



## CITOCINAS NA DENGUE: INOVAÇÕES DO SISTEMA IMUNE<sup>1</sup>

Maria Raika Guimarães Lobo<sup>2</sup>, Sylvania da Conceição Furtado<sup>3</sup>, Jaime Ribas Galvão Júnior<sup>4</sup>, Lucia de Paula<sup>5</sup> e José Fernando Marques Barcellos<sup>6</sup>

*Submetido 22/11/2013 – Aceito 18/12/2013 – Publicado on-line 03/04/2014*

### Resumo

A dengue é uma doença febril aguda causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, endêmica nas regiões tropicais do globo. O agente é um vírus do tipo 1, com RNA de fita simples, classificado em quatro sorotipos distintos DENV1, 2, 3 e 4. As respostas imunológicas inatas e adaptativas do hospedeiro exercem importante função na determinação na história natural das infecções virais, especialmente na dengue. As respostas Th1/Th2 na dengue não contemplam todos os aspectos observados nessa doença, mantendo lacunosa algumas questões que abrangem os mecanismos imunológicos. Diversos mecanismos têm sido propostos a fim de explicar a resposta imunológica ao DENV e de que forma estão relacionadas à exacerbação dos quadros com as formas clínicas apresentadas pelo doente no decorrer do quadro viral. Também tem sido postulado que a produção de citocinas por células infectadas DV desempenham um papel importante na patogênese do quadro de dengue grave. Entre esses podemos citar: a influência das respostas inata e adaptativa na exacerbação dos quadros em relação ao tempo de viremia; a ocorrência das formas graves da dengue e a associação com a especificidade viral e a ingerência de outros tipos de resposta imune adaptativas, como as células T regulatórias e outros tipos de respostas T “helper”. Nesta revisão serão abordados os aspectos da resposta imunológica ao vírus da dengue, suas correlações com as respostas imunológicas Th1 e Th2, enfatizando os mecanismos de opugnação (agressão) do vírus ao hospedeiro e as pesquisas recentes relativas à resposta Th17.

**Palavras-Chave:** Febre da dengue, Citocinas, Imunomodulação.

### Abstract

Dengue fever is an acute febrile illness caused by a virus of the genus *Flavivirus*, family Flaviviridae, is endemic in tropical regions of the globe. The agent is a virus type 1, with single-stranded RNA, classified into four distinct serotypes DENV 1, 2, 3 and 4. The innate and adaptive immune responses of the host play an important role in determining the natural history of viral infections, especially dengue. The Th1/Th2 responses in dengue do not include all the aspects observed in this disease, keeping blanked some questions that cover the immunological mechanisms. Several mechanisms have been proposed to explain the immune response to DENV and how they are related to panel exacerbation with clinical forms presented by the patient in the course of viral infection. It has also been postulated that cytokine production by infected DV cells play an important role in the pathogenesis of severe dengue symptoms. Among these we can mention: the influence of innate and adaptive responses in the exacerbation of the panel with regard to the time of viremia, the occurrence of severe forms of dengue and its association with viral specificity and interference from other types of adaptive immune response, such as T regulatory cells responses and other types of T helper. In this review will be discussed aspects of immune response to dengue virus, their correlations with the Th1 and Th2 immune responses will be, emphasizing the opugnation mechanisms (agression) of the virus to the host and the recent research on the Th17 response.

**Key-words:** Dengue fever, Cytokines, Immunomodulation.

<sup>1</sup> Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor no Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. Gal Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, 69077-000

<sup>2</sup> Mestranda do PPGIBA, UFAM e-mail: raikaguimaraes@hotmail.com

<sup>3</sup> Doutoranda em Bases Gerais da Cirurgia, e-mail: sylvania\_furtado@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Acadêmico de Medicina UFAM, e-mail: Jaime.ribas@hotmail.com

<sup>5</sup> Doutora e Pesquisadora da UFAM E-mail: l.bio@hotmail.com

<sup>6</sup> Doutor e Pesquisador da UFAM0 e Professor PPGIBA, UFAM, e-mail: f.marques123@gmail.com



## 1. Introdução

A dengue é considerada um problema de saúde pública global. É uma arbovirose acometendo em especial, populações residentes nas regiões tropicais e subtropicais, em função das melhores condições climáticas para o desenvolvimento do seu vetor, responsável pela transmissibilidade da doença (WORLD, 2012).

Aproximadamente 40% da população mundial se encontram em áreas de risco com possibilidade de adquirir a doença, representando 2,5 bilhões de pessoas a cada ano. Destas, estima-se que 500.000/ano desenvolvam o quadro de dengue grave necessitando de hospitalização e aproximadamente 2,5% evoluem a óbito (WORLD, 2012).

A doença pode cursar desde formas assintomáticas ou ainda evoluir em prognóstico negativo para quadros múltiplos, dentre eles: a febre da dengue (FD) ou nas formas graves da doença: a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD) (GUZMÁN; KOURI, 2002).

O agente causador da doença é um vírus do tipo 1, com RNA de fita simples, pertencente à família *Faviviridae* do gênero *Flavivirus* sp., classificados em quatro sorotipos distintos DENV (1, 2, 3 e 4) sendo todos capazes de causar doença, e caracterizados como distintos entre si (GUBLER, 1998).

O vetor responsável pela transmissibilidade da doença é o mosquito *Aedes aegypti*, espécie totalmente adaptada ao meio urbano e amplamente distribuída nas regiões climáticas supracitadas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A fêmea hematófaga adquire o vírus ao se alimentar do sangue de doente que se encontra na fase de viremia. Fase essa que começa um dia antes do surgimento da febre e vai até o sexto dia de doença. O vírus localiza-se nas glândulas salivares do mosquito, onde se prolifera e permanece, deixando o hospedeiro infectante durante toda a vida (DA SILVA CORDEIRO, 2008).

Um estudo realizado, em 2011, na cidade de Manaus-AM, revelou a situação atual da dengue neste local. Pacientes com a doença febril aguda foram testados para dengue e 31,7 % foram positivos. Destes, 37,0% tinham DENV-2, 22,6% tinham DENV-4, 16,0% tinham DENV-3 e 12,4% tinham DENV-1. Coinfecções por mais de um sorotipo de DENV também foi observada: DENV-

4 e 3 em 4,5% casos, DENV-1 e 4 em 3,8% dos casos, DENV-1 e 2 em 2,2% dos casos e DENV-2 e 3 em 1,5% dos casos. Este foi o primeiro estudo sobre a circulação simultânea dos quatro sorotipos de dengue no mesmo lugar no Brasil, fornecendo claras evidências de sua hiperendemicidade, e possível aumento na morbidade com o desenvolvimento de formas graves da doença e mortalidade (FIGUEIREDO, 2012).

Apesar dos mecanismos de respostas imunológicas não estarem completamente elucidados, é possível afirmar que as respostas imunológicas inata e adaptativa do hospedeiro exercem importante função na determinação na história natural das infecções virais, especialmente na dengue. A resposta imune inata é induzida rapidamente e age como uma primeira-linha de defesa até que a resposta imune adaptativa específica passe a agir. Diferenças nas respostas mediadas por anticorpos, células T e citocinas podem ser percebidas entre pacientes com febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) (SENEVIRATNE; MALAVIGE et al., 2006).

As respostas Th1/Th2 na dengue não contemplam todos os aspectos observados nessa doença, mantendo lacunosa algumas questões que abrangem os seus mecanismos imunológicos. Entre eles podemos citar: a influência das respostas inata e adaptativa na exacerbação dos quadros em relação ao tempo de viremia; a ocorrência das formas graves da dengue e a associação com a especificidade viral e a ingerência de outros tipos de resposta imune adaptativas, como as células T regulatórias e outros tipos resposta T “helper”.

Nesta revisão serão abordados os aspectos da resposta imunológica ao vírus da dengue, abordando as correlações com as respostas imunológicas Th1 e Th2, enfatizando os mecanismos de opugnação (agressão) do vírus ao hospedeiro, e as pesquisas recentes relativas à resposta Th17.

