

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

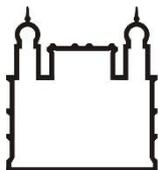
Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO 12-HETE NA ATIVAÇÃO ENDOTELIAL NA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE**

JULIA GÓES PORFIRIO

Rio de Janeiro

2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular

Julia Góes Porfirio

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO 12-HETE NA ATIVAÇÃO ENDOTELIAL NA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular – área de concentração: Farmacologia e Imunologia.

Orientadora: Dra. Patricia Torres Bozza

Rio de Janeiro

2020

Góes Porfirio, Julia.

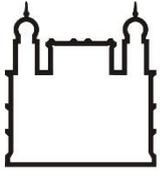
Avaliação do papel do 12-HETE na ativação de células endoteliais na infecção pelo vírus da dengue / Julia Góes Porfirio. - Rio de Janeiro, 2020.
71 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientadora: Patricia Torres Bozza. Bibliografia:

f. 45-57

1. Inflamação. 2. Mediadores lipídicos. 3. Células endoteliais. 4. Dengue.
5. Permeabilidade endotelial. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular

Julia Góes Porfirio

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO 12-HETE NA ATIVAÇÃO ENDOTELIAL NA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE**

Orientadora: Dra. Patricia Torres Bozza

Aprovada em: 26/03/2020

Banca examinadora: Dra. Carmen Penido Monteiro (Presidente) – Farmanguinhos/
FIOCRUZ

Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Membro) – IOC/FIOCRUZ

Dra. Christianne Bandeira de Melo (Membro) – IBCCF/UFRJ

Suplentes: Dra. Simone Morais da Costa – IOC/FIOCRUZ

Dra. Cristiana Couto Garcia - IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2020

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram para o desenvolvimento desse trabalho, seja através de apoio emocional, energias positivas, conversas, ideias e soluções para alguns dos problemas e dúvidas que surgiram durante o caminho.

Agradeço primeiramente a toda minha família, principalmente meus pais Sonia e Carlos, que acreditam em mim, me inspiram, me apoiam e me incentivam todos os dias independente das minhas decisões. Também agradeço as minhas irmãs Luisa e Marina, pelo suporte de sempre, e também à minha avó Maria, que é e sempre foi uma das minhas inspirações de mulher forte e perseverante.

Gostaria muito de agradecer a minha coorientadora Isaclaudia Gomes, por todo suporte teórico e prático oferecido sempre que necessário e ao Eugenio Hottz, pela ajuda em planejamentos de experimentos durante o mestrado. Também agradeço imensamente a minha orientadora Patricia Bozza, pela confiança, suporte e disponibilidade durante os anos de iniciação científica e mestrado, que foram de grande importância nesse processo.

Agradeço às minhas amigas de graduação e colegas de profissão Caroline, Gabrielle Tantos, Gabrielle Rodrigues e Luciana, que estão sempre dispostas a conversar sobre os temas e novidades da nossa área e que de certa forma influenciaram positivamente na minha formação. Agradeço às minhas amigas da vida Mariana, Letícia, Bia, Heloisa, Juliana, Catarina e Olivia, por sempre estarem do meu lado em todas as situações possíveis e serem as melhores amigas que eu poderia pedir. Também agradeço à toda equipe do Laboratório de Imunofarmacologia, que foi um local de grande crescimento e amadurecimento para mim. Em especial, sou grata à Rose, que sempre conseguiu manter a organização do laboratório e resolver os problemas de todos, também às amigadas que fiz e que quero levar para sempre. Uma muito obrigada à Tamires, Tathiany, Millena, Júlia, Ellen, Karina, Vinicius Guerra e Filipe, por servirem como uma válvula de escape durante esses anos.

Agradeço também à Luíza, do Laboratório de Biologia Celular, pela gentileza e por sempre permitir que eu usasse a leitora de placas do seu laboratório.

À CAPES e FIOCRUZ, pelo suporte financeiro e científico, e a coordenação e secretaria da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial à Julimar, pela disponibilidade de sempre.

Aos integrantes da banca, agradeço por aceitarem o convite.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Dengue.....	1
1.1.1 Aspectos epidemiológicos	1
1.1.2 Agente etiológico.....	4
1.1.3 Manifestações clínicas	5
1.1.4 Mecanismos da fisiopatologia na dengue.....	7
1.1.4.1 O aumento da permeabilidade vascular na dengue	11
1.2 12-HETE.....	13
1.2.1 12-HETE em patologias	16
1.3 Hipótese e justificativa.....	19
2. Objetivos	21
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Materiais e Métodos	22
3.1 Amostras clínicas	22
3.2 Dosagem de eicosanoides	22
3.3 Cultura de células.....	24
3.4 Reagentes.....	24
3.5 Ensaio de permeabilidade endotelial <i>in vitro</i>	24
3.6 Imunofluorescência	25
3.7 Citometria de fluxo	25
3.8 Dosagem de citocinas	25
3.9 Ensaio da Lactato Desidrogenase.....	26
3.10 Análise estatística	26
4. Resultados	27
4.1 12-HETE e tromboxano B ₂ no plasma de pacientes com dengue.....	27

4.2 O 12-HETE induz o aumento da permeabilidade endotelial em células HMVEC-L. 27	
4.3 O estímulo do 12-HETE é capaz de diminuir a presença de VE-caderina e gerar aumento dos espaçamentos entre as células endoteliais	29
4.4 As células endoteliais produzem maiores níveis de IL-6 sob estímulo do 12-HETE	32
4.5 O 12-HETE não é capaz de induzir morte das células endoteliais.....	33
4.6 O bloqueio do receptor BLT ₂ reverte o extravasamento vascular na dengue <i>in vitro</i> , e isso pode ser mediado pela diminuição da VE-caderina.....	35
5. Discussão.....	38
6. Conclusões.....	43
7. Perspectivas.....	44
Referências bibliográficas	45

