dengue.

Sabendo que a frequência de células B diminui neste trabalho na infecção por dengue, o próximo passo foi avaliar se pelo menos havia alguma alteração entre as subpopulações destas células entre os grupos DA e SND. Primeiramente com as células B de memória não foi observado diferença na frequência destas na infecção primária por DENV e isso já era esperado já que as coletas ocorreram por volta do sexto dia de sintomas e a produção destas células começa por volta de 10 a 14 dias nos linfonodos após o momento da infecção.^(132,133) A expansão e observação de células B de memória em circulação ocorre de fato na reinfecção pelo DENV.^(134,135)

Mas quando se avalia as subpopulações de células B de memória conhecidas como *unswitched* e *switched*, foi possível observar uma alteração no perfil de frequência destas células. Apesar de não conclusivo, há evidências de que as células B de memória *unswitched* detectadas em circulação seja uma representação das células B da zona marginal.^(136,137) Portanto, considerando que os pacientes DA já estão com uma mediana de 6 dias de sintomas, que as células B de memória *unswitched* surgem antes das células *switched*, significa que estes indivíduos já estão começando a formar novas células B de memória contra DENV antes do tempo esperado e apesar da frequência de células B de memória totais sem distinção não se alterarem.

Já em relação as células B *naïve*, esperava-se que houvesse uma retenção destas em órgãos linfoides secundários e uma diminuição na circulação durante uma infecção. Entretanto, em nosso trabalho, ao comparar o Grupo DA com o SND, não há diferenças entre os grupos, tanto para a população de células *naïve* totais quanto suas subpopulações anérgica e em descanso. Este achado é corroborado pelo trabalho de Garcia-Bates et al. que também não observaram diferenças destas células entre pacientes com dengue aguda e pacientes com doenças febris.⁽¹³⁸⁾ Portanto, as células B *naïve* na infecção por DENV se comportam similarmente a outras enfermidades febris.

As células B transitórias ($CD38^+ IgD^{low}$) são uma forma imatura das células B, elas são o tipo de células B mais imaturas detectadas no sangue periférico, pois acabaram de deixar a medula óssea.^(139,140) Num estudo com camundongos humanizados imuno deficientes, foi observado a não produção de anticorpos do tipo IgG, mas foi detectado células B IgM e aumento das células B transitórias imaturas na

periferia após a infecção por DENV.⁽¹⁴¹⁾ Neste trabalho, os pacientes do Grupo DA também apresentam aumento dessas células em circulação. O mesmo foi observado na infecção viral por SARS-CoV-2, em que pacientes apresentaram aumento destas células em circulação.⁽¹⁴²⁾ Esta confirmação já era esperada pois infecções virais podem estimular a produção de novas células imunes pela medula óssea.^(143,144)

Células B secretoras de anticorpos são essenciais para a resolução de doenças virais, tanto para eliminação de células infectadas quanto para neutralizar as unidades virais em circulação,⁽¹⁴⁵⁾ sendo um tipo celular importante para a solução da infecção por DENV.⁽¹⁴⁶⁾ Nos trabalhos de Lei et al. e Pattanapanyasat et al. observaram-se que pacientes com dengue tinham maior porcentagem de células produtoras de anticorpos em circulação ao comparar com indivíduos saudáveis.^(128,129) Wrammet et al. também observaram o mesmo ao comparar pacientes com dengue com controles saudáveis.⁽¹⁴⁶⁾ Entretanto, neste trabalho, assim como no trabalho de Pattanapanyasat et al., também classificaram tanto pacientes com dengue aguda quanto pacientes com dengue hemorrágica num único grupo de indivíduos infectados por DENV.⁽¹²⁶⁾ Portanto, nestes dois trabalhos não é possível concluir se há alguma influência por causa dos diferentes perfis ou de dengue aguda ou de dengue hemorrágica ou se ambos se comportam de forma semelhante pelo fato de aumentar a proporção de células produtoras de anticorpos. Já com este trabalho que utilizou uma coorte de pacientes apenas com dengue aguda comparado com indivíduos sintomáticos não dengue demonstra que há uma maior porcentagem de plasmoblastos no grupo infectado pelo DENV.

Após a avaliação dos percentuais de células em circulação e observar diversas diferenças significativas entre os grupos avaliados, o próximo passo foi averiguar se existem correlações entre elas. Apesar de aparentemente não haver nenhuma correlação entre frequências de células iNKTs com as diversas populações de células B, quando se faz a análise com a ativação das células iNKTs, observa-se duas correlações positivas de interesse apenas nos participantes do Grupo DA: quanto maior a frequência de células iNKTs ativadas, maior é a frequência de células B transicionais e plasmoblastos. O fato destas correlações não se mostrarem presente entre os indivíduos do Grupo SND é uma grande revelação, pois demonstra que no caso da infecção por dengue, diferente de outras doenças febris, é a ativação das células iNKTs que levam à células B começarem a se diferenciarem em plasmoblastos.

Mais especificamente na correlação positiva entre ativação de iNKTs e aumento de plasmoblastos, apesar do problema previamente apontado sobre juntar num mesmo grupo pacientes com dengue aguda e pacientes com dengue hemorrágica, Kamaladasa et al. observaram uma correlação positiva significativa entre células iNKTs com atividade das células B: quanto maior a porcentagem de ativação das células iNKTs, maiores eram os níveis de anticorpos IgG específicos contra o DENV.⁽⁹⁶⁾

Entretanto, ainda pode ser argumentado que neste trabalho não fica claro se é a ativação das células iNKTs que estão levando a maior diferenciação de plasmoblastos ou se são os plasmoblastos que estão estimulando a ativação das células iNKTs, já que foi demonstrado que células B podem promover isto.^(65–67) É mais provável que seja a primeira suposição a verdadeira, pois os plasmoblastos já estão mais diferenciadas para a produção de anticorpos e perdem a capacidade de apresentarem antígenos.⁽¹⁴⁷⁾ Ainda sim, esta observação abre uma oportunidade para futuros experimentos confirmativos.