## 2. Classificação da doença

A expansão da dengue, geográfica e demograficamente, ressalta a necessidade de uma avaliação das classificações clínicas em relação a sua aplicabilidade e utilidade no manejo clínico e nas pesquisas (SRIKIATKHACHORN; ROTHMAN et al., 2011).

A Organização Mundial de Saúde publicou em 1975 e atualizou em 1997 a base para

a classificação clínica da dengue (ASIAN; REGIONS, 1975; ORGANIZATION, 1997). Assim, a dengue sintomática foi classificada clinicamente em febre da dengue (FD) e febre hemorrágica da dengue (FHD)(ASIAN; REGIONS, 1975).

A febre da dengue é definida como uma doença febril com pelo menos dois achados clínicos, incluindo náusea, vômitos, dor de cabeça, artralgia, dor retro-orbital, erupções cutâneas ("rash"), mialgia, manifestações hemorrágicas e leucopenia. Por falta de especificidade destes sinais clínicos e sintomas, evidências laboratoriais ou epidemiológicas de infecção pelo vírus da dengue são necessárias para se confirmar o diagnóstico (NGUYEN; NGUYEN et al., 1997). A definição de FHD consiste em quatro critérios clínicos: febre, tendência hemorrágica (sangramento espontâneo ou um resultado positivo no teste do torniquete), trombocitopenia (contagem de plaquetas  $\leq 100.000$  células/mm<sup>3</sup>), e extravasamento de plasma como pela efusão pleural, ascite ou hemoconcentração  $\geq 20\%$  (SRIKIATKHACHORN; ROTHMAN et al., 2011).

A última classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde, elaborada em 2009, divide a apresentação clínica em dengue e dengue grave (dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue) (ORGANIZATION, 2009). A definição de dengue (não grave) é algo similar à antiga classificação de febre da dengue: uma combinação de dois ou mais sinais e sintomas junto com uma febre individual, em uma área endêmica. Acrescenta-se ainda como sinais de alarme, dor e sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acumulação clínica de fluídos, sangramento de mucosas, letargia, agitação e aumento do fígado, que podem estar presentes ou não (RESEARCH; DISEASES et al., 2009)

A dengue grave acontece em casos que incluem qualquer um dos seguintes sinais: extravasamento de plasma levando ao choque ou dificuldade respiratória, sangramento grave, ou [3] falência orgânica (níveis elevados das enzimas hepáticas, alteração do nível de consciência ou insuficiência cardíaca) (RESEARCH; DISEASES et al., 2009).

### 3. Fisiopatogênese e Aspectos Imunológicos

A fisiopatogenia da resposta imunológica à infecção aguda por dengue pode ser primária ou

secundária. A resposta primária ocorre em pessoas não expostas anteriormente e o título de anticorpos eleva-se lentamente. Já na resposta secundária, o nível de anticorpos aumenta rapidamente, indicando infecção prévia por qualquer um dos sorotipos virais (ABE; MARQUES et al., 2012).

Existem pelo menos três teorias conhecidas que buscam explicar a ocorrência de febre hemorrágica da dengue (FHD), porém, nenhuma delas isoladamente é capaz de explicar a forma grave da doença e seu desenvolvimento em cada indivíduo (WHITEHORN; FARRAR, 2010). A primeira é relacionada à virulência da cepa infectante, de modo que as formas mais graves sejam resultantes de cepas extremamente virulentas (KUMARIA, 2010). A segunda postula que a forma grave da doença é relacionada a infecções sequenciais por diferentes sorotipos, com intervalos de três meses a cinco anos. Nessa teoria, a resposta imunológica, na segunda infecção, seria exacerbada e resultaria na gravidade da doença. A terceira teoria, mais aceita atualmente, é a Teoria Integral de Multicausalidade, proposta por pesquisadores cubanos. Nesta, aliam-se vários fatores de risco às teorias de infecções sequenciais e de virulência da cepa. A interação desses fatores de risco promoveria condições para a ocorrência de FHD (PALACIOS SERRANO; VARGAS CABALLERO et al., 2001).

Após a picada de um mosquito infectado, o vírus da dengue entra no corpo e se replica no interior das células de linhagem mononuclear fagocitária (macrófagos e monócitos) e células B. Ocorre também a infecção de mastócitos, células dendríticas e células endoteliais (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004). Os monócitos e as células dendríticas infectadas produzem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que, juntamente com as células T ativadas, acredita-se que causem disfunção endotelial. A disfunção endotelial leva a um aumento da permeabilidade vascular, que é a marca da FHD; isso provoca extravasamento vascular, acúmulo de líquido nas cavidades pleural e peritoneal e também choque (MALAVIGE; OGG, 2012).

Anticorpos desenvolvidos no primo-infecção por dengue podem não neutralizar um segundo vírus, de tipo diferente e em muitos casos, paradoxalmente, amplificam a infecção, facilitando que penetre em macrófagos o novo tipo infectante (FIGUEIREDO, 2006). Os vírus,

para tanto, utilizam os receptores de membrana Fc $\gamma$ . O estímulo causado pela liberação de IFN- $\gamma$  por células CD4<sup>+</sup> (Th1) ativadas agrava este quadro porque aumentam a exposição de Fc $\gamma$  na membrana dos macrófagos tornando-os mais suscetíveis ao vírus (FIGUEIREDO, 2006).

Indivíduos com FHD/SCD possuem macrófagos maciçamente infectados e produzem viremia elevada. A presença aumentada de moléculas HLA das classes I e II nos macrófagos estimulados pelo IFN- $\gamma$  facilita o reconhecimento de epítomos virais pelos linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que passam a induzir a eliminação dos macrófagos infectados. Por sua vez, os macrófagos, ativados e agredidos ou lisados pelas células citotóxicas, liberam tromboplastina, iniciando fenômenos da coagulação e proteases ativadoras do complemento, causadoras de lise celular. TNF- $\alpha$ , de origem macrofágica e linfocitária, em níveis elevados, afetam células inflamatórias endoteliais e contribui para a trombocitopenia. TNF- $\alpha$  também induz produção de CXCL-8 (anteriormente, IL-8), que estimula liberação de histamina por basófilos, aumentando a permeabilidade vascular. Portanto, resultam deste fenômeno uma síndrome de extravasamento capilar sem destruição endotelial que causa hipotensão e hemorragias com trombocitopenia (FONSECA; FIGUEIREDO et al., 2006).

#### 4. Resposta mediada por Anticorpos

Quando se fala das respostas ao vírus da dengue mediadas por anticorpos em humanos, os principais alvos são o precursor da membrana (Pré-M), as proteínas estruturais do envelope (E) e as proteínas não estruturais 1, 2 e 3 (respectivamente NS1, NS3 e NS5) (ROTHMAN, 2011).

Uma extensa caracterização dos parátomos de células B tem sido feita para a glicoproteína E, que é o principal componente de superfície do vírus da dengue (ROTHMAN, 2011). Os epítomos presentes na glicoproteína E são capazes de induzir anticorpos neutralizantes, homólogos e heterólogos, fazendo com que pessoas infectadas com um sorotipo mantenham a imunidade protetora para o resto da vida para a infecção pelo vírus homólogo, embora a imunidade protetora com sorotipo heterólogo seja baixa (CRUZ, 2005). Devido à conformação dimérica da proteína E na superfície do vírus, nem todos os epítomos são acessíveis para a ligação por anticorpos (ROTHMAN, 2011). Essa pode ser

uma das explicações para a ineficiência da imunidade contra sorotipos heterólogos.

A proteína pré-M forma um heterodímero com a proteína E durante montagem do vírion inicial e é subsequentemente clivada por células do hospedeiro durante a fase final da maturação do vírion. Depois da clivagem, o fragmento remanescente (a proteína M) está completamente oculto pelos dímeros da proteína E do vírion maduro e torna-se inacessível para a ligação do anticorpo. Os anticorpos neutralizantes são direcionados contra a proteína E e agem em todos os epítomos próximos (ROTHMAN, 2011).