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1: Distribuição global dos casos de dengue	1
Figura 1.2: História natural da dengue	5
Figura 1.3: Classificação atual dos casos de dengue	7
Figura 1.4: Esquema da patogênese da dengue	9
Figura 1.5: Metabolismo do ácido araquidônico	14
Figura 4.1: Níveis séricos de 12-HETE e tromboxano B ₂ de pacientes com dengue e de indivíduos saudáveis	28
Figura 4.2: Extravasamento passivo de albumina-FITC pela monocamada de células endoteliais após estímulo com 12-HETE	29
Figura 4.3: Imunofluorescência para VE-caderina e F-actina das células endoteliais estimuladas com 12-HETE	31
Figura 4.4: Análise da marcação de VE-caderina das células endoteliais estimuladas com 12-HETE.....	32
Figura 4.5: Produção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais estimuladas por 12-HETE	34
Figura 4.6: Análise da viabilidade das células endoteliais sob efeito do 12-HETE....	35
Figura 4.7: Extravasamento passivo de albumina-FITC pela monocamada de células endoteliais após bloqueio do receptor BLT ₂	36
Figura 4.8: Avaliação da presença de VE-caderina em células endoteliais estimuladas após o bloqueio de receptores BLT ₁ e BLT ₂	37
Tabela 1: Características de pacientes com dengue e voluntários saudáveis	23

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico;

ACD: Anticoagulante composto por ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose;

ADE: Amplificação dependente de anticorpos;

ALT: Alanina transaminase;

AST: Aspartato transaminase;

BLT: Receptor de leucotrieno B₄;

CD: *Cluster* de diferenciação;

CO₂: Dióxido de carbono;

COX: Cicloxigenase;

CYP450: Complexo de enzimas do citocromo P450;

DENV: Vírus dengue;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

DNA: Ácido desoxirribonucleico;

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético;

EET: Ácido epoxieicosatrienóico;

EIA: do inglês *Enzyme Immunoassay*;

EGF: Fator de crescimento epidermal;

ELISA: do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*;

FcγR: Receptor da fração Fc da Imunoglobulina G;

FHD: Febre hemorrágica da dengue;

FITC: Isotiocianato de fluoresceína;

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos;

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos;

GPCR: Receptor acoplado à proteína G;

HETE: Ácido hidroxiieicosatetraenóico;

HMEC-1: Célula endotelial da microvasculatura de derme humana;

HMVEC-L: Célula endotelial da microvasculatura pulmonar humana;

HpETE: Ácido hidroxiperoxiieicosatetraenóico;

HUVEC: Célula endotelial de veia de cordão umbilical humano;

ICAM: Molécula de adesão intracelular;

IMF: Intensidade média de fluorescência;

IFN: Interferon;

IGF: Fator de crescimento tipo insulina;

IgG: Imunoglobulina G;

IgM: Imunoglobulina M;

IL: Interleucina;

LDH: Lactato desidrogenase;

LOX: Lipoxigenase;

LPS: Lipopolissacarídeo;

LTB₄: Leucotrieno B₄;

MCP-1/CCL2: Proteína quimioatraente de monócitos;

MIF: Fator de inibição da migração de macrófagos;

MMP: Metaloproteinases;

NLR: Receptor do tipo NOD;

NS: Proteína não estrutural de flavivírus;

PAF: Fator de ativação de plaquetas;

PE: Ficoeritrina;

PFA: Paraformaldeído;

PG: Prostaglandina;

PLA₂: Fosfolipase A₂;

RNA: Ácido ribonucleico;

SCD: Síndrome do choque associado a dengue;

SFB: Soro fetal bovino;

TGO: Transaminase glutâmica oxalacética;

TGP: Transaminase glutâmico pirúvica;

TLR 4: Receptor do tipo Toll 4;

TNF: Fator de necrose tumoral;

TX: Tromboxano;

VCAM: Molécula de adesão de célula vascular;

VEGF: Fator de crescimento de endotélio vascular;

WHO: do inglês World Health Organization;

ZO: Proteína da zona ocludente.

RESUMO

A dengue é uma doença viral infecciosa que atinge aproximadamente 390 milhões de pessoas por ano. Uma das principais características da fisiopatologia da dengue grave é o aumento da permeabilidade vascular, que pode levar ao choque hipovolêmico. Sabe-se que durante a infecção, há intensa liberação de mediadores pró-inflamatórios, o que intensifica o processo inflamatório e a resposta do hospedeiro, ocasionando a ativação e disfunção do endotélio vascular e consequentemente no extravasamento de fluidos e proteínas. O ácido hidroxicicosatetraenóico (12-HETE) é um dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico, produzido principalmente pela enzima plaquetária 12-lipoxigenase. O 12-HETE participa de processos patológicos e do aumento da permeabilidade endotelial, e isso tornou esse mediador um fator de significância clínica nos últimos anos. Sendo assim, nossa hipótese é que o 12-HETE liberado durante a infecção do vírus da dengue é capaz de ativar o endotélio, levando ao aumento da permeabilidade endotelial e à liberação de mediadores inflamatórios. Os níveis séricos de 12-HETE e tromboxano B₂ foram quantificados em pacientes com dengue, e observou-se maiores níveis de 12-HETE em comparação aos voluntários saudáveis. Demonstramos através de um ensaio de permeabilidade *in vitro* que o 12-HETE é capaz de induzir o aumento da permeabilidade endotelial, e através das técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo, que esse eicosanoide modula a presença da proteína de junção VE-caderina nas células endoteliais. Além disso, o 12-HETE foi capaz de induzir a produção e liberação da citocina IL-6, e não induziu a morte das células endoteliais. Observamos também que o plasma de pacientes com dengue levou ao aumento da permeabilidade da monocamada de células endoteliais, o que foi revertido pelo bloqueio do receptor BLT₂, pelo qual o 12-HETE possui alta afinidade, e esse processo pode ser mediado pela presença de VE-caderina. Assim, conclui-se que o 12-HETE ativa as células endoteliais e que o mesmo contribui na fisiopatologia da dengue. Dessa forma, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares e celulares da disfunção endotelial que ocorrem durante a dengue e de como o metabólito 12-HETE está relacionado com essa patologia é de grande importância para que posteriormente sejam identificados possíveis alvos terapêuticos para a doença.