Apesar dos resultados de PCR quantitativo em tempo real normalmente serem categorizados em positivo, negativo ou indeterminado, ele também fornece valores de *Cycle Threshold* (CT). Neste teste, quanto menor os valores de CT, maior é a carga viral presente no paciente no momento da coleta.^(148,149) Como visto por Libraty et al., mais especificamente no caso da infecção por DENV3, quanto maior os níveis de viremia, maiores são os níveis de citocinas em circulação, maior é a expressão receptores de citocinas na superfície celular e maior é a severidade de pacientes infectados.⁽¹⁵⁰⁾ Portanto, ao adicionar os valores de CT no gráfico, passou a ser possível averiguar se a quantidade de carga viral estivesse ligado aos maiores níveis de ativação de iNKTs e frequência de plasmoblastos. Neste caso, foi observado que quanto maior era os níveis de viremia, maior era a ativação das células iNKTs e também maior era a frequência de plasmoblastos. Isto é um forte indicativo de que a atividade viral do DENV está levando uma maior ativação de células iNKTs e, conseqüentemente, leva a um maior número de células B se diferenciarem em plasmoblastos. Isto demonstra que a atividade das iNKts é de grande importância para a solução da infecção por DENV.

Não existe na literatura publicada até então um trabalho como este que faz uma observação de correlação entre as células iNKTs, células B e carga viral em pacientes adultos em estado agudo infectados pelo DENV. Tão importante quanto

os achados que este trabalho apresenta são as novas perguntas que ele cria como por exemplo, análise de produção de citocinas de iNKTs e se a estimulação destas células por α -GalCer causa uma resposta diferenciada em pacientes de dengue.

5 CONCLUSÕES

1. A infecção primária por DENV não altera as frequências de linfócitos T, linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e células iNKTs em circulação no sangue periférico em relação a outras doenças sintomáticas não dengue;

2. A dengue é capaz de modular as subpopulações de linfócitos T CD8⁺ e células iNKTs (especificamente a subpopulação CD4⁻CD8⁻) para ficarem mais ativadas no sangue periférico de pacientes infectados por DENV do que outras doenças sintomáticas não dengue;

3. A infecção primária por vírus da dengue não altera a frequência de células B totais em circulação no sangue periférico e nem as subpopulações de memória e *naïve* em relação a outras doenças sintomáticas não dengue;

4. A infecção por dengue leva a maior produção de novas células B transitórias e maior diferenciação das células B plasmoblastos em relação a outras doenças sintomáticas não dengue;

5. Há correlação positiva entre maior frequência de ativação de células iNKTs com as subpopulações de células B transitórias e plasmoblastos no Grupo Dengue Aguda. Considerando que as células T CD4⁺ ainda não estão ativas e é muito cedo na infecção para já estarem atuando no estímulo das células B, esta observação sugere um papel importante das células iNKTs para a solução da doença dengue.

6 REFERÊNCIAS

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.
2. Chen R, Vasilakis N. Dengue — Quo tu et quo vadis? *Viruses.* 2011;3(9):1562.
3. Ponlawat A, Harrington LC. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *J Med Entomol.* 2005;42(5):844–9.
4. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife.* 2015;4.
5. Mackenzie JS, la Brooy JT, Hueston L, Cunningham AL. Dengue in Australia. *J Med Microbiol.* 1996;45(3):159-61.
6. Gubler DJ. COMMENTARY: Ashburn PM, Craig CF. Experimental investigations regarding the etiology of dengue. *J Infect Dis* 1907; 4:440–75. *J Infect Dis.* 2004;189(9):1744–83.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library (PHIL). Atlanta: CDC; 2010 [cited 2024 Feb 26]. Available from: <https://phil.cdc.gov/>.
8. Sabin AB, Schlesinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science* (80-). 1945;101(2634):640–2.
9. Sabin AB. Research on dengue during world war II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952;1(1):30–50.
10. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus. *Cell.* 2002;108(5):717–25.
11. Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, Nelson MA, Herring BL, Hapel AJ, et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol Ther.* 2013;137(2):266–82.
12. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44(1):649–88.
13. Chen HR, Lai YC, Yeh TM. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):58.
14. Falgout B, Markoff L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 1995;69(11):7232–43.
15. Swarbrick CM, Basavannacharya C, Chan KW, Chan SA, Singh D, Wei N, et al. NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(22):12904–20.
16. Klema VJ, Ye M, Hindupur A, Teramoto T, Gottipati K, Padmanabhan R, et al. Dengue virus nonstructural protein 5 (NS5) assembles into a dimer with a unique methyltransferase and polymerase interface. *PLOS Pathog.* 2016;12(2):e1005451.
17. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(8):e1760.
18. World Health Organization. Dengue and severe dengue. Geneva: WHO; 2023 [cited 2024 Feb 26]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
19. Guo C, Zhou Z, Wen Z, Liu Y, Zeng C, Xiao D, et al. Global epidemiology of dengue outbreaks in 1990-2015: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:317.
20. Pan Americana Health Organization - PAHO. Casos reportados de dengue en las

Américas. PAHO;2023 [cited 2023 Feb 26]. Available from: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indi>