Após a infecção primária pelo vírus da dengue, são formados anticorpos contra proteínas virais estruturais e não estruturais. Os anticorpos contra o NS1 viral tem demonstrado induzir apoptose de células endoteliais de maneira caspase-dependente (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004).

Depois da ligação com o antígeno, as diferentes subclasses de IgG variam em sua capacidade de ativar a via Clássica do Complemento; IgG1 tem sido bastante efetiva, enquanto IgG2 tem sido menos. Altos níveis de IgG1 e IgG4 específicos e baixos níveis de IgG2 são observados em pacientes com FHD e SCD comparados com aqueles com FD (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004).

Os pacientes com FHD e SCD apresentam níveis de IgE totais e dengue-específicos muito mais aumentados que os pacientes com FD. Além disso, os níveis totais de IgE são significativamente superiores aos níveis daqueles expostos previamente a infecções da dengue (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004).

Vários graus de trombocitopenia são comuns na FHD e alguns dos mecanismos responsáveis por essa queda incluem: IgM antiplaquetas, anticorpos específicos ao vírus da dengue, hiperplasticidade da medula óssea (acarretando em defeitos nos megacariócitos), ou destruição das plaquetas no fígado e no baço. Anticorpos antiplaquetas causam lise de plaquetas na presença do Complemento. O sorotipo DENV-2 se liga as plaquetas humanas somente na presença de anticorpo específico ao vírus (MALAVIGE; OGG, 2012).

A alta avidéz dos anticorpos, particularmente aqueles específicos para os epítomos no domínio III da proteína E, parecem ser mais efetivos em prevenir a infecção e/ou a doença (SUKUPOLVI-PETTY; AUSTIN et al.,





2010). Os anticorpos específicos para NS1 controlam a lise dependente de Complemento nas células infectadas (SCHLESINGER; BRANDRISS et al., 1987), mas não elucidam completamente os efeitos protetores do Sistema Complemento (ROTHMAN, 2011).

### **5. Restrição da replicação viral do DENV pela resposta imune inata**

Em muitas células o DENV é um potente indutor de interferon (IFN) tipo 1, que parece ser mediado pelo reconhecimento do RNA viral pela via padrão de reconhecimento dos receptores RIG-1 (“retinoic-acid-inducible protein 1”), Mda-5 (“melanoma-differentiation-associated gene 5”) e TLR3 (“Toll-Like Receptor 3”) de maneira cooperativa (NASIRUDEEN; WONG et al., 2011). Uma notável exceção talvez sejam as células dendríticas onde um bloqueio da produção de IFN tipo 1 pelo DENV tem sido descrita, possivelmente contribuindo para a evasão do sistema imune (RODRIGUEZ-MADOZ; BELICHA-VILLANUEVA et al., 2010).

Os interferons induzem genes que controlam a infecção do DENV de maneira tempo-dependente. De fato, a ativação de genes estimulados por IFN antes da infecção protege as células contra o DENV, enquanto que poucas horas antes da infecção as células são largamente resistentes não só contra o tipo 1 mas também contra o tipo 2 de DENV (MUÑOZ-JORDÁN, 2010). Esta resistência é produzida por várias estratégias antivirais como:

a) Enfraquecimento da fosforilação de STAT-1 (“Signal Transducers and Activators of Transcription”) por NS2A (“Flavivirus nonstructural protein 2A”), NS4A (“Flavivirus nonstructural protein 4A”) e especialmente NS4B (MUÑOZ-JORDÁN; SÁNCHEZ-BURGOS et al., 2003);

b) Bloqueio da fosforilação de Tyk2 (“Tyrosine-protein kinase 2”) (HO; HUNG et al., 2005);

c) Enfraquecimento da produção de IFN pela protease NS2B-3 (RODRIGUEZ-MADOZ; BELICHA-VILLANUEVA et al., 2010) e

d) Rápida redução da abundância de STAT-2, mediada pela ligação de NS5 e a subsequente degradação de STAT-2 pela via proteossômica (ASHOUR; LAURENT-ROLLE et al., 2009; MAZZON; JONES et al., 2009), explicando a ausência de STAT-2 em células infectadas (JONES; DAVIDSON et al., 2005).

Curiosamente, a expressão de NS5 é suficiente para a ligação de STAT-2, mas não para a sua degradação (ASHOUR; LAURENT-ROLLE et al., 2009). Finalmente, a degradação de STAT-2 é espécie-específica e observada em humanos infectados com DENV, mas não em células de camundongos, argumentando-se que a resposta viral mediada pelo STAT-2 potencialmente controla a replicação do DENV em camundongos (ASHOUR; MORRISON et al., 2010).

### **6. Evasão do sistema imune inato pelo vírus da dengue**

Acredita-se que as primeiras células do sistema imune a encontrar o vírus são as células de Langerhans na pele (LIMON-FLORES; PEREZ-TAPIA et al., 2005), macrófagos (JESSIE; FONG et al., 2004) e células dendríticas (RODRIGUEZ-MADOZ; BERNAL-RUBIO et al., 2010), causando viremia nos pacientes, permitindo a transmissão para os próximos hospedeiros pelos mosquitos.

O sistema de sinalização do interferon tipo 1 (IFN1) é essencial para a capacidade do sistema imune inato de criar um estado antiviral (PAGNI; FERNANDEZ-SESMA, 2012). Após a infecção com o vírus da dengue, células dendríticas derivadas de monócitos (MDDCs) expressam muitas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFI56K (“Interferon-induced 56-kDa protein”), TNF- $\alpha$ ; quimiocinas CXCL-8 (anteriormente, IL-8) e CCL-4 (MIP-1 $\beta$  – “Macrophage inflammatory protein”); RIG-I, CD86 e STAT-1 (RODRIGUEZ-MADOZ; BERNAL-RUBIO et al., 2010). Uma vez infectadas pelo vírus da dengue (DENV), as células dendríticas são incapazes de produzir IFN, mesmo após estimulação por indutores fortes de IFN de tipo I, tais como as infecções pelo vírus da doença de Newcastle, vírus Semliki Forrest e vírus Sendai, sugerindo que o DENV é um forte inibidor de IFN (PAGNI; FERNANDEZ-SESMA, 2012). Além disso, a inibição da produção de IFN tipo I pelo DENV em células dendríticas as torna ineficientes em diferenciar células T em células Th tipo 1 (RODRIGUEZ-MADOZ; BERNAL-RUBIO et al., 2010).

Além de antagonizar a produção de IFN tipo I, o DENV também inibe a sua sinalização. Estudos mostraram que o DENV pode bloquear a sinalização de IFN $\alpha/\beta$  (interferons do tipo I), mas não consegue bloquear IFN $\gamma$ , sinalizado através de STAT2 (PAGNI; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

Foi identificado que NS2A, NS4B e NS5 são capazes de bloquear a sinalização do IFN; a expressão dessas proteínas em células que foram infectadas com vírus IFN-sensível resgatou a replicação destes vírus, mostrando que essas proteínas não estruturais foram responsáveis em suprimir a sinalização de IFN. Curiosamente, a expressão isolada de NS4B resultou em “down-regulation” na expressão dos genes estimuladores de interferon, sugerindo que esta proteína por si só é um potente antagonista de IFN, através da “down-regulation” da expressão de STAT1 (MUÑOZ-JORDÁN; LAURENT-ROLLE et al., 2005).

## 7. Resposta mediada por células T

As células T específicas para o vírus da dengue reconhecem células infectadas pelo vírus e respondem com um conjunto diversificado de funções efetoras, incluindo proliferação, lise de células-alvo e a produção de uma variedade de citocinas (ROTHMAN, 2011).