ABSTRACT

Dengue is a viral infectious disease, that strikes approximately 390 million people each year. One of the main features of the physiopathology of severe dengue is increased vascular permeability, which can lead to hypovolemic shock. It is known that during infection, there is an intense release of proinflammatory mediators, that intensifies the inflammatory process and host response, leading to vascular endothelium activation and dysfunction, and consequently leakage of fluids and proteins. Hydroxyieicosatetraenoic acid (12-HETE) is one of the products of arachidonic acid metabolism, produced mainly by the platelet enzyme 12-lipoxygenase. 12-HETE contributes to pathological processes and in increased endothelial permeability, and therefore this mediator has become a factor of clinical importance in recent years. Thus, we hypothesize that 12-HETE released during dengue infection can activate the endothelium, leading to increased endothelial permeability and inflammatory mediators release. We quantified the levels of 12-HETE and thromboxane B₂ in plasma from dengue patients and observed increased levels of 12-HETE in patients with dengue compared to healthy volunteers. Then, we demonstrated through an *in vitro* permeability assay that 12-HETE can induce increased endothelial permeability, and also that through flow cytometry and immunofluorescence, this eicosanoid modulates the presence of VE-cadherin junction protein in endothelial cells. Besides that, 12-HETE was able to induce the production and release of IL-6 and did not induce endothelial cells death. We also observed that plasma of dengue patients increases permeability of endothelial cells monolayer, which was reversed by blocking the BLT₂ receptor, that 12-HETE has a high affinity, and this process can be mediated by VE-cadherin presence. Thus, we can conclude that 12-HETE activates endothelial cells and that it contributes to the physiopathology of dengue. Therefore, a better understanding of the molecular and cellular mechanisms of endothelial dysfunction that occurs during dengue and how the metabolite 12-HETE is related to this pathology is important, so that subsequently possible therapeutic targets for this disease are identified.

1. Introdução

1.1 Dengue

1.1.1 Aspectos epidemiológicos

A dengue é considerada uma das doenças negligenciadas mais importantes do mundo atualmente (Guzman & Harris, 2015). A doença é endêmica de regiões tropicais e subtropicais na Ásia, Américas, África e na região mediterrânea oriental (Figura 1.1), principalmente em áreas urbanas e semiurbanas (World Health Organization - WHO, 2011; Simmons *et al.*, 2012). Apesar disso, as taxas de casos na África são desconhecidas na grande maioria dos países, já que muitos dos surtos e casos são atribuídos erroneamente à malária (Amarasinghe *et al.*, 2011). São aproximadamente 96 milhões de infecções sintomáticas, 500 mil casos graves da doença e 21 mil mortes por ano no mundo (Bhatt *et al.*, 2013; WHO, 2012).

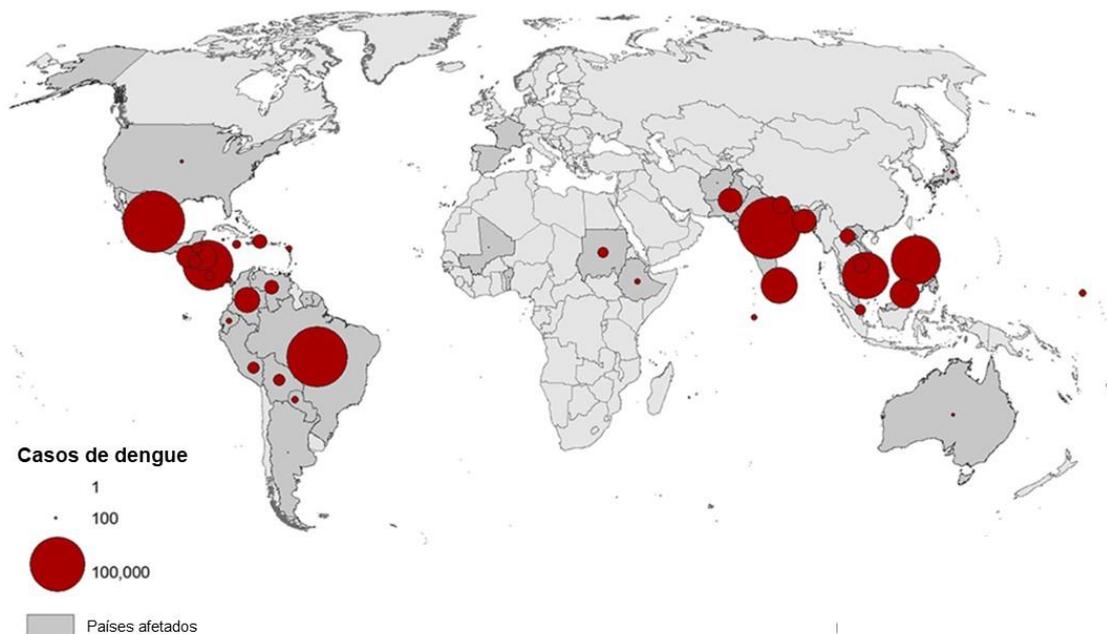


Figura 1.1 Distribuição global dos casos de dengue. Países que apresentaram altas e baixas taxas de ocorrência de casos de dengue são exibidos no mapa. Adaptado de *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*, 2019.