21. Ryan SJ, Carlson CJ, Mordecai EA, Johnson LR. Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(3):e0007213.
22. World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. Geneva: WHO; 2012 [cited 2024 Feb 26]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241504034>
23. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*. 2010;2(12):2649–62.
24. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013;158(7):1445–59.
25. da Silveira LT, Tura B, Santos M. Systematic review of dengue vaccine efficacy. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):750.
26. Governo do Brasil. Anvisa aprova nova vacina contra a dengue. Brasil; 2023 [citado em 2024 Maio 13]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue>
27. Tricou V, Yu D, Reynales H, Biswal S, Saez-Llorens X, Sirivichayakul C, et al. Long-term efficacy and safety of a tetravalent dengue vaccine (TAK-003): 4-5-year results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Glob Heal*. 2024;12(2):e257–70.
28. Kallás EG, Cintra MA, Moreira JA, Patiño EG, Braga PE, Tenório JC, et al. Live, attenuated, tetravalent Butantan–dengue vaccine in children and adults. *N Engl J Med*. 2024;390(5):397–408.
29. Izmirly AM, Alturki SO, Alturki SO, Connors J, Haddad EK. Challenges in dengue vaccines development: pre-existing infections and cross-reactivity. *Front Immunol*. 2020;11:1055.
30. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2(1):16055.
31. Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, et al. Dengue--how best to classify it. *Clin Infect Dis*. 2011;53(6):563–7.
32. Pan American Health Organization - PAHO. Dengue: guidelines for patient care in the Region of the Americas. 2nd ed. Washington: PAHO; 2016.
33. Ministério da Saúde. Dengue: diagnóstico e manejo clínico, adulto e criança. 5a ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2016.
34. Paz-Bailey G, Adams LE, Deen J, Anderson KB, Katzelnick LC. Dengue. *Lancet*. 2024;403(10427):667–82.
35. Schmid MA, Harris E. Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS Pathog*. 2014;10(12):e1004541.
36. Cerny D, Haniffa M, Shin A, Bigliardi P, Tan BK, Lee B, et al. Selective susceptibility of human skin antigen presenting cells to productive dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(12):e1004548.
37. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004;189(8):1411–8.
38. Anderson R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:229–74.

39. Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids*. 2011;41(5):1159–63.
40. Polacek C, Friebe P, Harris E. Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol*. 2009;90(3):687–92.
41. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):365–75.
42. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002;186(8):1165–8.
43. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol*. 2012;2(2):168–75.
44. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):S3–23.
45. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *BioFactors*. 2009;35(1):14–20.
46. Montoya M, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, et al. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood*. 2002;99(9):3263–71.
47. Palma-Ocampo HK, Flores-Alonso JC, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J, Flores-Mendoza L, Herrera-Camacho I, et al. Interferon lambda inhibits dengue virus replication in epithelial cells. *Virol J*. 2015;12(1):150.
48. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(39):16922–7.
49. Chandele A, Sewatanon J, Gunisetty S, Singla M, Onlamoon N, Akondy RS, et al. Characterization of human CD8 T cell responses in dengue virus-infected patients from India. *J Virol*. 2016;90(24):11259–78.
50. Rothman AL, Medin CL, Friberg H, Currier JR. Immunopathogenesis versus protection in dengue virus infections. *Curr Trop Med Reports*. 2014;1(1):13–20.
51. Wahala WM, Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*. 2011;3(12):2374–95.
52. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):532–43.
53. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):959–71.
54. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7a ed. São Paulo: Elsevier; 2012. Capítulo 3, Migração dos leucócitos para os Tecidos; p. 37–53.
55. Duty JA, Szodoray P, Zheng NY, Koelsch KA, Zhang Q, Swiatkowski M, et al. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J Exp Med*. 2009;206(1):139–51.
56. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):118–32.
57. Cyster JG, Allen CD. B cell responses: cell interaction dynamics and decisions. *Cell*. 2019;177(3):524–40.
58. Kräutler NJ, Suan D, Butt D, Bourne K, Hermes JR, Chan TD, et al. Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by

Tfh cells. *J Exp Med*. 2017;214(5):1259–67.

59. Katzelnick LC, Montoya M, Gresh L, Balmaseda A, Harris E. Neutralizing antibody titers against dengue virus correlate with protection from symptomatic infection in a longitudinal cohort. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(3):728–33.

60. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* (80-). 1996;272(5258):54–60.

61. Akkaya M, Kwak K, Pierce SK. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(4):229–38.

62. Carril-Ajuria L, Desnoyer A, Meylan M, Dalban C, Naigeon M, Cassard L, et al. Baseline circulating unswitched memory B cells and B-cell related soluble factors are associated with overall survival in patients with clear cell renal cell carcinoma treated with nivolumab within the NIVOREN GETUG-AFU 26 study. *J Immunother Cancer*. 2022;10(5):e004885.

63. Newell KL, Clemmer DC, Cox JB, Kayode YI, Zoccoli-Rodriguez V, Taylor HE, et al. Switched and unswitched memory B cells detected during SARS-CoV-2 convalescence correlate with limited symptom duration. *PLoS One*. 2021;16(1):e0244855.

64. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and opportunities for consistent classification of human B cell and plasma cell populations. *Front Immunol*. 2019;10.

65. Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, Hung S chen, et al. The other function: class II-restricted antigen presentation by B cells. *Front Immunol*. 2017;8.

66. Small TN, Knowles RW, Keever C, Kernan NA, Collins N, O'Reilly RJ, et al. M241 (CD1) expression on B lymphocytes. *J Immunol*. 1987;138(9):2864–8.

67. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):929–41.

68. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, et al. A novel population of T-cell receptor $\alpha\beta$ -bearing thymocytes which predominantly expresses a single V β gene family. *Nature*. 1987;329(6136):251–4.

69. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med*. 1994;180(3):1097–106.

70. Bendelac A. Mouse NK1+ T cells. *Curr Opin Immunol*. 1995;7(3):367–74.

71. Ohteki T, MacDonald HR. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J Exp Med*. 1994;180(2):699–704.

72. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* (80-). 1995;268(5212):863–5.

73. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med*. 1993;178(1):1–16.

74. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using Cd1d tetramers. *J Exp Med*. 2000;192(5):741–54.

75. Crosby CM, Kronenberg M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(9):559–74.

76. Huang W, He W, Shi X, He X, Dou L, Gao Y. The role of CD1d and MR1 restricted T cells in the liver. *Front Immunol*. 2018;9.

77. Berzins SP, Cochrane AD, Pellicci DG, Smyth MJ, Godfrey DI. Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. *Eur J Immunol.* 2005;35(5):1399–407.
78. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology.* 2007;122(1):1–14.
79. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the ‘Swiss-Army knife’ of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):358–68.
80. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):101–17.
81. O’Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4⁺, CD8 α ⁺ and CD4-CD8 α ⁻ invariant natural killer T cells. *PLoS One.* 2011;6(12):e28648.
82. Zeng SG, Ghnewa YG, O’Reilly VP, Lyons VG, Atzberger A, Hogan AE, et al. Human invariant NKT cell subsets differentially promote differentiation, antibody production, and T cell stimulation by B cells in vitro. *J Immunol.* 2013;191(4):1666–76.
83. Doherty DG, Melo AM, Moreno-Olivera A, Solomos AC. Activation and regulation of B cell responses by invariant natural killer T cells. *Front Immunol.* 2018;9.
84. Santo C, Salio M, Masri SH, Lee LY, Dong T, Speak AO, et al. Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus–induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J Clin Invest.* 2008;118(12):4036–48.
85. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Blanc F, Pichavant M, Renneson J, et al. Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8⁺ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *J Immunol.* 2011;186(10):5590–602.
86. Grubor-Bauk B, Simmons A, Mayrhofer G, Speck PG. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V α 14-J α 281 TCR. *J Immunol.* 2003;170(3):1430–4.
87. Johnson TR, Hong S, Van Kaer L, Koezuka Y, Graham BS. NK T cells contribute to expansion of CD8⁺ T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 2002;76(9):4294–303.
88. Motsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S, Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med.* 2002;195(7):869–79.
89. van der Vliet HJ, von Blumberg BM, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, et al. Selective decrease in circulating V α 24 + V β 11 + NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol.* 2002;168(3):1490–5.
90. Morita M, Motoki K, Akimoto K, Natori T, Sakai T, Sawa E, et al. Structure-activity relationship of .alpha.-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem.* 1995;38(12):2176–87.
91. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science (80-).* 1997;278(5343):1626–9.
92. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 2004;114(10):1379–88.
93. Ho L, Denney L, Luhn K, Teoh D, Clelland C, McMichael AJ. Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A

virus infection. *Eur J Immunol*. 2008;38(7):1913–22.

94. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med*. 2000;192(7):921–30.

95. Courtney AN, Nehete PN, Nehete BP, Thapa P, Zhou D, Sastry KJ. Alpha-galactosylceramide is an effective mucosal adjuvant for repeated intranasal or oral delivery of HIV peptide antigens. *Vaccine*. 2009;27(25–26):3335–41.

96. Kamaladasa A, Wickramasinghe N, Adikari TN, Gomes L, Shyamali NL, Salio M, et al. Expansion of highly activated invariant natural killer T cells with altered phenotype in acute dengue infection. *Clin Exp Immunol*. 2016;185(2):228–38.

97. Matangkasombut P, Chan-in W, Opasawaschai A, Pongchaikul P, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, et al. Invariant NKT cell response to dengue virus infection in human. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6):e2955.

98. Byers N, Fleshman A, Perera R, Molins C. Metabolomic insights into human arboviral infections: dengue, chikungunya, and zika viruses. *Viruses*. 2019;11(3):225.

99. Biswas HH, Ortega O, Gordon A, Standish K, Balmaseda A, Kuan G, et al. Early clinical features of dengue virus infection in Nicaraguan children: a longitudinal analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1562.

100. Yozwiak NL, Skewes-Cox P, Stenglein MD, Balmaseda A, Harris E, DeRisi JL. Virus identification in Unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1485.

101. Gordon A, Gresh L, Ojeda S, Katzelnick LC, Sanchez N, Mercado JC, et al. Prior dengue virus infection and risk of Zika: a pediatric cohort in Nicaragua. *PLOS Med*. 2019;16(1):e1002726.

102. Deshwal R, Qureshi MI, Singh R. Clinical and laboratory profile of dengue fever. *J Assoc Physicians India*. 2015;63(12):30–2.

103. Agumadu VC, Ramphul K. Zika virus: a review of literature. *Cureus*. 2018.

104. Cunha RV, Trinta KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(8):523–31.

105. Cabral-Castro MJ, Cavalcanti MG, Peralta RH, Peralta JM. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *J Clin Virol*. 2016;82:108–11.

106. Bagno FF, Figueiredo MM, Villarreal J, Pereira GC, Godoi LC, Fonseca FG. Undetected Chikungunya virus co-infections in a Brazilian region presenting hyper-endemic circulation of dengue and zika. *J Clin Virol*. 2019;113:27–30.

107. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e617.

108. Vicente CR, Herbinger KH, Fröschl G, Malta Romano C, Souza Areias Cabidelle A, Cerutti Junior C. Serotype influences on dengue severity: a cross-sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitória, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):320.

109. Sigera PC, Rajapakse S, Weeratunga P, Silva NL, Gomes L, Malavige GN, et al. Dengue and post-infection fatigue: findings from a prospective cohort—the Colombo dengue study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2021;115(6):669–76.

110. Voge NV, Perera R, Mahapatra S, Gresh L, Balmaseda A, Loroño-Pino MA, et al. Metabolomics-based discovery of small molecule biomarkers in serum associated with dengue virus infections and disease outcomes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):e0004449.