Uma ampla variedade de citocinas é produzida por células T específicas para o vírus da dengue em resposta ao reconhecimento dos complexos MHC-peptídeo nas células-alvo. Para a maioria das células T estudadas, o padrão de produção de citocinas segue um perfil T “helper” 1 (Th1) ou Th0. Assim, essas células T produzem IFN $\gamma$ , TNF, IL-2 e ligante CC-quimiocina 4 (CCL4), enquanto que a produção das citocinas do tipo Th2, como a IL-4, é menos comum (MONGKOLSAPAYA; DEJNIRATTISAI et al., 2003; MANGADA; ROTHMAN, 2005; BASHYAM; GREEN et al., 2006; DONG; MORAN et al., 2007).

Como é um caso de anticorpos específicos para o vírus da dengue, diferenças nos aminoácidos entre os sorotipos podem afetar a avidéz da interação entre os complexos MHC-peptídeo nas células infectadas por vírus da dengue e os receptores das células T dos clones individuais de células T específicas do vírus, e isso acarreta consequências funcionais (ROTHMAN, 2011).

A indução da produção de IFN- $\gamma$  requer uma concentração relativamente alta de peptídeos, enquanto que progressivamente menores concentrações de peptídeo são necessárias para induzir a produção de TNF e CCL4 (FRIBERG; BURNS et al., 2011). Variantes de peptídeos encontrados em diferentes sorotipos de vírus da dengue agem como ligantes modificados de peptídeos, deslocando a curva dose-resposta do peptídeo em direção ao aumento ou diminuição da capacidade de resposta da célula T (MANGADA; ROTHMAN, 2005; IMRIE; MEEKS et al., 2007; FRIBERG; BURNS et al., 2011).

Diversos estudos demonstraram que a produção de IFN- $\gamma$  por células T específicas para o vírus da dengue está presente seguindo a imunização, mas o IFN- $\gamma$  não foi comprovado como sendo essencial em seu efeito protetor (LAZO; GIL et al., 2010; ROTHMAN, 2011).

Tal como acontece com as respostas protetoras das células T, os estudos associados com antígeno leucocitário humano (HLA) fornecem evidências adicionais de que as respostas mediadas por células T podem determinar uma consequência clínica mais grave (ROTHMAN, 2011).

Um efeito protetor das células T específicas para o DENV pode também ser inferido a partir de estudos da associação de HLA com a dengue. Alelos HLA específicos foram significativamente mais comuns entre pacientes com FD do que entre aqueles com febre hemorrágica da dengue grave (STEPHENS, 2010). Epítomos de células T foram definidos para esses alelos (ou grupos de alelos) incluindo HLA-A\*0203, HLA-A\*29, HLA-A\*33, HLA-B\*13, HLA-B\*15, HLA-B\*44, HLA-B\*52, HLADRB1\*04, HLA-DRB1\*07 e HLA-DRB1\*09, mas nenhum dado é capaz de implicar os epítomos específicos em qualquer efeito protetor (STEPHENS, 2010).

As citocinas derivadas das células T possuem efeitos pleiotrópicos, incluindo a indução ou aumento da inflamação e alteração da permeabilidade vascular. A infusão tanto de IL-2 quanto de TNF pode induzir um extravasamento vascular sistêmico, e isso promove uma base teórica para a participação das células T na patogênese da FHD (ATKINS; DUTCHER et al., 2001).

A mais de uma década as pesquisas nesta linha avançam, quando avaliando também a presença de altos níveis das formas solúveis de

moléculas da superfície de células T (tais como CD4 solúvel, CD8 solúvel e IL-2R solúvel) em pacientes com FHD sendo um indicativo de ativação destas células T (KURANE; INNIS et al., 1991; LIBRATY; ENDY et al., 2002). Além disso, a frequência de células T ativadas (como determinado pela expressão do marcador de ativação CD69 nas células T do sangue periférico) foi demonstrada como sendo significativamente alta em pacientes com FHD quando comparada a FD (GREEN; PICHYANGKUL et al., 1999).

Estudos indicam associação entre FHD e HLA-A2, embora um estudo em pacientes vietnamitas tenha falhado em demonstrar essa ligação (LOKE; BETHELL et al., 2001). Um estudo mais detalhado utilizando tipagem celular de alta resolução para HLA-A2 encontrou uma associação positiva da FHD com o HLA-A\*0207 e uma associação negativa com o HLA-A\*0203 (STEPHENS; KLAYTHONG et al., 2002). Outro grupo de alelos que também eram mais frequentes em pacientes com FHD do que em pacientes com FD ou em controles individuais em pelo menos um estudo são HLA-A\*01, HLA-A\*24, HLA-A\*31, HLA-B\*15, HLA-B\*46 e HLA-B\*51 (STEPHENS, 2010).

### 8. Células T “helper”

Há mais de duas décadas as células T “helper” CD4<sup>+</sup> foram classificadas em dois subgrupos principais de acordo com suas citocinas secretadas (GUPTA; CHATURVEDI, 2009).

As células Th1 secretam IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\beta$  e são responsáveis pelas reações inflamatórias mediadas por células, hipersensibilidade do tipo retardada e lesão tissular em infecções e doenças autoimunes. As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6 IL-10 (atualmente relacionada à Treg) e IL-13 e estão associadas com a produção de anticorpos por células B. Infecções com uma resposta imune humoral dominante induzem uma alta expressão de citocinas relacionadas à Th2, enquanto as de resposta de hipersensibilidade do tipo retardada, exibem uma alta expressão das citocinas Th1. Em infecções virais como a dengue, herpes simples e influenza, por exemplo, a resposta Th1 está ligada a recuperação da infecção enquanto uma resposta tipo Th2 leva a exacerbação da doença (GUPTA; CHATURVEDI, 2009).

### 9. Citocinas envolvidas na resposta ao DENV

Na infecção pelo DENV as citocinas podem ser liberadas diretamente de monócitos e macrófagos como resultado da infecção ou após interações entre células imunes e infectadas, ou ambas. Como já comentado, essas células podem induzir extravasamento de plasma, aumento de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  em casos de FHD. Todos esses fatores estão envolvidos no desencadeamento das síndromes hemorrágicas por DENV (CRUZ, 2005).

As concentrações séricas de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  são muito altas nos primeiros três dias da doença, enquanto IL-10, IL-5 e IL-4 tendem a aparecer mais tarde. IL-2 e IFN- $\gamma$  são oriundos de resposta Th1, enquanto IL-5 e IL-4 são oriundos de resposta Th2. Assim, sugeriu-se que as respostas Th1 são vistas durante os primeiros três dias e as respostas Th2 ocorrem posteriormente. Níveis aumentados de IL-13 e IL-18 também foram descritos durante a dengue grave, com os mais altos níveis vistos em pacientes com grau IV de FHD (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004).

Os níveis séricos de IL-12 são altos em pacientes com FD, mas indetectáveis em pacientes com graus 3 e 4 de FHD. Os níveis de TGF- $\beta$  (inibidor de citocinas Th1 e potencializador de citocinas Th2) correlacionam-se com a severidade da doença e mostram uma relação inversa com os níveis de IL-12 (MUSTAFA; ELBISHBISHI et al., 2001). Estes estudos sugerem que a resposta predominantemente Th2 ocorre na FHD/SCD, enquanto que as respostas Th1 parecem proteger contra as infecções severas (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004).

Pacientes com FHD apresentam altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-13, IL-18 e fator citotóxico, comparados com aqueles com FD. Essas citocinas têm sido implicadas no aumento da permeabilidade vascular e no choque durante as infecções da dengue (MUSTAFA; ELBISHBISHI et al., 2001). Além disso, o fator citotóxico, produzido pelas células T CD4<sup>+</sup>, induz os macrófagos a produzir as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ ) e da quimiocina CXCL-8 (anteriormente IL-8). Níveis do fator citotóxico correlacionam-se com a severidade da doença (sendo altos em pacientes com grau IV de FHD). Os anticorpos contra fator citotóxico protegem contra a doença grave; altos níveis são



detectados em pacientes com a doença branda (CHATURVEDI; ELBISHBISHI et al., 2001).

