

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA FEBRE HEMORRÁGICA DA DENGUE

DENGUE HEMORRHAGIC FEVER: IMMUNOHISTOCHEMICAL ASPECTS

Luís Filipe Roriz Jacomossi de Oliveira¹, Guilherme Augusto Moreira Silva¹, Rafael de Souza Bueno¹, Vitor Afonso Pereira Nunes¹, Marcos Mota da Silva², Annah Rachel Graciano¹

Resumo

Introdução: A dengue é uma arbovirose pandêmica de caráter sazonal, com evolução predominantemente benigna, embora complicações possam ocorrer. As complicações da dengue são: Síndrome do Choque da Dengue e Febre Hemorrágica da Dengue. Os parâmetros da fisiopatologia da dengue não são totalmente conhecidos, havendo discordância entre os estudiosos quanto as várias hipóteses relacionadas à fisiopatologia da Febre Hemorrágica da Dengue. **Objetivo:** Avaliar a expressão de marcadores imunológicos (CD8, CD20, CD56 e CD38) no baço e pulmão de pacientes com Febre Hemorrágica da Dengue. **Métodos:** Foi realizado um estudo observacional, descritivo, do tipo série de casos, durante os anos 2014 e 2016. Foram avaliados 7 casos através de blocos de parafina de derivados necropsiados. **Resultados:** Foram encontradas células CD8⁺ no pulmão, dessa forma explicitando seu papel na fisiopatologia da FHD. O mesmo não se aplica para as células CD56⁺ no baço considerando que os achados foram inconclusivos. No que se refere ao CD38, ressaltou-se a variação de expressão do marcador de acordo com idade e morbidades concomitantes. **Conclusão:** Foram encontrados diversos marcadores no baço e pulmão dos pacientes com Febre Hemorrágica da Dengue (CD8, CD20, CD56 e CD38). A maioria destes marcadores estiveram presentes com mais frequência no baço do que no pulmão.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Febre Hemorrágica da Dengue. Fisiopatologia.

Abstract

Introduction: Dengue is a pandemic arboviral disease with seasonal character, with predominantly benign evolution, although complications can occur. The dengue complications are Dengue Shock Syndrome and Dengue Hemorrhagic Fever. The parameters of dengue's pathophysiology are not completely understood, having disagreement among experts as various hypotheses related to the pathophysiology of Dengue Hemorrhagic Fever. **Objective:** This study aimed to evaluate the expression of immunological markers (CD8, CD20, CD56 and CD38) in the spleen and lung of patients with Dengue Hemorrhagic Fever. **Method:** It was performed an observational and descriptive study of case series, during the years 2014 and 2016. The 7 cases were evaluated by paraffin blocks of necropsied derivatives. **Results:** Were found CD8⁺ cells in the lung, explaining their role in the pathophysiology of DHF. The same does not apply to CD56⁺ cells in the spleen whereas the findings were inconclusive. Regarding CD38, the variation of marker expression according to age and concomitant morbidities was emphasized. **Conclusion:** Several markers were found in the spleen and lung of patients with DHF (CD8, CD20, CD56 and CD38). Most of these markers were present on a larger scale in the spleen than in the lung.

Keywords: Immunohistochemistry. Hemorrhagic Dengue Fever. Pathophysiology.

Introdução

A dengue é a mais prevalente doença viral transmitida por artrópode do mundo. O vírus da dengue integra-se à família *flaviviridae* e consiste em quatro sorotipos distintos (DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4). A infecção pode resultar em um amplo espectro de efeitos, incluindo o acometimento febril, a Dengue Febril (DF), e formas mais severas como a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque da Dengue (SCD)¹.

Estima-se que 2.5 bilhões de pessoas no mundo estejam sob risco de infecção por dengue, onde destas, cerca de 100 milhões adquirem a doença e 500 mil desenvolvem as formas complicadas (Febre Hemorrágica da Dengue ou Síndrome do Choque da Dengue)².