111. El-Bacha T, Struchiner CJ, Cordeiro MT, Almeida FC, Marques ET, Da Poian AT. 1 H nuclear magnetic resonance metabolomics of plasma unveils liver dysfunction in dengue patients. *J Virol*. 2016;90(16):7429–43.
112. Chaloeuwong J, Tantiworawit A, Rattanathammethee T, Hantrakool S, Chai-Adisaksopha C, Rattarittamrong E, et al. Useful clinical features and hematological parameters for the diagnosis of dengue infection in patients with acute febrile illness: a retrospective study. *BMC Hematol*. 2018;18(1):20.
113. Tian Y, Grifoni A, Sette A, Weiskopf D. Human T cell response to dengue virus infection. *Front Immunol*. 2019;10.
114. Manh DH, Weiss LN, Thuong NV, Mizukami S, Dumre SP, Luong QC, et al. Kinetics of CD4+ T helper and CD8+ effector T cell responses in acute dengue patients. *Front Immunol*. 2020;11.
115. Torrentes-Carvalho A, Marinho CF, Oliveira-Pinto LM, Oliveira DB, Damasco PV, Cunha RV, et al. Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue. *Immunobiology*. 2014;219(5):329–40.
116. Matos AM, Carvalho KI, Rosa DS, Villas-Boas LS, Silva WC, Rodrigues CL, et al. CD8+ T lymphocyte expansion, proliferation and activation in dengue fever. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003520.
117. Glaría E, Valledor AF. Roles of CD38 in the immune response to infection. *Cells*. 2020;9(1):228.
118. Muñoz P, Mittelbrunn M, de la Fuente H, Pérez-Martínez M, García-Pérez A, Ariza-Veguillas A, et al. Antigen-induced clustering of surface CD38 and recruitment of intracellular CD38 to the immunologic synapse. *Blood*. 2008;111(7):3653–64.
119. Sandoval-Montes C, Santos-Argumedo L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J Leukoc Biol*. 2005;77(4):513–21.
120. Ruibal P, Oestereich L, Lüdtke A, Becker-Ziaja B, Wozniak DM, Kerber R, et al. Unique human immune signature of Ebola virus disease in Guinea. *Nature*. 2016;533(7601):100–4.
121. Radziewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Osborn MK, Obideen K, Wehbi M, et al. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8 + T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol*. 2008;82(20):9808–22.
122. Fox A, Hoa LN, Horby P, van Doorn HR, Trung NV, Ha NH, et al. Severe pandemic H1N1 2009 infection is associated with transient NK and T deficiency and aberrant CD8 responses. *PLoS One*. 2012;7(2):e31535.
123. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020;8(4):420–2.
124. Silveira GF, Wowk PF, Cataneo AH, Santos PF, Delgobo M, Stimamiglio MA, et al. Human T lymphocytes are permissive for dengue virus replication. *J Virol*. 2018;92(10).
125. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*. 1997;27(1):71–6.
126. Yang J, Wen X, Xu H, Torres-Chinn N, Speake C, Greenbaum CJ, et al. Antigen-specific T cell analysis reveals that active immune responses to β cell antigens are focused on a unique set of epitopes. *J Immunol*. 2017;199(1):91–6.
127. Montoya CJ, Cataño JC, Ramirez Z, Rugeles MT, Wilson SB, Landay AL. Invariant NKT cells from HIV-1 or mycobacterium tuberculosis-infected patients express an activated

phenotype. *Clin Immunol*. 2008;127(1):1–6.

128. Lei C, Yu Q, Wang H, Liu J, Chen S, Zhao Z, et al. Responses of CD27 + CD38 + plasmablasts, and CD24 hi CD27 hi and CD24 hi CD38 hi regulatory B cells during primary dengue virus 2 infection. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(11):e24035.

129. Pattanapanyasat K, Khowawisetsut L, Chuansumrit A, Chokephaibulkit K, Tangnararatchakit K, Apiwattanakul N, et al. B cell subset alteration and the expression of tissue homing molecules in dengue infected patients. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):64.

130. Upasani V, Vo HT, Auerswald H, Laurent D, Heng S, Duong V, et al. Direct infection of B cells by dengue virus modulates B cell responses in a Cambodian pediatric cohort. *Front Immunol*. 2021;11.

131. King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, et al. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999;30(4):718–28.

132. Appanna R, KG S, Xu MH, Toh YX, Velumani S, Carbajo D, et al. Plasmablasts during acute dengue infection represent a small subset of a broader virus-specific memory B cell pool. *EBioMedicine*. 2016;12:178–88.

133. Pinna D, Corti D, Jarrossay D, Sallusto F, Lanzavecchia A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *Eur J Immunol*. 2009;39(5):1260–70.

134. Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, Macagno A, Simonelli L, Quyen NT, 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(3):271–83.

135. Schieffelin JS, Costin JM, Nicholson CO, Orgeron NM, Fontaine KA, Isern S, et al. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virol J*. 2010;7(1):28.

136. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):267–85.

137. Weller S. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004;104(12):3647–54.

138. Garcia-Bates TM, Cordeiro MT, Nascimento EJ, Smith AP, Soares de Melo KM, McBurney SP, et al. Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients. *J Immunol*. 2013;190(1):80–7.

139. Yam-Puc JC, Cedillo-Barrón L, Aguilar-Medina EM, Ramos-Payán R, Escobar-Gutiérrez A, Flores-Romo L. The cellular bases of antibody responses during dengue virus infection. *Front Immunol*. 2016;7.

140. Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol*. 2008;180(2):800–8.

141. Jaiswal S, Smith K, Ramirez A, Woda M, Pazoles P, Shultz LD, et al. Dengue virus infection induces broadly cross-reactive human IgM antibodies that recognize intact virions in humanized BLT-NSG mice. *Exp Biol Med*. 2015;240(1):67–78.