Nos últimos 50 anos, a incidência da dengue aumentou 30 vezes, junto com a expansão geográfica (Pathak & Mohan, 2019). Essa expansão geográfica resultou no aumento da magnitude das epidemias, assim como no aumento da frequência da

dengue grave (Guzman *et al.*, 2016). Estimativas realizadas nos últimos anos sugerem que metade da população mundial (3.6 bilhões de pessoas) vive em áreas de risco de infecção da dengue, com 390 milhões de indivíduos infectados por ano (Bhatt *et al.*, 2013). Segundo autores, os principais fatores que explicam a pandemia de dengue do século XXI são resultado de mudanças sociais e demográficas, como o crescimento populacional, a urbanização não planejada, o transporte moderno e a migração, o comércio global e a ausência de medidas de controle efetivas contra os mosquitos vetores nas regiões endêmicas (Gubler, 2011; Bhatt *et al.*, 2013; Messina *et al.*, 2014; Pathak & Mohan, 2019).

O fato da dengue ser considerada um problema de saúde pública está relacionado com a capacidade do principal vetor da doença, o mosquito *Aedes aegypti*, de se dispersar através de regiões tropicais e subtropicais pelo mundo, e assim se tornar amplamente distribuído nessas áreas (Simmons *et al.*, 2012).

Além do *Aedes aegypti*, o mosquito da espécie *Aedes albopictus* também é um vetor importante na transmissão dengue, e sua distribuição geográfica aumentou bastante nos últimos anos (WHO, 2011). Do ponto de vista da saúde pública, o ciclo de transmissão mais importante é o ciclo endêmico/epidêmico em grandes centros urbanos nas regiões tropicais (Gubler, 1998). A dengue é causada por quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus da dengue (DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4) (Simmons *et al.*, 2012). Os vírus portanto são mantidos em um ciclo *Aedes aegypti* – humanos – *Aedes aegypti* com epidemias periódicas, e muitas vezes mais de um dos quatro sorotipos de vírus da dengue circulam simultaneamente em uma mesma cidade, o que é denominado hiperendemicidade (Gubler, 1998).

A transmissão da dengue é resultado de interações entre pessoas, vírus, mosquitos e fatores ambientais (Guzman & Harris, 2015). A fêmea do mosquito *Aedes aegypti* pode se infectar através do repasto sanguíneo em uma pessoa que está no período de viremia da infecção. Assim, o vírus da dengue infecta células intestinais e outros tecidos do mosquito antes que esse seja disseminado para as glândulas salivares. Dessa forma, um mosquito infectado é capaz de transmitir o vírus da dengue para diversos humanos ao se alimentar do sangue, e uma vez infectada, a pessoa pode levar cerca de 4 a 7 dias para apresentar os sintomas iniciais e para se tornar capaz de transmitir o vírus para um novo mosquito. Tanto indivíduos sintomáticos

como assintomáticos podem transmitir o vírus para os mosquitos (WHO, 2011; Guzman *et al.*, 2016).

Apenas nas Américas, 1 milhão de casos de dengue ocorreram na década de 1980, e cerca de 5 milhões de casos ocorreram de 2000 a 2007 (Montoya *et al.*, 2012). Durante esse período, só o Brasil representou mais de 60% dos casos de dengue reportados no mundo todo (Fares *et al.*, 2015). Dados de monitoramento do Brasil demonstraram que o sorotipo DENV3 foi predominante em todos os estados do país entre 2002 e 2006, e que entre 2007 a 2009 esse perfil mudou, e o DENV2 tornou-se o sorotipo predominante (Salles *et al.*, 2018). Já em 2010, foi indicado que os sorotipos DENV1, DENV2 e DENV3 circulavam por todo o Brasil, sendo o DENV1 o de maior incidência. Os dados do ano de 2016 demonstraram que todos os quatro sorotipos do vírus circularam ao longo do mesmo ano (Salles *et al.*, 2018). Apesar disso, apenas 7% do total de casos de dengue tiveram os sorotipos identificados entre 2010 e 2016, e essa taxa claramente subestima o número real de casos da doença que ocorreram no Brasil (Salles *et al.*, 2018).

Atualmente, não existem terapias efetivas contra a dengue. O tratamento de indivíduos doentes requer um alto nível de cuidado, de forma que o paciente necessite ser hospitalizado para facilitar a reposição de fluidos e transfusão sanguínea, quando indicada (Ministério da Saúde, 2010; SALLES *et al.*, 2018). Com a expansão geográfica do vírus e do vetor e com a maior incidência de casos de dengue, é necessário implementar medidas eficazes de prevenção e controle da doença (WHO, 2012). A principal maneira utilizada atualmente para controlar o avanço da dengue é através da redução do risco da transmissão viral, com ferramentas de controle da proliferação ou eliminação do mosquito *Aedes aegypti* (Gubler, 1998; Guzman *et al.*, 2016). Medidas como a eliminação de containers que são locais favoráveis para a ovoposição e desenvolvimento dos estágios aquáticos do mosquito, o uso de inseticidas e a geração de mosquitos geneticamente modificados ou infectados com a bactéria *Wolbachia* (o que torna o mosquito parcialmente resistente para a infecção do vírus da dengue) são algumas das estratégias usadas atualmente para controle do vetor (WHO, 2012). Neste momento, a vacina contra dengue mais avançada que existe (DengVaxia) é feita por uma quimera de genes estruturais dos quatro sorotipos do vírus da dengue, e já passou por diversos estudos clínicos para teste de segurança e eficácia em países endêmicos para a dengue (Halstead, 2019). Entretanto, após

novas evidências de uma baixa eficácia, pesquisadores e autoridades da área da saúde recomendaram que essa vacina só seja aplicada em indivíduos que saibam que já tenham sido infectados pelo vírus da dengue ou em populações com 80% de soroprevalência para DENV (WHO, 2019).