No Brasil, onde há circulação de múltiplos sorotipos, a dengue é bastante expressiva. Não obstante, tamanha variedade de cepas conduz ao aumento dos casos de dengue severa. Logo, torna-se de grande

importância compreender os mecanismos fisiopatológicos da dengue³.

Para melhor compreender a fisiopatologia, é fundamental conhecer a morfologia e o ciclo de vida do vírus da dengue (DENV). O mesmo é envelopado e pertence à família *Flaviviridae*. Sua partícula esférica, de aproximadamente 50nm, é composta de três proteínas estruturais: C (capsídeo), prM / M (pré-membrana / membrana) e E (envelope)⁴. Além disso, possui sete proteínas não estruturais NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Tudo isso é codificado por RNA viral de fita simples senso positivo, sendo o genoma de 11kb. O material genético é traduzido em uma única e longa proteína, que posteriormente é clivada pela NS3 e proteases do hospedeiro, formando as estruturas já descritas⁵.

Nas células infectadas os antígenos do DENV expressos na membrana celular induzem fenômenos de eliminação imune por linfócitos T CD8⁺. Os macrófagos, ativados ou lisados pelas células citotóxicas, libe-

¹ Estudantes de medicina da Unievangélica.

² Docente do curso de medicina da Unievangélica. Médico patologista.
Contato: Annah Rachel Graciano. E-mail: annahgracci@hotmail.com

ram tromboplastina (iniciando fenômenos da coagulação) e proteases ativadoras do complemento (responsáveis pela lise celular e pelo choque). O TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α), de origem macrófágica e linfocitária, se encontra em níveis séricos elevados em casos graves de FHD/SCD. Células inflamatórias e endoteliais são alvos dessa citocina, contribuindo para a trombocitopenia. O favorecimento ao consumo de plaquetas dá-se através da indução de IL-8, estímulo da liberação de histamina pelos basófilos e aumento da permeabilidade vascular^{6,7,8}.

Sugere-se existir relação entre a infecção por DENV e o aumento da ativação de células T CD8⁺⁹. Atualmente, tem sido evidenciado que os CTLs podem possuir um papel intimamente ligado aos danos provocados pelo DENV, o que é evidenciado em modelos murinos de infecção¹⁰. O baço, órgão presente na análise deste trabalho, é um órgão acometido na Febre Hemorrágica da Dengue chegando a ser afetado em 77% dos casos em que, comumente, ocorre congestão e hemorragia¹¹.

Na FHD, os linfócitos B estão nitidamente aumentados, fundamentalmente em fase aguda. Isso enfatiza ainda mais a atuação dessas células na eliminação humoral direta (via neutralização dos complexos de antígenos virais)¹¹. Na comparação das infecções que causam dengue clássico com as que precipitam Febre Hemorrágica da Dengue, pode-se dizer que as NK aparecem mais cedo em FHD e, também, desaparecem mais rapidamente¹².

De forma geral, há aumento da expressão de CD38 nos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ durante a resposta ao DENV, em qualquer apresentação de dengue^{9,14}. Células T CD4⁺ produzem uma citocina denominada fator tóxico, que se encontra em altas quantidades na FHD⁹. Também produzem citocinas cujo aumento, já descrito em tópico específico, está relacionado com a FHD (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)¹⁵. Assim, o estudo objetivou avaliar a expressão de marcadores imunológicos (CD8, CD20, CD56 e CD38) no baço e pulmão de pacientes com Febre Hemorrágica da Dengue.

Métodos

Trata-se de um estudo do tipo série de casos. A população do estudo consiste em 7 casos de óbito por Febre Hemorrágica da Dengue, dos quais foram extraídos 5000 cortes de lâminas para análise imuno-histoquímica. Para a investigação foi utilizada blocos de parafina dos derivados necropsiados, de baço e pulmão. Os fragmentos estavam fixados em formol 10% tamponado e incluídos em 126 blocos de parafina, de modo que havia 56 blocos de baço e 70 blocos de pulmão. Dos 56 blocos de baço, havia em igualdade 8 para cada um dos 7 casos. Da mesma forma, dos 70 blocos de pulmão, havia em igualdade 10 para cada caso.