As concentrações séricas de IL-6 são altas em pacientes com FHD e SCD (JUFFRIE; MEER et al., 2001). A IL-6 é produzida principalmente pelos macrófagos, células endoteliais e células T. Ela também aumenta a permeabilidade celular endotelial. As células endoteliais também produzem CXCL-8, que tem potente atividade pró-inflamatória e quimiotática. Neutrófilos ativados liberam proteinases como elastase, que pode facilitar a lesão endotelial mediada por neutrófilo, a coagulação e os sistemas fibrinolíticos. Como informado anteriormente, os linfócitos infectados pelo DENV produzem tanto IFN- $\alpha$  quanto IFN- $\gamma$  (KURANE; MEAGER et al., 1986). IFN- $\alpha$  inibe a infecção dos monócitos pelo vírus da dengue e consequentemente é importante no controle da dengue primária (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004). Embora os níveis de IFN- $\alpha$  sejam mais altos na FHD do que na FD, não são vistas diferenças nos níveis de IFN- $\gamma$  entre pacientes com FD ou FHD. O IFN- $\gamma$  é produzido precocemente no curso da infecção. Os picos ocorrem no dia ou logo antes da diminuição da temperatura corporal e coincidem com o desaparecimento da viremia (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004).

As células dendríticas infectadas com o vírus da dengue produzem altos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ , mas baixos níveis de IL-12. Os baixos níveis de IL-12 na FHD são devidos provavelmente a uma falha da sua indução por IFN- $\gamma$  (LIBRATY; PICHYANGKUL et al., 2001). Estudos sugerem que o IFN- $\gamma$  causa regulação positiva dos Fc $\gamma$ R nos monócitos e consequentemente aumentam a infecção viral (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004). O TNF- $\alpha$  prolonga a sobrevivência das células dendríticas por causar um “up-regulation” nos fatores antiapoptóticos dentro dessas células. O prolongamento da sobrevivência das células dendríticas infectadas com o vírus da dengue pode contribuir para a evolução da dengue grave (HO; WANG et al., 2001).

As concentrações séricas de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e receptor de TNF solúvel (sTNF-R p75) são significativamente altas em pacientes com dengue, comparados com os controles normais (sadios). Níveis aumentados de TNF- $\alpha$  e IL-10 correlacionam-se com manifestações hemorrágicas e diminuição de plaquetas, respectivamente. A IL-10 pode também causar

“down-regulation” na função das plaquetas e assim contribuir com os defeitos das plaquetas associados à dengue (AZEREDO; ZAGNE et al., 2001).

## 10. Resposta Th17

Em paralelo as respostas Th1 e Th2, a recente descoberta e caracterização das células T “helper” 17 (Th17) e respectiva citocina (IL-17) representa um marco na imunobiologia das células T, fornecendo uma nova via distinta para a comunicação entre imunidade adaptativa e inata (HUNDORFEAN; NEURATH et al., 2012).

As células Th17 estão envolvidas em uma estratégia de defesa na qual as citocinas produzidas por esta linhagem de célula vão para a periferia e interagem com os neutrófilos, ativando-os para que estes possam ter a sua função pró-inflamatória e é neste contexto que as células ativadas irão tentar eliminar o antígeno do organismo seja ele vírus, bactéria, transplante ou alergênico (OLIVEIRA, 2011)

As células Th17 originam-se de células T CD4<sup>+</sup> “naive”, na presença de TGF- $\beta$  e IL-6 (HUNDORFEAN; NEURATH et al., 2012). A diferenciação das células Th17 não requer IL-17, pois sua amplificação e estabilização são providas pelas citocinas IL-21 e IL-23 (IVANOV; MCKENZIE et al., 2006; YANG; PAPPU et al., 2008).

Os subconjuntos de células Th17 podem ser identificados pela sua capacidade específica, chamada de “patogênica” ou “não patogênica”. As células Th17 patogênicas são caracterizadas pela produção de IFN- $\gamma$  e também pela expressão de marcadores de superfície como o receptor 1 de IL-18 e CXCR3 (GHORESCHI; LAURENCE et al., 2010).

A família da citocina IL-17 (células Th17) inclui seis membros: IL-17A (membro fundador, chamado de IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F (WEAVER; HATTON et al., 2007; KORN; BETTELLI et al., 2009), das quais a IL-17E (IL-25) não é produzida pelas células Th17 mas sim pelas células Th2 (HUNDORFEAN; NEURATH et al., 2012).

A IL-17, citocina produzida pelas células Th17 e pelos neutrófilos, é de fundamental importância na regulação da imunidade inata. Estudos *in vivo* indicam que esta é uma potente citocina ativadora de neutrófilos, além de ser também reguladora da expressão de quimiocinas. Adicionalmente, a IL-17 estimula a expressão de



vários genes relacionados com a produção das proteínas de fase aguda (CHAMUSCA; REIS et al., 2012). A principal função da IL-17 secretada pelas células T é mediar a inflamação, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, e quimiocinas inflamatórias, incluindo CXCL-6, CXCL-7, CXCL-8 e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1 – atualmente CCL-2), e metaloproteinases que promovem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (recrutados por células Th1) resultando em inflamação e patologia tissular (GUPTA; CHATURVEDI, 2009).

### 11. Células Th17 e Dengue

As implicações das células Th17 relacionadas à autoimunidade na patogênese da dengue têm sido sugeridas. Os anticorpos contra a proteína não estrutural 1 (NS-1) do vírus da dengue fazem reação cruzada com as plaquetas humanas e células endoteliais, levando a lesão plaquetária e endotelial e também à ativação inflamatória (LIN; WAN et al., 2006). Os níveis de algumas citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e outros mediadores estão significativamente aumentados em pacientes com FHD, e são comumente representadas por IL-6, CXCL-8, prostaglandina E, GM-CSF dos fibroblastos, CCL-2 (MCP-1), TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (GUPTA; CHATURVEDI, 2009). A IL-6 e CXCL-8 são induzidas pela IL-17 e tem sido vistas com função na patogênese da FHD (CHATURVEDI; RAGHUPATHY et al., 1999; CHATURVEDI; NAGAR, 2009).

A expressão extremamente alta de CCL-2 (MCP-1) foi encontrada em pacientes com FHD, o que pode reduzir as “junções de oclusão” das células endoteliais vasculares, levando ao extravasamento vascular observado na FHD (LEE; LIU et al., 2006). O GM-CSF está aumentado na dengue grave comparada à doença branda e níveis aumentados têm sido bem correlacionados com a hipotensão em pacientes com FHD (BOZZA; CRUZ et al., 2008).

As prostaglandinas são sintetizadas nos locais de inflamação e são potentes vasodilatadores, e agem sinergicamente com a histamina e a bradicinina, aumentando a permeabilidade vascular o que resulta em edema e inibição da agregação plaquetária (GUPTA; CHATURVEDI, 2009). Níveis elevados de prostaglandinas têm sido descritos na infecção pelo vírus da dengue e podem estar envolvidos

com a patogênese do FHD (GUPTA; CHATURVEDI, 2009). O TNF- $\alpha$  induzido pela IL-17 causa expressão de moléculas pró-adesivas no endotélio, o que resulta em acumulação de leucócitos, adesão e migração dos capilares (JOVANOVIC; DI BATTISTA et al., 1998). O TNF- $\alpha$  está significativamente aumentado na dengue grave também. A IL-17 estimula a produção e expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  pelos macrófagos humanos (JOVANOVIC; DI BATTISTA et al., 1998).

A descoberta das células Th17 levou a uma mudança no paradigma Th1/ Th2 e tem ajudado a explicar algumas anormalidades no modelo original (GUPTA; CHATURVEDI, 2009).