142. Sosa-Hernández VA, Torres-Ruiz J, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Páez-Franco JC, Meza-Sánchez DE, et al. B cell subsets as severity-associated signatures in COVID-19 patients. *Front Immunol*. 2020;11.

143. Singh P, Yao Y, Weliver A, Broxmeyer HE, Hong SC, Chang CH. Vaccinia virus infection modulates the hematopoietic cell compartments in the bone marrow. *Stem Cells*. 2008;26(4):1009–16.

144. Hermesh T, Moltedo B, Moran TM, López CB. Antiviral instruction of bone marrow leukocytes during respiratory viral infections. *Cell Host Microbe*. 2010;7(5):343–53.
145. Lam JH, Smith FL, Baumgarth N. B cell activation and response regulation during viral infections. *Viral Immunol*. 2020;33(4):294–306.
146. Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, Perng GC, Polsrila K, Chandele A, et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J Virol*. 2012;86(6):2911–8.
147. Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol*. 2022;13.
148. Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, Aldali J, Mutair AA, Alhumaid S, et al. Viral dynamics and real-time RT-PCR Ct values correlation with disease severity in COVID-19. *Diagnostics*. 2021;11(6):1091.
149. Fuller JA, Njenga MK, Bigogo G, Aura B, Ope MO, Nderitu L, et al. Association of the C T values of real-time PCR of viral upper respiratory tract infection with clinical severity, Kenya. *J Med Virol*. 2013;85(5):924–32.
150. Libraty DH, Endy TP, Houngh HH, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis*. 2002;185(9):1213–21.

Abstract

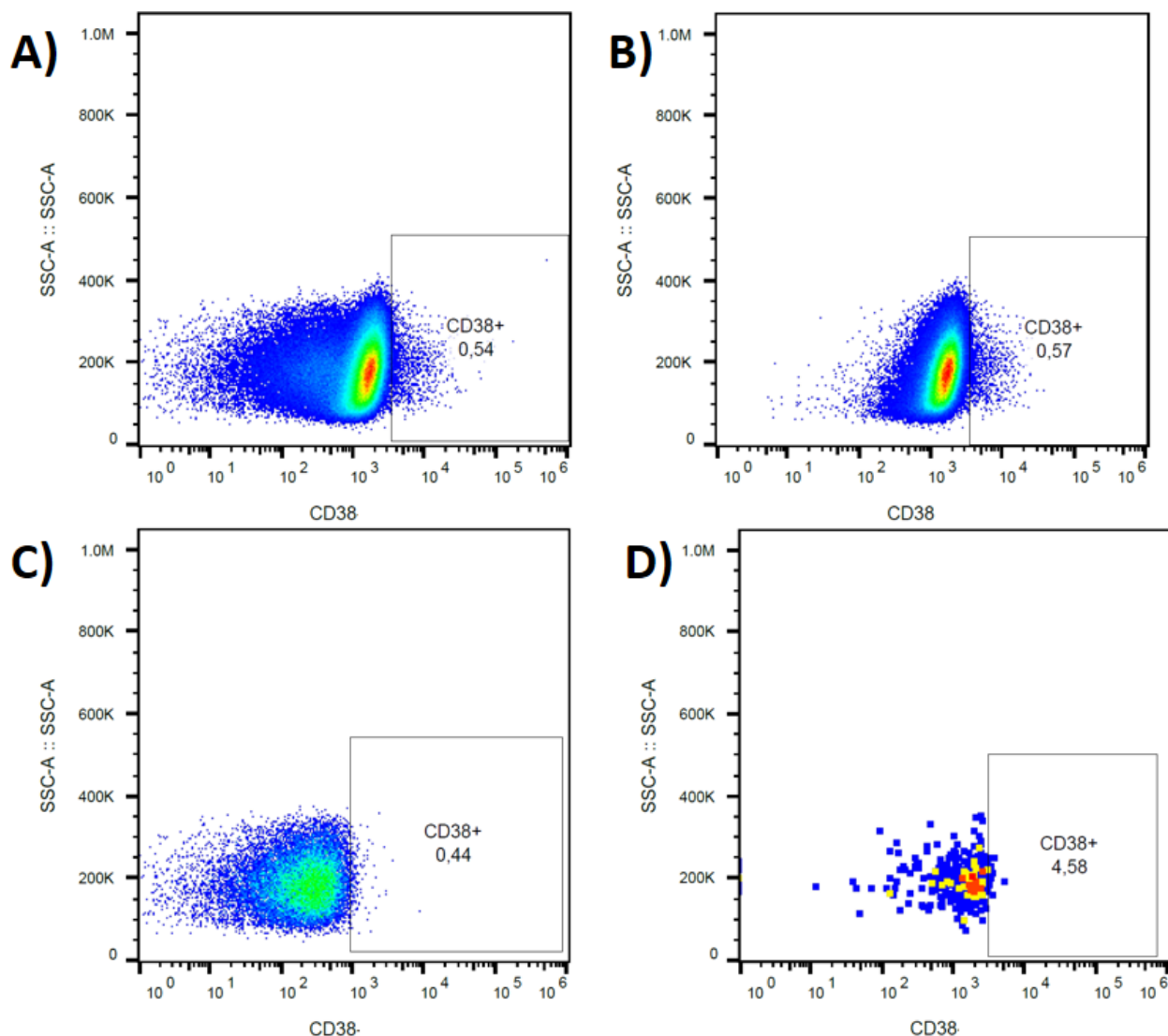
Introduction: The global spread of dengue, caused by the dengue virus and transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito, stands out as a growing concern due to the significant increase in cases, reaching 5.2 million cases only in 2019 in addition to the prevalence in 128 countries. The absence of a specific treatment emphasizes the importance of prevention and studies of the immune response in dengue to discover biomarkers and develop efficient vaccines. **Purposes:** To study the effects and changes in the frequency and activity of iNKTs (rapidly producing large amounts of cytokines) and B cells (producing antibodies) during dengue infection through the difference between patients and the non-Dengue Febrile Group. **Methods:** Peripheral blood was collected from people who sought care and hydration tents set up by Albert Einstein Hospital during the 2015 dengue outbreak in the city of São Paulo. Peripheral blood mononuclear cells were separated and later labeled for flow cytometry. Based on the laboratory tests, two groups were created: Acute Dengue and Symptomatic Non-Dengue. Cytometry data were compared using the Mann-Whitney parametric test and the Spearman test for correlation (significance $p \leq 0.05$). **Results:** All participants in the Acute Dengue Group tested positive for dengue, while none in the Febrile Group. So much so that the Acute Dengue Group showed a significant reduction in total leukocytes and platelets compared to the Symptomatic Non-Dengue. There are no differences between groups in the frequency of T lymphocytes, CD4⁺, CD8⁺ and iNKT cells, but the Acute Dengue Group shows greater activation of CD8⁺ T cells and iNKT cells, especially the CD4⁺CD8⁻ iNKT subpopulation. The Acute Dengue Group has a lower frequency of B cells, but within this population of transitional B cells and plasmablasts. Symptomatic Non-Dengue Group participants did not show any correlation between these cells, while patients in the Acute Dengue Group showed positive correlations between a higher activation state of iNKT cells and the frequencies of transitional B cells and plasmablasts. Within this positive correlation, it is observed that the higher the patients' viral load, the greater the activation of iNKT cells and the higher the frequency of plasmablasts. **Conclusions:** The activity of iNKTs cells and interaction with B cells is essential for the solution of dengue virus infection.