Foram incluídos no estudo casos diagnosticados com Febre Hemorrágica da Dengue e cujo material necropsiado estava disponível no Laboratório de Patologia o qual forneceu as ferramentas para o estudo. Foram excluídos casos cujos blocos estavam com viabilidade comprometida, seja de qualquer natureza o vício do preparado anatomopatológico (preparo, manu-

seio, processamento, etc). Aplicados os critérios, não houve perda de material, sendo aproveitados todos os casos e seus blocos.

A partir dos blocos de parafina (sete casos) foram obtidas 40 lâminas de baço e 50 de pulmão. Para a análise imuno-histoquímica, utilizou-se o método da estreptoavidina-biotina-imunoperoxidase (Super ABC, KIT universal, NovoCastra), para a detecção dos marcadores imunológicos de células NK (CD56), de Linfócitos T Citotóxicos (CD8), de Linfócitos B (CD20), de toda linhagem linfocítica (CD38).

Para o marcador de cada órgão, utilizou-se como referência a correlação adotada entre o percentual de marcação por campo microscópico em uma escala de imunomarcção. Onde o último dado, por exemplo, revela por meio de uma pontuação de valor 1 que o marcador analisado está presente no máximo de 25% do campo microscópico da lâmina do órgão, ao passo que uma marcação 4 indica que acima de 75% até 100% está imunomarcado. Desse modo, evidencia quais células de defesa estão predominando no órgão (Quadro 1).

Quadro 1 - Correlação adotada entre o percentual de marcação por campo microscópico em uma escala de imunomarcção.

Pontuação da escala de imunomarcção	Percentual de marcação por campo microscópico
0	Ausente
1	> 00 a 25% inclusive
2	> 25 a 50% inclusive
3	> 50 a 75% inclusive
4	> 75 a 100%

Fonte: Spizzo, G. et al. (2011).

Os registros dos marcadores imuno-histoquímicos analisados foram tabulados no software *Microsoft Excel 2013* e analisadas as frequências relativas e percentuais.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Unievangélica, com o Parecer nº. 1.413.783.

Resultados

Os marcadores CD8, CD20, CD56 e CD38 estiveram presentes em todos os baços e pulmões analisados dos pacientes acometidos por febre hemorrágica da dengue. Os marcadores CD8, CD56 e CD38 estiveram presentes em maior quantidade em cortes do baço do que do pulmão. Quanto ao marcador CD20, não houve grande diferença entre o percentual de marcação por campo microscópico entre o baço ou pulmão, sendo que em ambos os órgãos a equivalência deste marcador foi de 25% a 50%. Na maioria dos casos, o CD38 apresentou percentual maior que 50% no baço (Tabela 1).

Quando avaliados por escala de imunomarcção, cujas graduações seguem o percentual de marcação por campo microscópico, apenas o CD38 correspondeu à escala 4, significando percentual de 75% a 100% de frequência desse marcador em cortes do baço, embora a pontuação na escala de imunomarcção na escala 4 tenha sido mínima (14,3%). A maioria dos marcadores situaram-se na escala 2 (frequência de 25% a 50% dos marcadores nos cortes histológicos) (Tabela 2).

Tabela 1 - Expressão dos marcadores de superfície de acordo com cada caso e respectivo órgão analisado em Anápolis (2014 - 2016).

Caso	Marcador CD8		Marcador CD20		Marcador CD56		Marcador CD38	
	P	B	P	B	P	B	P	B
1	1	2	2	2	1	2	1	4
2	1	2	2	2	1	1	1	2
3	2	2	1	1	1	2	1	3
4	1	2	2	2	2	1	2	2
5	1	3	2	2	2	2	1	2
6	1	1	2	1	2	2	2	3
7	1	2	2	2	1	2	1	2

*Nota: Percentual de marcação por campo microscópico: 0 = Ausente; 1 ≥ 0 a 25%; 2 ≥ 25 a 50%; 3 ≥ 50 a 75%; 4 ≥ 75 a 100%. P = Pulmão. B = Baço

Tabela 2 - Frequência relativa do percentual em escala dos marcadores imuno-histoquímicos dos casos para o baço em Anápolis (2014 - 2016).