1.1.2 Agente etiológico

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae* (Simmons *et al.*, 2012), e são relativamente pequenos (40-50 nm) e esféricos, envoltos por envelope lipídico (Gubler, 1998). O vírus possui um genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva, que codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5) (Wilder-Smith *et al.*, 2019). A proteína C encapsula o genoma, e a mesma é envolta pelo envelope viral, formado por uma bicamada lipídica na qual as proteínas E e M estão inseridas. A proteína E se liga nos receptores celulares para permitir a entrada do vírus nas células suscetíveis e, portanto, contém os epítomos cruciais para a neutralização de anticorpos que se desenvolvem após a infecção. As proteínas não estruturais formam o complexo de replicação, que amplifica o genoma viral, e que também possuem funções importantes na interação com proteínas do hospedeiro (Wilder-Smith *et al.*, 2019).

Todos os quatro sorotipos do DENV estão associados com as epidemias de dengue, com um variável grau de gravidade (WHO, 2011). Além disso, a infecção por um sorotipo do vírus da dengue confere imunidade para toda a vida contra o sorotipo infectante, porém não há proteção imune cruzada de longa duração para os outros sorotipos, e infecções secundárias por outros sorotipos podem levar à forma grave da doença (Gubler, 1998).

Durante o repasto sanguíneo feito pelo mosquito, o DENV é inoculado na derme e epiderme, e algumas partículas virais também são diretamente injetadas na corrente sanguínea (Guzman *et al.*, 2016). Na pele, o vírus pode infectar macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans. Essas células infectadas migram para o local inicial de infecção e para os linfonodos, o que resulta no recrutamento de monócitos e macrófagos que, conseqüentemente, se tornam alvos da infecção do DENV. Assim, o número e a variedade de células infectadas pelo DENV aumentam, disseminando o vírus através do sistema linfático e através da infecção de células de

linhagem mononuclear, incluindo monócitos sanguíneos, células dendríticas mieloides, macrófagos hepáticos e esplênicos, entre outras (Johnston *et al.*, 2000; Marovich *et al.*, 2001).

1.1.3 Manifestações clínicas

A dengue é uma doença sistêmica e dinâmica, apesar de sua curta duração, que em 90% dos casos não excede uma semana (Guzman *et al.*, 2016). As manifestações clínicas da dengue podem mudar com o passar dos dias, como também piorar repentinamente. A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos virais pode causar apresentações clínicas similares, e a doença pode seguir três fases: a fase aguda/febril, que é observada na maioria dos pacientes; a fase crítica e a convalescência, que é a fase de recuperação espontânea do organismo (Figura 1.2) (GUBLER, 1998; WHO, 2009).

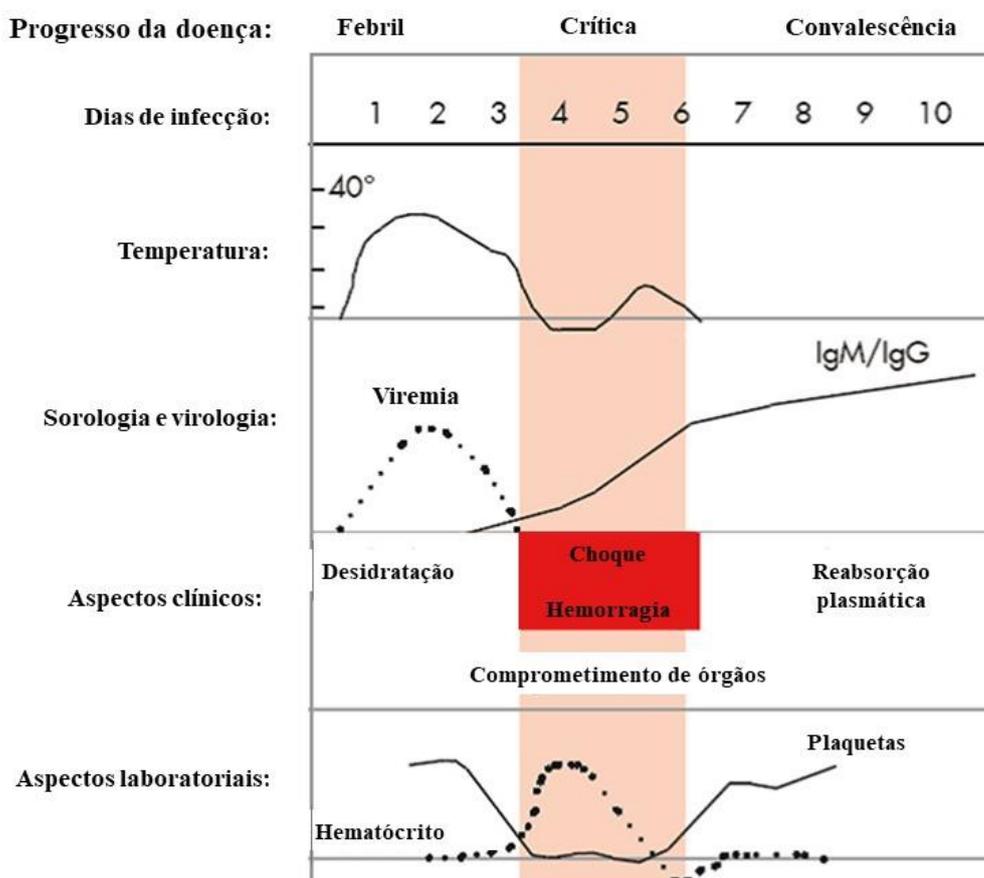


Figura 1.2 História natural da dengue. Curso das alterações clínicas e laboratoriais após início da infecção e dos sintomas. Adaptado de WHO, 2009.