Keywords: Dengue; Allergy and immunology; Natural killer T-cells; Antibody-producing cells

Apêndices

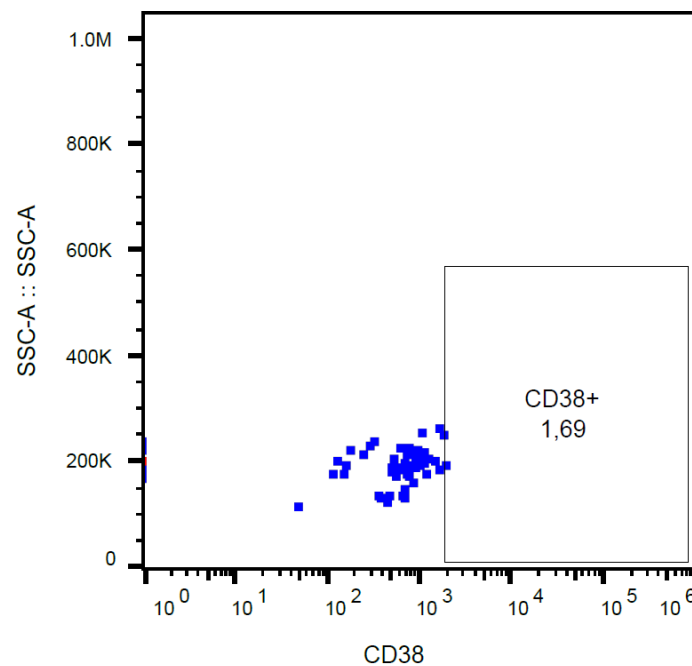
Apêndice 1. Estratégia de *gates* para *fluorescence minus one* de CD38 para linfócitos

T



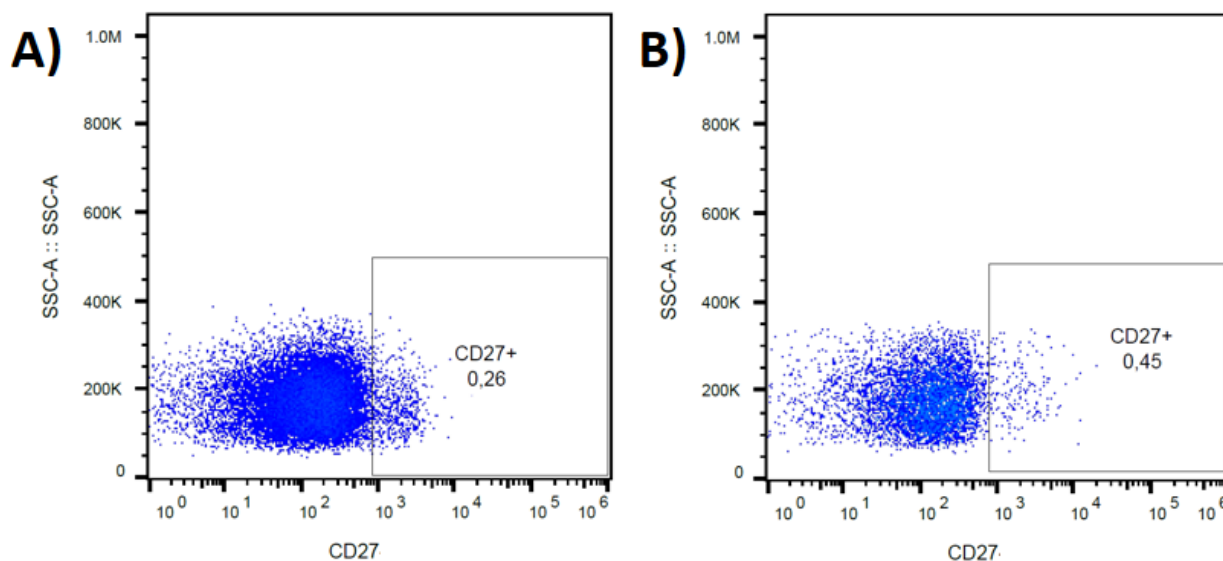
FMO CD38 para linfócitos. A estratégia de *gates* prévias são as mesmas da figura 10. **A)** SSC-A x CD38 dentro do *gate* de linfócitos T CD3⁺ de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD38. **B)** SSC-A x CD38 dentro do *gate* de linfócitos T CD4⁺CD8⁻ de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD38. **C)** SSC-A x CD38 dentro do *gate* de linfócitos T CD4⁻CD8⁺ de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD38. **D)** SSC-A x CD38 dentro do *gate* de células iNKTs de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD38.