### 12. Aspectos imunológicos na dengue grave

Há evidências de que a reação cruzada entre células T e anticorpos contribui para a patogênese nas infecções secundárias da dengue. Neutralização ineficiente e anticorpos que agravam a doença aumentam a infecção de células como os macrófagos e células dendríticas (MARTINA; KORAKA et al., 2009). Quanto mais as células são infectadas, mais citocinas pró-inflamatórias são secretadas resultando em disfunção endotelial aumentada. Embora se acredite que os fatores imunológicos sejam os únicos responsáveis pela doença clínica grave, os pacientes com formas graves de dengue também têm carga viral elevada e a viremia prolongada (WANG; CHEN et al., 2006).

Por conseguinte, parece que a dengue grave está associada com o controle viral ineficiente, e de fato, as citocinas imunossupressoras como IL-10 estão significativamente elevadas em pacientes com SCD comparadas com aqueles que não desenvolvem choque (CHEN; LEI et al., 2006). As respostas geradas por células T durante a infecção aguda da dengue causam muitas reações cruzadas. As reações cruzadas de células T específicas para o DENV possuem uma capacidade subótima de degranulação, mas secretam altos níveis de citocinas (MONGKOLSAPAYA; DUANGCHINDA et al., 2006). Portanto, respostas antivirais reduzidas ou subótimas podem também contribuir para a patogênese da doença (DONG; MORAN et al., 2007).

### 13. Sistema do Complemento

Estudos recentes começam a esclarecer a dupla função do Sistema Complemento na patogênese e proteção contra o vírus da dengue (AVIRUTNAN; HAUHART; MAROVICH et al., 2011). O Sistema Complemento, composto por mais de 30 diferentes proteínas solúveis e de superfície, é um importante componente da resposta imune inata contra vários patógenos. Pode ser ativado pelas vias Clássica, das Lectinas e Alternativa, e controla as infecções virais através de múltiplos mecanismos, lise de “virions” ou de células infectadas, produção de anafilatoxinas, e indução de respostas pelas células B e T. A via Clássica é ativada por C1q ligando-se aos imunocomplexos; a via das Lectinas envolve o reconhecimento de carboidratos nos patógenos; e a via Alternativa é constitutivamente ativa em baixos níveis pela da hidrólise espontânea de C3.

A maioria dos estudos examinando as interações entre o Complemento e o vírus da dengue tem se focado na função do Complemento no contexto da patogênese da FHD/SCD. Em particular, um estudo clínico retrospectivo mostrou que um consumo excessivo de proteínas do Complemento está relacionado com a FHD/SCD, e um estudo *in vitro* demonstrou que o Complemento pode aumentar a infecção viral de células mieloides por promover a entrada viral através de CR3 (CARDOSA; PORTERFIELD et al., 1983).

Anticorpos antiDENV puderam ativar, *in vitro*, o Complemento na superfície de células endoteliais infectadas (SHRESTA, 2012). Em um estudo prospectivo, a proteína NS-1 pôde ativar o Complemento, além de níveis de NS-1 e muitas proteínas do Complemento terem se correlacionado com a doença grave (AVIRUTNAN; PUNYADEE et al., 2006).

Em pacientes com FHD, os níveis dos fatores D e H da via Alternativa do Complemento e a proteína MBL (da via das Lectinas) foram encontradas mais elevadas do que com FD (NASCIMENTO; SILVA et al., 2009).

Contudo, achados de Yamanaka et al. (2008) sugerem uma função para o Sistema Complemento no contexto da imunidade protetora. Em particular, estudos de aprimoramento dependente de anticorpo (ADE) *in vitro* demonstraram que as proteínas do Complemento reduzem a infecção viral (YAMANAKA; KOSUGI et al., 2008), sugerindo

que o Complemento pode exercer uma função em limitar a doença mediada por ADE. Recentemente, estudos *in vitro* com a NS-1 têm demonstrado que essa proteína viral liga C4 e C1s (AVIRUTNAN; FUCHS et al., 2010) ou C4BP (AVIRUTNAN; HAUHART; SOMNUKE et al., 2011) para antagonizar a ativação do Complemento, implicando NS-1 como uma molécula de evasão imune *in vivo*. Estes estudos mostrando como o DENV pode empregar múltiplos mecanismos para subverter a ativação do Complemento sugerindo que o Sistema Complemento é um importante ator na defesa do hospedeiro contra o DENV.

Um baixo nível da proteína MBL (lectina ligadora de manose) ou sua atividade diminuída pode ser um fator de risco independente para morbidade e mortalidade associada com o DENV. Deficiências na MBL são relativamente comuns em humanos. A deficiência de MBL tem sido associada com um aumento da susceptibilidade a muitas doenças infecciosas, incluindo infecções virais (BROWN; RYDER et al., 2007), e polimorfismos da MBL2 tem sido associados com a patogênese da doença (SHRESTA, 2012).

Pacientes infectados pelo DENV, no Brasil, sugeriram que baixos níveis de MBL possam estar associados com proteção contra trombocitopenia (ACIOLI-SANTOS; SEGAT et al., 2008), enquanto altos níveis de MBL parecem estar relacionados com a doença grave (NASCIMENTO; SILVA et al., 2009).

### 14. Perspectivas quanto às vacinas

Dois aspectos importantes da imunobiologia do vírus da dengue entram em jogo para que a vacina contra a dengue seja possível. Primeiro, a proteção deve ser largamente mediada por anticorpos neutralizantes que possam ser eficientemente induzidos tanto por vacinas vivas quanto não-vivas. Uma vacina com vírus vivo é uma vacina que sofre multiplicação multicíclica no hospedeiro, enquanto uma vacina não-viva poderia ser tanto um vírus tradicional inativado, ou um vírus/vetor com um único ciclo de replicação no hospedeiro. A vacina viva pode infectar na presença de imunidade homóloga pré-existente mesmo quando a vacina for administrada por via parenteral, uma propriedade que torna possível a geração de respostas secundárias por anticorpos usando uma vacina com vírus vivo atenuado (BLANEY; MATRO et al., 2005).



Uma vacina com DENV-2 inativado tem sido produzida pelo Instituto de Pesquisa Walter Reed Army (Estados Unidos) para testes em macacos e uma equivalente para o DENV-1 entrará brevemente em testes clínicos (MURPHY; WHITEHEAD, 2011). A vacina para DENV-2 administrada com adjuvantes induziu altos níveis de anticorpo neutralizante e protegeu primatas não humanos contra a viremia (ROBERT PUTNAK; COLLIER et al., 2005).

A vacina de vírus inativados contém proteínas E, pré-M, C e RNA viral. Essas partículas subvirais são liberadas das células do hospedeiro nos fluidos extracelulares. As partículas subvirais são semelhantes também a “virions” em alguns outros aspectos: contém pré-M/M, E, e lipídios. A proteína E é glicosilada; as partículas são antigenicamente similares aos “virions” da dengue sendo reconhecidas por anticorpos monoclonais específicos para domínios diferentes da proteína E; essas vacinas induzem anticorpos neutralizantes contra o vírus em roedores ou primatas; e podem proteger estes animais contra as mudanças do DENV (KONISHI; FUJII, 2002).