Marcadores estudados	Pontuação da escala de imunomarcção				
	Escala 0	Escala 1	Escala 2	Escala 3	Escala 4
Marcador CD8	-	14,3%	71,4%	14,3%	-
Marcador CD20	-	28,6%	71,4%	-	-
Marcador CD56	-	28,6%	71,4%	-	-
Marcador CD38	-	-	57,1%	28,6%	14,3%

*Nota: Percentual de marcação por campo microscópico: Escala 0 = Ausente; Escala 1 ≥ 0 a 25%; Escala 2 ≥ 25 a 50%; Escala 3 ≥ 50 a 75%; Escala 4 ≥ 75 a 100%.

Quanto ao pulmão, a expressão dos marcadores foi relativamente menor, sendo que a maioria dos marcadores se encontravam na escala 1 (entre 0 e 25%). Essa afirmação foi positiva especialmente para os marcadores CD8, CD56 e CD38 (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência relativa do percentual em escala dos marcadores imuno-histoquímicos dos casos para o pulmão em Anápolis (2014 - 2016).

Marcadores estudados	Pontuação da escala de imunomarcção				
	Escala 0	Escala 1	Escala 2	Escala 3	Escala 4
Marcador CD8	-	85,7%	14,3%	-	-
Marcador CD20	-	14,3%	85,7%	-	-
Marcador CD56	-	57,1%	42,9%	-	-
Marcador CD38	-	71,4%	28,6%	-	-

*Nota: Percentual de marcação por campo microscópico: Escala 0 = Ausente; Escala 1 => 0 a 25%; Escala 2 => 25 a 50%; Escala 3 => 50 a 75%; Escala 4 => 75 a 100%.

Discussão

Em relação às células CD8⁺ os resultados mostraram maior frequência encontradas no baço. Sendo que o CD8, CD56 e CD38 são encontrados em maior quantidade no baço. No baço a participação dos linfócitos citotóxicos na fisiopatologia da FHD não consiste na infecção da célula pelo DENV mas em sua reação às células ali presentes¹⁶. Tal reação dá-se por morte induzida diretamente (via citólise) e indiretamente (via citocinas). A destruição das células endoteliais infectadas, provocando desnudamento endotelial, contribui com a congestão e hemorragia típicas do baço¹¹. Este estudo revelou quanto aos resultados para CD8, no baço, que este marcador está presente entre os portadores de FHD, firmando a fisiopatologia a ele relacionada.

No que se refere às células CD8⁺ no pulmão de portador de FHD tem-se processo fisiopatológico

muito similar ao esplênico - com citotoxicidade direta e indireta¹⁷. A destruição das células endoteliais, desencadeia: Síndrome da Angústia Respiratória Aguda, hemorragia pulmonar, pneumonia, edema pulmonar e derrame pleural¹⁸.

Neste estudo, nos resultados para CD8, no pulmão, foram encontradas na escala de imunomarcção, quantidades razoáveis do marcador, dessa forma explicitando seu papel na fisiopatologia da FHD.

As células que portam o marcador CD20 são os linfócitos B. No baço as APCs e células do estroma esplênico, quando infectadas por DENV, mediante secreção de CXCL-13 atraem as células B até esse sítio¹. Ademais a isso, o órgão aporta - até mesmo em estado fisiológico - grande quantidade do linfócito B, por se tratar de tecido linfóide secundário¹⁹.

Como a célula B não possui caráter citolítico direto, prediado presente nas CTLs, causa morte celular de duas formas indiretas. A primeira a ser descrita, ocorre através da citotoxicidade das citocinas (IL-6 e TNF-α) por ela produzidas. A segunda, é devido à síntese de auto-anticorpos - por mimetismo molecular do antígeno e do self ou por ativação policlonal - dirigidos às células humanas. Esses dois mecanismos atingem plaquetas e células endoteliais, comprometendo processos hemostáticos e contenção do conteúdo vascular no baço^{9,20}. Processos estes, quando comprometidos, contribuem para congestão e hemorragia esplênica. Nos resultados para CD20, no baço, foram encontradas na escala de imunomarcção: pontuação 1 para 28,6% dos casos e pontuação 2 para 71,4% dos casos. Conclui-se que as células estão, de fato, presentes no baço, reafirmando assim sua contribuição na fisiopatologia da FHD.