Após o período de incubação, que pode ser de 4 a 7 dias (e no máximo 14 dias), a fase febril se inicia com febre e calafrios repentinos, associados a mal-estar, vômitos, dor de cabeça e mialgia. Dor abdominal leve e diarreia também podem ocorrer, sendo esse último sintoma mais frequente em pacientes com menos de dois anos ou em adultos (Guzman *et al.*, 2016). Durante esse estágio, a taxa de leucócitos normalmente é baixa, e manifestações como petéquias e equimoses também podem ocorrer, com ou sem trombocitopenia. Após 2 a 5 dias, esses sintomas podem progredir para uma rápida deterioração clínica (Guzman *et al.*, 2016).

A maioria dos pacientes apresenta melhoras com a diminuição da febre, porém várias complicações podem ocorrer no período da defervescência, indicando o começo da fase crítica da dengue. É na fase crítica que se manifesta o aumento da permeabilidade capilar, em paralelo com níveis aumentados do hematócrito (Mammen *et al.*, 2007). O período clinicamente significativo do extravasamento vascular gerado pelo aumento da permeabilidade vascular dura de 24 a 48 horas, e pode levar ao choque, causado pelo baixo volume sanguíneo (hipovolemia) e caracterizado pelo pulso fraco, taquicardia e hipotensão. Esse quadro pode progredir para a síndrome do choque associado a dengue (SCD), com risco de morte (Lam *et al.*, 2013). Associados a esses sintomas, também há apresentação de níveis aumentados do hematócrito e diminuição progressiva dos níveis de plaquetas. As manifestações hemorrágicas também são observadas na fase crítica, embora sejam geralmente menos frequentes. Os três fatores hemostáticos observados na febre hemorrágica da dengue (FHD) e na SCD são as mudanças vasculares, a trombocitopenia e desordens na coagulação (Gubler, 1998).

No caso dos pacientes que se recuperam, a fase crítica dura de 24 a 36 horas, e antecede uma rápida convalescência (Guzman *et al.*, 2016). As alterações na permeabilidade vascular e na hemostase são de vida curta e revertidas espontaneamente para os níveis normais após 48 a 72 horas, aproximadamente, estando associadas também a uma melhora rápida nos sintomas apresentados. Entretanto, adultos ainda podem manifestar cansaço por algumas semanas após a recuperação (Simmons *et al.*, 2012).

De acordo com a classificação clínica adotada pela WHO em 2009, um paciente pode ter dengue com ou sem sinais de alarme e dengue grave, destacando que a gravidade observada na dengue é considerada um segundo passo da mesma doença

(Figura 1.3). Os principais sinais de alarme descritos são dor abdominal, vômitos persistentes, ascite, sangramento de mucosas, letargia, hepatomegalia, entre outros. As principais características da dengue grave são extravasamento de plasma grave, acúmulo de líquido em cavidade – ascite (evidenciado por ultrassonografia abdominal), sangramento grave e/ou comprometimento de órgãos, de acordo com a WHO, 2009 (Figura 1.3).



Figura 1.3 Classificação atual dos casos de dengue. Sugestão da WHO, em 2009, da classificação dos casos de dengue e dos níveis de gravidade da doença. Adaptado de WHO, 2009.

1.1.4 Mecanismos da fisiopatologia na dengue

Durante os últimos anos, foram propostos diversos mecanismos para que se melhor entendesse a patogênese ocorrida na dengue. A fisiopatologia da FHD e da SCD compõe um processo complexo e multifatorial, que pode envolver a interação de aspectos virais e do hospedeiro, que influenciam na gravidade da doença (Pang *et al.*, 2007).

A hipótese da “amplificação da infecção dependente de anticorpos” (ADE – *antibody-dependent enhancement*) é um dos mecanismos propostos para explicar a gravidade e mortalidade associadas às reações imunológicas do hospedeiro nas infecções secundárias da dengue, e foi descrita pela primeira vez em 1977 por

Halstead & O'Rourke. Esse mecanismo pode ser explicado pela pré-existência de anticorpos específicos reativos e não neutralizantes contra um sorotipo do vírus da dengue, provenientes de uma infecção anterior, durante uma infecção secundária (ou reinfeção) (Halstead & O'Rourke, 1977; Vaughn *et al.*, 2000). Esses anticorpos se ligam a receptores Fcγ (FcγR) de células do sistema imune, principalmente monócitos e macrófagos. Dessa forma, os anticorpos pré-existentes em uma infecção secundária facilitam a entrada do vírus nas células do hospedeiro, levando ao aumento da infectividade, seguida por uma cascata de ativação de células T e na liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Pang *et al.*, 2007).

No geral, a teoria da “amplificação da infecção dependente de anticorpos” é capaz de explicar o fato de que infecções primárias do vírus da dengue causam, na maioria das vezes, uma doença mais branda em crianças, enquanto uma infecção secundária (meses ou anos depois) tem maiores chances de causar FHD e/ou SCD, tanto em adultos como em crianças (Guzman & Vazquez, 2010). Existem diversos estudos que sustentam esse fenômeno, como o trabalho de Alwis e colaboradores (2014), que demonstrou a habilidade de anticorpos do soro humano em aumentar a infecção do vírus da dengue tanto em modelos *in vitro*, em células sanguíneas, quanto *in vivo*, em camundongos. O mecanismo da ADE também foi observado em modelos de primatas não humanos (Halstead *et al.*, 1973; Gonzalez *et al.*, 2007). Além disso, existem estudos que sugerem e descrevem como esse mecanismo pode ocorrer em humanos (Dejnirattisai *et al.*, 2010; Katzelnick *et al.*, 2017).