Apêndice 2. Estratégia de *gate* para FMO de CD38 para células iNKTs duplo negativas para CD4 e CD8



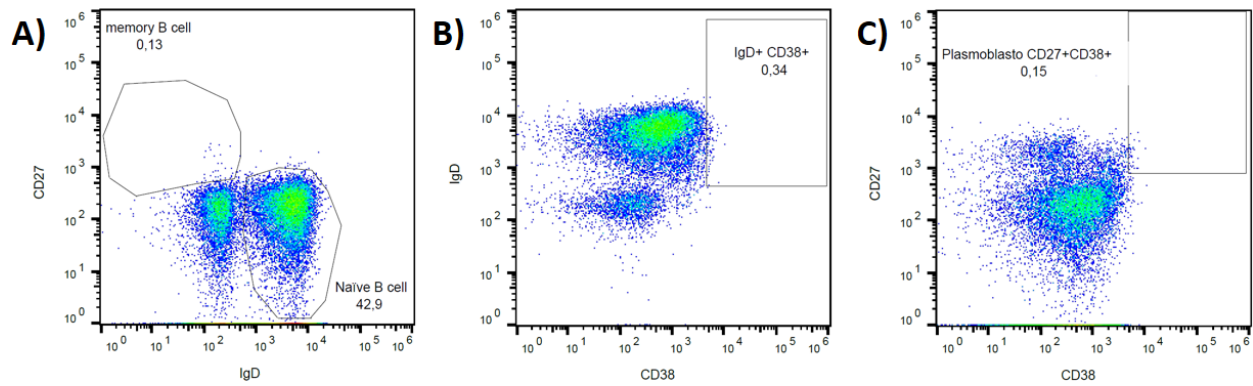
FMO CD38 para células iNKTs duplo negativas para CD4 e CD8. As estratégias de *gates* prévias são as mesmas da figura 10. A estratégia consiste de um *gate* positivo ao cruzar SSC-A x CD38 dentro do *gate* de células iNKTs CD4⁻CD8⁻ de uma amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD38.

Apêndice 3. Estratégia de *gates* para FMO de CD38 para linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺



FMO CD27 para linfócitos. As estratégias de *gates* prévias são as mesmas da figura 10. **A)** SSC-A x CD27 dentro do *gate* de linfócitos T CD4⁺CD8⁻ de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD27. **B)** SSC-A x CD27 dentro da *gate* de linfócitos T CD4⁺CD8⁺ de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD27.

Apêndice 4. Estratégia *gates* para FMO de CD38 e CD27 para diferentes populações de células B



FMO CD27 e CD38 para linfócitos B. As estratégias de *gates* anteriores são as mesmas da figura 11. **A)** CD27 x IgD dentro do *gate* de linfócitos B (CD19⁺) de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD27. **B)** IgD x CD38 dentro do *gate* de linfócitos B (CD19⁺) de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD38 e os limites para CD27 foram determinados por FMO com CD27. **C)** CD27 x CD38 dentro do *gate* de linfócitos B (CD19⁺) de amostra que não foi marcada com anticorpos anti-CD38 e os limites para CD27 foram determinados por FMO com CD27.

Apêndice 5. Quantificação de Ct PCR por paciente do Grupo Dengue Aguda

Identificação amostra <i>FlowJo</i>	Nº Identificação REDCap	Ct PCR
Amostra 07 - dengue aguda	3184	36,7
Amostra 08 - dengue aguda	528	32,4
Amostra 12 - dengue aguda	533	28,7
Amostra 16 - dengue aguda	588	31,7
Amostra 17 - dengue aguda	621	24,5
Amostra 18 - dengue aguda	625	33,1
Amostra 24 - dengue aguda	3275	27,4
Amostra 25 - dengue aguda	3276	32,4
Amostra 30 - dengue aguda	640	31,1
Amostra 32 - dengue aguda	792	38,2
Amostra 33 - dengue aguda	794	37,3
Amostra 40 - dengue aguda	814	34,8
Amostra 41 - dengue aguda	816	22,3
Amostra 44 - dengue aguda	825	34,1
Amostra 45 - dengue aguda	2999	31,6
Amostra 46 - dengue aguda	3005	23,9
Amostra 47 - dengue aguda	3026	35
Amostra 53 - dengue aguda	3088	32
Amostra 54 - dengue aguda	3091	32,9
Amostra 55 - dengue aguda	3098	31,2
Amostra 61 - dengue aguda	3004	28,7
Amostra 65 - dengue aguda	538	30,1
Amostra 66 - dengue aguda	848	22,7
Amostra 2 - 3284 - paciente V1	3284	17,1
Amostra 3 - 3039 - paciente V1	3039	23,1
Amostra 4 - 3042 - paciente V1	3042	23
Amostra 14 - 3010 - paciente V1	3010	25,9
Amostra 23 - 3302 - paciente V1	3302	26,4
Amostra 24 - 3278 - paciente V1	3278	32,7
Amostra 27 - 3211 - paciente V1	3211	19,5
Amostra 31 - 3146 - paciente V1	3146	15,6
Amostra 42 - 3178 - paciente V1	3178	22,2
Amostra 46 - 3175 - paciente V1	3175	20,9