Em relação às células CD20⁺ no pulmão, além dos macrófagos, os pneumócitos do tipo II e as células endoteliais apresentam abundância de partículas virais¹. De modo análogo à fisiopatologia da FHD no baço, os linfócitos são recrutados para o pulmão e promovem a morte celular endotelial nesse sítio e destruição plaquetária²⁰. Este estudo constatou que os marcadores CD20 estão presentes no pulmão, estabelecendo sua relevância no processo fisiopatológico da FHD. No âmbito das células CD56⁺ no baço os achados foram inconclusivos. Na FHD, as *natural killer* (CD56⁺) aparecem mais cedo e desaparecem, também, mais rapidamente¹³.

A presença de NK no baço é referida como natural sendo esse o órgão em que é mais abundante, e está mais pronunciada na FHD^{19,21}. A presença da célula de forma expressiva, na fase inicial da dengue, favorece desenvolvimento de padrão clássico (e não de FHD). Processos fisiopatológicos específicos para cada órgão não são bem descritos na literatura, sendo esse tipo de abordagem, por isso, excluída deste trabalho.

Nos resultados para CD56, no baço, foram encontradas na escala de imunomarcção valores significativos, conforme apresentados nos resultados. Constata-se que as células estão presentes no baço. Todavia, em razão de se ter somente, proveniente da população do estudo, blocos de parafina de casos de FHD - não possuindo prontuários, tampouco blocos de dengue clássico, de pessoas saudáveis ou qualquer outro referencial comparativo - não é possível afirmar hipótese fisiopatológica relacionada. Uma vez que a fisiopatologia em questão é a de que as NK são ativa-

das em menor número, mais precocemente e desaparecem mais rápido na FHD.

Para células CD56⁺ pulmonares não foi possível, também, chegar à confirmação da hipótese deste estudo. Apesar de as NK estarem sempre presentes no pulmão, de forma quiescente, a fisiopatologia específica para as células no órgão é ainda pouco esclarecida²². A participação da NK a ser considerada na fisiopatologia para comparação com a imuno-histoquímica, levaria em conta para o pulmão os mesmos fatores dos quais não foram destacados neste estudo para o baço (tempo de infecção e seguimento temporal).

No que diz respeito ao marcador CD38, deve-se ressaltar a variação de expressão do mesmo de acordo com idade, morbidades concomitantes, bem como sua inespecificidade celular. Quanto ao baço, percebe-se a íntima relação entre este marcador e processos inflamatórios, visto que o mesmo está presente em leucócitos diversos (NK, linfócito T e célula B)^{23,24}. Logo, sua presença em inflamação esplênica é esperada^{14,25}. No baço (tecido linfóide secundário), sua presença é patente, todavia é mais representativa em casos de infecção por DENV (por aumento da expressão de quimiocinas esplênicas)¹.

Neste estudo os resultados para CD38, no baço,

foram encontradas na escala de imunomarcacão valores também significativos, demonstrando a relação desse marcador com a fisiopatologia da FHD.

Quanto ao pulmão, o marcador esteve presente nas lâminas analisadas, indicando a presença de inflamação tecidual. Esse processo envolve diversas células imunes que expressam CD38, cuja presença e função no pulmão durante infecção por DENV já foram descritas. Nos resultados para CD38, no pulmão, foram encontrados resultados significativos.

Destaca-se como limitação as informações clínicas e o número de lâminas em estudo, considerando-se a baixa quantidade de necropsias realizada, inviabilizando um estudo mais abrangentes e precisos quanto aos mecanismos patogênicos da FHD. Entretanto, as lâminas investigadas corresponderam somente 0,5-1% de FHD dos casos de dengue.