A observação de que o extravasamento vascular na dengue ocorre dias após a redução significativa ou eliminação do vírus no organismo sugere que a resposta e interação de células do sistema imune podem ser responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular característico da FHD/SCD, para além da hipótese da amplificação mediada por anticorpos (Leong *et al.*, 2007).

Uma das principais características da fisiopatologia da dengue grave é o aumento da permeabilidade vascular, que pode levar ao choque hipovolêmico (Yacoub *et al.*, 2015) (Figura 1.4). Existem evidências de que após a ativação de células T, há intensa liberação de citocinas (“*cytokine storm*” - tempestade de citocinas), o que intensifica o processo inflamatório, cria um desbalanço entre a produção de mediadores anti- e pro-inflamatórios, e ocasiona na ativação e disfunção do endotélio vascular, e conseqüente o extravasamento de fluidos e proteínas.

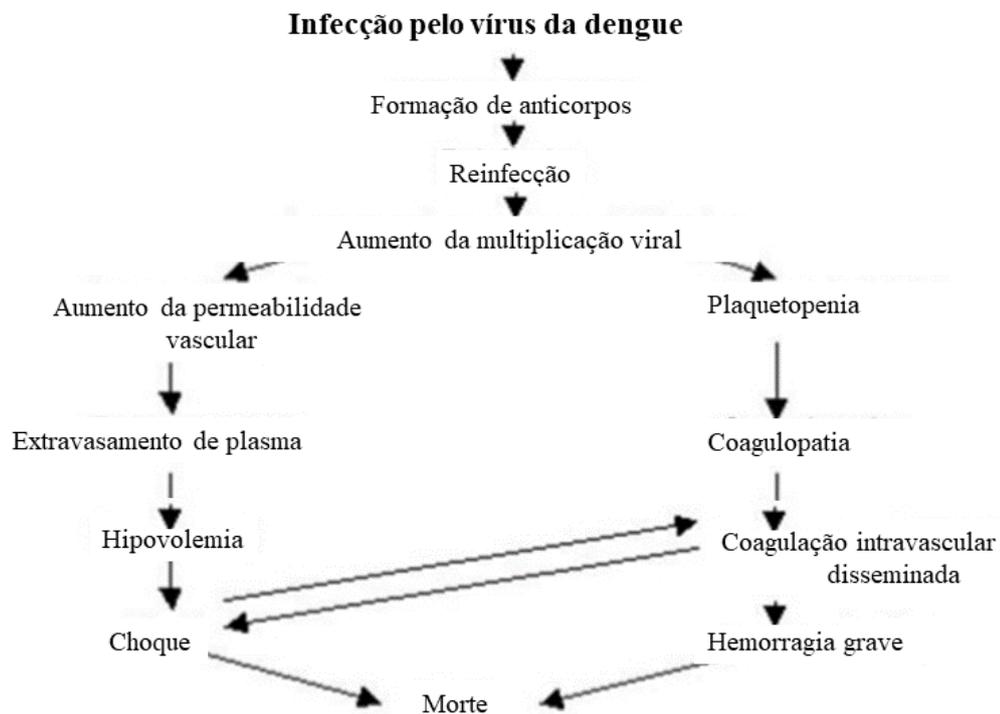


Figura 1.4 Esquema da patogênese da dengue. Principais alterações fisiopatológicas ocorridas na dengue grave. Adaptado de Shah & Dublish., 2005.

Altas concentrações dessas citocinas e quimiocinas, secretadas por células infectadas ou células imunes em resposta à infecção, majoritariamente células T, monócitos, mastócitos, macrófagos e células endoteliais, estão presentes no plasma de pacientes com FHD/SCD (Gubler, 1998; Pang *et al.*, 2007; Cipitelli *et al.*, 2019). Foi observado que citocinas e quimiocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1 e MIF estão presentes no plasma de pacientes com dengue em taxas elevadas, e demonstram uma importante relação com o grau de gravidade da doença (Fink *et al.*, 2006; Pang *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2008; Srikiatkachorn & Green, 2010; Malavige *et al.*, 2012; Her *et al.*, 2017).

Para além de citocinas e quimiocinas, outros fatores também contribuem com o aumento da permeabilidade vascular e a falha na circulação características na patologia da FHD/SCD. Jeewandara e colaboradores (2015) observaram maiores níveis do mediador lipídico fator de ativação de plaquetas (PAF) no plasma de pacientes com dengue em comparação com voluntários saudáveis. Além disso, estudos *in vitro* com células endoteliais humanas de veia de cordão umbilical (HUVEC)

inferiram que o PAF contribui para o extravasamento vascular que ocorre durante a dengue, o que pode ser revertido com o bloqueio do receptor desse mediador (Jeewandara *et al.*, 2015).

Há evidências na literatura de que lipídios bioativos, como leucotrienos, também participam na resposta inflamatória da dengue e são capazes de induzir aumento da permeabilidade endotelial (Loke *et al.*, 2013; St John *et al.*, 2013). Fatores de crescimento como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) também estão em taxas elevadas no plasma de pacientes com dengue grave, em comparação com pacientes com dengue branda e de indivíduos saudáveis (Furuta *et al.*, 2012; Patro *et al.*, 2019). Além disso, LIN e colaboradores (2019) constataram que os altos níveis de hialuran encontrados no plasma de pacientes com dengue no início da infecção podem ser um preditor independente para a ocorrência de sinais de alarme, e consequentemente para a dengue grave.