A empresa norte-americana Hawaii Biotech, inc., localizada no Havaí, está produzindo atualmente proteínas E purificadas por afinidade para cada um dos quatro sorotipos do DENV (CLEMENTS; COLLIER et al., 2010), e a primeira fase de avaliação da subunidade DENV-1 está em andamento, como já citado. Essa é a primeira subunidade do DENV a ser testada em humanos. Contudo, dois estudos em macacos *Rhesus* sp. foram recentemente concluídos utilizando-se proteínas E monovalentes cortadas de DENV-2 ou DENV-4. Guzman et al. (2003) imunizou macacos com quatro doses de 100 µg da proteína E (DENV-4), usando alúmen como um adjuvante, e alcançou somente proteção parcial contra mudanças no DENV-2 (tipo selvagem). Em associação com a Hawaii Biotech, Putnak et al. (2005), imunizou macacos com duas doses da proteína E do DENV-2 produzida nas células de *Drosophila* sp. e formulou com cada um dos cinco

Vacinas candidatas antigênicas quiméricas ao DENV, designadas como ChimeriVax™-DEN1-4 (CVD1-4), foram feitas substituindo-se os genes Pré-M e E de cada um dos quatro sorotipos do DENV pelos genes correspondentes do estirpe YFV 17D (vivo e atenuado) da vacina, gerando assim quatro vacinas candidatas monovalentes (GUIRAKHO;

ARROYO et al., 2001). Os relatórios iniciais da fase I de testes com a vacina tetravalente ChimeriVax™-DEN1-4 indicam que essa parece ser segura com relativamente baixa viremia (LANG, 2009; MORRISON; LEGG et al., 2010; POO; GALAN et al., 2011). O baixo nível da viremia e a infectividade diminuída para os mosquitos indica que esta vacina pode ser deficientemente transmissível de vacinados para os mosquitos, logo os anticorpos produzidos pelas pessoas vacinadas não teriam muita utilidade no combate da infecção dentro dos mosquitos (MURPHY; WHITEHEAD, 2011). Alguns objetivos devem ser atingidos para a produção de vacinas contra a dengue, tais como: (1) a vacina ser protetora contra cada um dos quatro sorotipos de dengue; (2) a vacina deve conferir uma proteção de longa duração (provavelmente sendo necessárias pelo menos duas doses); (3) a imunização deve ser segura e bem tolerada, e deve causar um nível mínimo aceitável de sintomas locais ou sistêmicos; (4) a cobertura universal deve ser um objetivo nas regiões endêmicas; (5) o custo da vacina deve ser acessível para a população que necessita recebê-la (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

## 15. Considerações finais

O vírus da dengue afeta milhões de pessoas no mundo, representando um grande problema de saúde pública. A sequência de eventos que acontecem nos primeiros momentos da infecção entre o sistema imune inato e todo o elenco de processos está diretamente ligada ao estabelecimento da doença.

A imunidade inata esteve durante muito tempo em segundo plano nas discussões de mecanismos de infecção em diversas doenças. Atualmente, observa-se que a resposta adaptativa clássica (Th1 e Th2) não consegue explicar diversos aspectos da clínica e epidemiologia de várias doenças. Características evidenciadas na doença crônica, porém os mecanismos iniciais da patogênese dessa infecção ainda estão sendo estudados. Novos alvos estão aparecendo com a valorização da resposta imune nos primeiros momentos da infecção, como exemplificados nesta revisão. No entanto, mais estudos serão necessários para melhor compreensão da imunopatologia da dengue intuito de no futuro conseguir explicar as questões hoje não respondidas, assim como novos caminhos que auxiliem na prevenção, no diagnóstico e no



tratamento dos pacientes, como as vacinas supracitadas.

### Referências

ABE, A. H. M.; MARQUES, S. M.; COSTA, P. S. S. Dengue em crianças: da notificação ao óbito. **Rev Paul Pediatr**, v. 30, n. 2, p. 263-71, 2012.

ACIOLI-SANTOS, B.; SEGAT, L.; DHALIA, R. et al. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Human immunology**, v. 69, n. 2, p. 122-128, 2008.

ASHOUR, J.; LAURENT-ROLLE, M.; SHI, P. Y. et al. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of virology**, v. 83, n. 11, p. 5408-5418, 2009.

ASHOUR, J.; MORRISON, J.; LAURENT-ROLLE, M. et al. Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 5, p. 410-421, 2010.

ASIAN, W. H. O. T. A. C. O. D. H. F. F. T. S.-E.; REGIONS, W. P. **Technical guides for diagnosis, treatment, surveillance, prevention and control of dengue haemorrhagic fever.** World Health Organization, 1975.

ATKINS, M. B.; DUTCHER, J.; WEISS, G. et al. Kidney cancer: The cytokine working group experience (1986–2001). **Medical Oncology**, v. 18, n. 3, p. 197-207, 2001.

AVIRUTNAN, P.; FUCHS, A.; HAUHART, R. E. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 4, p. 793-806, 2010.

AVIRUTNAN, P.; HAUHART, R. E.; MAROVICH, M. A. et al. Complement-mediated neutralization of dengue virus requires mannose-binding lectin. **MBio**, v. 2, n. 6, 2011.

AVIRUTNAN, P.; HAUHART, R. E.; SOMNUKE, P. et al. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 424-433, 2011.

AVIRUTNAN, P.; PUNYADEE, N.; NOISAKRAN, S. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **Journal of**

**Infectious Diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078-1088, 2006.

AZEREDO, E. L.; ZAGNE, S. M. O.; SANTIAGO, M. A. et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. **Immunobiology**, v. 204, n. 4, p. 494-507, 2001.

BASHYAM, H. S.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 2817-2824, 2006.

BLANEY, J. E.; MATRO, J. M.; MURPHY, B. R. et al. Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. **Journal of virology**, v. 79, n. 9, p. 5516-5528, 2005.

BOZZA, F. A.; CRUZ, O. G.; ZAGNE, S. M. O. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 86, 2008.

BROWN, K. S.; RYDER, S. D.; IRVING, W. L. et al. Mannan binding lectin and viral hepatitis. **Immunology letters**, v. 108, n. 1, p. 34-44, 2007.

CARDOSA, M.; PORTERFIELD, J. S.; GORDON, S. Complement receptor mediates enhanced flavivirus replication in macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 158, n. 1, p. 258-263, 1983.

CHAMUSCA, F. V.; REIS, S. R. A.; LEMAIRE, D. et al. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 1, p. 70-78, 2012.

CHATURVEDI, U.; ELBISHBISHI, E.; AGARWAL, R. et al. Cytotoxic factor-autoantibodies: possible role in the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 181-186, 2001.

CHATURVEDI, U.; RAGHUPATHY, R.; PACSA, A. et al. Shift from a Th1-type response to Th2-type





in dengue haemorrhagic fever. **Current science**, v. 76, n. 1, p. 63-69, 1999.

CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 9-24, 2009.

CHEN, L. C.; LEI, H. Y.; LIU, C. C. et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 74, n. 1, p. 142-147, 2006.

CLEMENTS, D. E.; COLLIER, B. A. G.; LIEBERMAN, M. M. et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. **Vaccine**, v. 28, n. 15, p. 2705-2715, 2010.

CONSOLI, R. A. G.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1994.

CRUZ, A. C. R. **Caracterização molecular e biológica do vírus dengue circulante no Brasil; Molecular and biological characterization of dengue virus circulating in Brazil**. 2005. Instituto Oswaldo Cruz

DA SILVA CORDEIRO, J. Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 42, n. 6, p. 986-91, 2008.

DONG, T.; MORAN, E.; CHAU, N. V. et al. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. **PloS one**, v. 2, n. 12, p. e1192, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 2, p. 203-10, 2006.

\_\_\_\_\_. Dengue in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 285-285, 2012.

FONSECA, B.; FIGUEIREDO, L.; FOCACCIA, R. et al. Dengue. **Tratado de Infectologia, 2a edição, Atheneu, São Paulo**, p. 343-356, 2006.

FRIBERG, H.; BURNS, L.; WODA, M. et al. Memory CD8<sup>+</sup> T cells from naturally acquired

primary dengue virus infection are highly cross-reactive. **Immunology and cell biology**, v. 89, n. 1, p. 122-129, 2011.

GHOESCHI, K.; LAURENCE, A.; YANG, X. P. et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 967-971, 2010.

GREEN, S.; PICHYANGKUL, S.; VAUGHN, D. W. et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p. 1429-1435, 1999.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUIRAKHOO, F.; ARROYO, J.; PUGACHEV, K. et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. **Journal of virology**, v. 75, n. 16, p. 7290-7304, 2001.