O estudo concluiu que alguns marcadores como CD8, CD20, CD56 e CD38 estão presentes em pacientes acometidos por febre hemorrágica da dengue, sendo que o CD8, CD56 e CD38 são encontrados em maior quantidade no baço. Quanto ao marcador CD20, não houve diferença entre a quantidade de expressão quanto ao órgão (baço ou pulmão).

Referências

- Póvoa TF, Alves AMB, Oliveira CAB, Nuovo GJ, Chagas VLA, Paes MV. The Pathology of Severe Dengue in Multiple Organs of Human Fatal Cases: Histopathology, Ultrastructure and Virus Replication. *Plos One*, 2014; 9(4): 833-886.
- Leong ASY, Wong KT, Trishe YM, Tan PH, Wannakrairot P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol*, 2007; 24(4):227-236.
- Amarashinge A, Kuritsky JN, Letson W, Margolis HS. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerg Infect Dis*, 2011; 17(8): 1349-1350.
- Diamond MS, Pierson TC. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and its Implications for Disease Control. *Cell*, 2015; 162 (3): 488-492.
- Noisakran S, Choekphaibulkit K, Songprakon P, Onlamoon N, Hsiao HM, Villinger F, et al. A Re-Evaluation of the Mechanisms Leading to Dengue Hemorrhagic Fever. *Ann NY Acad Sci*, 2009; 1171(28): 24-35.
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*, 2007; 85(1): 43-45.
- Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2007; 30(5-6): 329-340.
- Sirichan C, Punnee B, Sutee Y, Kanchana T, Ampaiwan C. Vascular Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever Is Associated with Dengue Infected Monocytes, Monocyte Activation/Exhaustion, and Cytokines Production. *Int J Vasc Med*, 2015; 70(1): 1-9.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*, 2009; 22(4): 564-581.
- Yauch L, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res*, 2008; 80(2): 87-93.
- Idirisinghe K. Histopathological study of Dengue Haemorrhagic Fever. *Journal Diagnostic Pathology*, 2013; 1(8): 50-58.
- Boonpucknavig S, Bhamarapravati N, Nimmannitya S, Phalavadhtana A, Siripont J. Immunofluorescent staining of the surfaces of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Pathol*, 1976; 85(1): 37-48.
- Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 1999; 180(5): 1429-1435.
- Friberg H, Bashyam H, Toyosaki-Maeda T, Potts JA, Greenough T, Kalayanarooj S, et al. Cross-Reactivity and Expansion of Dengue-Specific T cells During Acute Primary and Secondary Infections in Humans. *Scientific Reports*, 2011; 1(51): 1-7.
- Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*, 1998; 3(11): 480-496.
- Blackley S, Kou Z, Chen H, Quinn M, Rose RC, Schlesinger JJ. Primary Human Splenic Macrophages, but Not T or B Cells, Are the Principal Target Cells for Dengue Virus Infection In Vitro. *Journal Of Virology*, 2007; 81(24): 13325-13334.
- Spiropoulou CF, Srikiatkachorn A. The role of endothelial activation in dengue hemorrhagic fever and hantavirus pulmonary syndrome. *Virulence*, 2013; 4(6): 525-536.
- Mohamed NA, El-Raouf EA, Ibraheem HA. Respiratory manifestations of dengue fever in Taiz-Yemen. *Egyptian Journal Chest Diseases Tuberculosis*, 2013; 62(2): 319-323.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. [s.l.]: Campus, 2015. 552 p.
- Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS. Virus Replication and Cytokine Production in Dengue Virus-Infected Human B Lymphocytes. *Journal Virology*, 2002; 89(2): 12242-12249.
- Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology*, 2004; 319(2): 262-273.

22. Wang J, Li F, Zheng M, Sun R, Wei H, Tian Z. Lung natural killer cells in mice: phenotype and response to respiratory infection. *Immunology*, 2012; 137(1): 37-47.
23. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, *et al.* Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*, 2008; 88(3): 841-886.
24. Tenca C. Death of T cell precursors in the human thymus: a role for CD38. *Int Immunol*, 2003; 15(9): 1105-1116.
25. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol*, 2006; 143(2): 345-356.