GUPTA, N.; CHATURVEDI, U. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever. 2009.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

HO, L. J.; HUNG, L. F.; WENG, C. Y. et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN- $\alpha$  but not IFN- $\gamma$  antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 8163-8172, 2005.

HO, L. J.; WANG, J. J.; SHAO, M. F. et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1499-1506, 2001.

HUNDORFEAN, G.; NEURATH, M. F.; MUDTER, J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 1, p. 180-186, 2012.

IMRIE, A.; MEEKS, J.; GURARY, A. et al. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously



encountered serotypes. **Journal of virology**, v. 81, n. 18, p. 10081-10091, 2007.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T Helper Cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

JESSIE, K.; FONG, M. Y.; DEVI, S. et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411-1418, 2004.

JONES, M.; DAVIDSON, A.; HIBBERT, L. et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. **Journal of virology**, v. 79, n. 9, p. 5414-5420, 2005.

JOVANOVIC, D. V.; DI BATTISTA, J. A.; MARTEL-PELLETIER, J. et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , by human macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3513-3521, 1998.

JUFFRIE, M.; MEER, G. M.; HACK, C. et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 1, p. 70-75, 2001.

KONISHI, E.; FUJII, A. Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. **Vaccine**, v. 20, n. 7, p. 1058-1067, 2002.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KUMARIA, R. Correlation of disease spectrum among four Dengue serotypes: a five years hospital based study from India. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 141-146, 2010.

KURANE, I.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S. et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 5, p. 1473, 1991.

KURANE, I.; MEAGER, A.; ENNIS, F. A. Induction of interferon alpha and gamma from human lymphocytes by dengue virus-infected cells. **Journal of general virology**, v. 67, n. 8, p. 1653-1661, 1986.

LANG, J. Recent progress on sanofi pasteur's dengue vaccine candidate. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, p. S20-S24, 2009.

LAZO, L.; GIL, L.; LOPEZ, C. et al. Nucleocapsid-like particles of dengue-2 virus enhance the immune response against a recombinant protein of dengue-4 virus. **Archives of virology**, v. 155, n. 10, p. 1587-1595, 2010.

LEE, Y. R.; LIU, M. T.; LEI, H. Y. et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. **Journal of general virology**, v. 87, n. 12, p. 3623-3630, 2006.

LIBRATY, D. H.; ENDY, T. P.; HOUNG, H. S. H. et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1213-1221, 2002.

LIBRATY, D. H.; PICHYANGKUL, S.; AJARIYAKHAJORN, C. et al. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **Journal of virology**, v. 75, n. 8, p. 3501-3508, 2001.

LIMON-FLORES, A. Y.; PEREZ-TAPIA, M.; ESTRADA-GARCIA, I. et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. **International journal of experimental pathology**, v. 86, n. 5, p. 323-334, 2005.

LIN, C. F.; WAN, S. W.; CHENG, H. J. et al. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. **Viral immunology**, v. 19, n. 2, p. 127-132, 2006.

LOKE, H.; BETHELL, D. B.; PHUONG, C. et al. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 11, p. 1369-1373, 2001.



MALAVIGE, G.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D. et al. Dengue viral infections. **Postgraduate medical journal**, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MALAVIGE, G.; OGG, G. Pathogenesis of severe dengue infection. **Ceylon Medical Journal**, v. 57, n. 3, p. 97-100, 2012.

MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2676-2683, 2005.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-581, 2009.

MAZZON, M.; JONES, M.; DAVIDSON, A. et al. Dengue virus NS5 inhibits interferon- $\alpha$  signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 8, p. 1261-1270, 2009.

MONGKOLSAPAYA, J.; DEJNIRATTISAI, W.; XU, X. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MONGKOLSAPAYA, J.; DUANGCHINDA, T.; DEJNIRATTISAI, W. et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3821-3829, 2006.

MORRISON, D.; LEGG, T. J.; BILLINGS, C. W. et al. A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naïve adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 3, p. 370-377, 2010.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L. Subversion of interferon by dengue virus. **Dengue Virus**, p. 35-44, 2010.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; LAURENT-ROLLE, M.; ASHOUR, J. et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **Journal of virology**, v. 79, n. 13, p. 8004-8013, 2005.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; SÁNCHEZ-BURGOS, G. G.; LAURENT-ROLLE, M. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14333-14338, 2003.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine\*. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 587-619, 2011.

MUSTAFA, A.; ELBISHBISHI, E.; AGARWAL, R. et al. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 229-233, 2001.

NASCIMENTO, E. J. M.; SILVA, A. M.; CORDEIRO, M. T. et al. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6782, 2009.

NASIRUDEEN, A.; WONG, H. H.; THIEN, P. et al. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 1, p. e926, 2011.

NGUYEN, T.; NGUYEN, T.; TIEU, N. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. **Research in virology**, v. 148, n. 4, p. 273-277, 1997.

OLIVEIRA, E. D. Caracterização da resposta imune citocínica na infecção humana pelo vírus oropouche e sua relação com o padrão de soroconversão ea presença de sintomas. 2011.

ORGANIZATION, W. H. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2ª. Geneva: World Health Organization, 1997.

\_\_\_\_\_. **Dengue, guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009.

PAGNI, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Evasion of the human innate immune system by dengue virus. **Immunologic Research**, p. 1-8, 2012.

PALACIOS SERRANO, H.; VARGAS CABALLERO, M. E.; AGUIRRE PORTUONDO, T. M. Dengue hemorrágico en dengue primario. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 53, n. 1, p. 59-62, 2001.

POO, J.; GALAN, F.; FORRAT, R. et al. Live-attenuated tetravalent dengue vaccine in dengue-naïve children, adolescents, and adults in Mexico City: randomized controlled phase 1 trial of safety and immunogenicity. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 1, p. e9, 2011.



RESEARCH, S. P. F.; DISEASES, T. I. T.; DISEASES, W. H. O. D. O. C. O. N. T. et al. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** World Health Organization, 2009. ISBN 9241547871.

ROBERT PUTNAK, J.; COLLER, B. A.; VOSS, G. et al. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, v. 23, n. 35, p. 4442-4452, 2005.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; BERNAL-RUBIO, D. et al. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 9760-9774, 2010.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; BERNAL-RUBIO, D.; KAMINSKI, D. et al. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. **Journal of virology**, v. 84, n. 9, p. 4845-4850, 2010.

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

SCHLESINGER, J. J.; BRANDRISS, M. W.; WALSH, E. E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. **The Journal of general virology**, v. 68, p. 853, 1987.

SENEVIRATNE, S.; MALAVIGE, G.; DE SILVA, H. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 7, p. 608-614, 2006.

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

SRIKIATKHACHORN, A.; ROTHMAN, A. L.; GIBBONS, R. V. et al. Dengue—how best to

classify it. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 6, p. 563-567, 2011.

STEPHENS, H. HLA and other gene associations with dengue disease severity. **Dengue Virus**, p. 99-114, 2010.

STEPHENS, H.; KLAYTHONG, R.; SIRIKONG, M. et al. HLA-A and-B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 4, p. 309-318, 2002.

SUKUPOLVI-PETTY, S.; AUSTIN, S. K.; ENGLE, M. et al. Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. **Journal of virology**, v. 84, n. 18, p. 9227-9239, 2010.

WANG, W. K.; CHEN, H. L.; YANG, C. F. et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. 8, p. 1023-1030, 2006.

WEAVER, C. T.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 821-852, 2007.

WHITEHORN, J.; FARRAR, J. Dengue. **British medical bulletin**, v. 95, n. 1, p. 161-173, 2010.

WORLD, H. O. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**

N°117, F. S. 1 2012.

YAMANAKA, A.; KOSUGI, S.; KONISHI, E. Infection-enhancing and-neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. **Journal of virology**, v. 82, n. 2, p. 927-937, 2008.

YANG, X. O.; PAPPU, B.; NURIEVA, R. et al. TH17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . **Immunity**, v. 28, n. 1, p. 29, 2008.