Outro aspecto importante na fisiopatologia da dengue é a proteína não estrutural 1 do vírus da dengue (NS1), que tem sido citada na literatura como um dos fatores responsáveis pelo extravasamento vascular (Glasner *et al.*, 2018). Estudos *in vitro*, em células mieloides, e *in vivo*, em modelo murino, indicam que a proteína NS1 contribui para o aumento da permeabilidade vascular e a ativação do receptor tipo Toll 4 (TLR4), resultando, portanto, na liberação de citocinas pró-inflamatórias (Modhiran *et al.*, 2015). Glasner e colaboradores (2017) demonstraram, *in vitro*, que o extravasamento vascular induzido pela NS1 é independente de citocinas inflamatórias, porém dependente de componentes do glicocálix das células endoteliais. Também foi proposto que a proteína NS1 é capaz de ativar o sistema complemento, e que essa ativação implica na geração de anafilotoxinas locais e sistêmicas, contribuindo para o extravasamento vascular exacerbado que ocorre em pacientes com FHD/SCD (Avirutnan *et al.*, 2006). Dessa forma, a presença de níveis consideráveis da proteína viral NS1 em amostras biológicas pode ser um bom indicador precoce da dengue grave (Srikiatkachorn & Green, 2010).

Junto com o aumento da permeabilidade vascular observada na FHD/SCD, há também a diminuição das taxas de plaquetas (plaquetopenia) associada a manifestações hemorrágicas (Figura 1.4). Os mecanismos envolvidos na plaquetopenia durante a dengue incluem desde a supressão da hematopoese, na

medula óssea, até a destruição periférica das plaquetas pelo vírus (Hottz *et al.*, 2011). Sabe-se que o vírus da dengue é capaz de infectar e ativar as plaquetas, tornando-as importantes efetores imunes na fisiopatologia da doença, e que essa ativação está relacionada com apoptose e conseqüentemente com a plaquetopenia em pacientes infectados com dengue (Hottz *et al.*, 2013a; Ojha *et al.*, 2017). CHAO e colaboradores (2019) demonstraram que a proteína NS1 do vírus da dengue por si só já é capaz de ativar diretamente as plaquetas via receptor TLR4, levando à trombocitopenia e à hemorragia. Além disso, as plaquetas ativadas e apoptóticas têm a capacidade de formar agregados com monócitos, induzindo uma resposta imune e liberação de citocinas como IL-1 β , IL-8, IL-10, que por fim contribuem para a patogênese da dengue (Hottz *et al.*, 2014). Em estudos do nosso grupo foi observado que micropartículas plaquetárias são uma grande fonte de IL-1 β na infecção da dengue, através da ativação do inflamassoma NLRP3, e que a IL-1 β contida nessas micropartículas é capaz de induzir aumento da permeabilidade quando entram em contato com células endoteliais (Hottz *et al.*, 2013b). Essa evidência mostrou que, de forma indireta, as plaquetas também contribuem com o extravasamento vascular observado na dengue.

Outros estudos na literatura também relacionaram a liberação de micropartículas como um possível mecanismo capaz de explicar a fisiopatologia da dengue. Punyadee e colaboradores (2015) observaram, através de análises de amostras *ex vivo* de pacientes infectados, em diferentes graus de gravidade da doença, que micropartículas derivadas de eritrócitos e plaquetas são as principais populações dessas microvesículas circulantes em indivíduos com dengue. Alguns pesquisadores, inclusive, sugerem que as micropartículas podem ser bons candidatos a biomarcadores para diferenciar a dengue de outras doenças virais hemorrágicas (Punyadee *et al.*, 2015; Patil *et al.*, 2018)..

1.1.4.1 O aumento da permeabilidade vascular na dengue

As células endoteliais são componentes importantes do endotélio vascular que revestem, através de uma fina monocamada, o interior de vasos sanguíneos no organismo. Em conjunto com células do músculo liso e do tecido conjuntivo, formam a estrutura endotelial, a qual é responsável por manter a fluidez do sangue, controlar a permeabilidade seletiva ao fluido e a pequenas moléculas e por regular o fluxo

sanguíneo (Dejana *et al*, 2009). As junções intercelulares são as regiões na barreira endotelial responsáveis pela maioria de suas funções em processos fisiológicos e patológicos, inclusive pela característica semipermeável da barreira (Gianotta *et al*, 2013). Existem dois principais tipos de junções entre as células endoteliais: as junções oclusivas, como as proteínas da zona de oclusão (ZO-1, ZO-2, ZO-3) e a ocludina; e as junções de aderência, como a caderina do endotélio vascular (VE-caderina) (Trani & Dejana, 2015). Apesar das funções clássicas das células endoteliais relacionadas à hemostase já estarem bem estabelecidas, nas últimas décadas também foi demonstrada a capacidade dessas células de adquirir novas características ao serem ativadas, de produzir e secretar fatores, como também de participar ativamente de processos importantes como a inflamação (Poher & Sessa, 2007). Logo, o fenótipo das células endoteliais ativadas é considerado permeável, protrombótico e pró-inflamatório (Page & Liles, 2013).

Estudos na literatura mostram que o vírus da dengue é capaz de infectar e ativar células endoteliais, como já foi observado por exemplo por Huang e colaboradores (2000), que por sua vez mostrou que o vírus ativa células endoteliais humanas e leva a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8. Apesar disso, propõe-se que não é através do mecanismo de infecção que o aumento da permeabilidade ocorre diretamente durante a doença.

Como o aumento da permeabilidade endotelial na dengue é transiente, com duração de 24 a 48 horas, sugere-se que o fator que contribui de forma direta ou indireta para a disfunção endotelial é a liberação de mediadores inflamatórios, que presentes no plasma sanguíneo, prejudicam a barreira semipermeável do endotélio e acarretam no extravasamento de fluidos e proteínas, especialmente nos pulmões e na cavidade abdominal (Cardier *et al.*, 2005; Martina *et al.*, 2009; Appanna *et al.*, 2012; Raekiansyah *et al.*, 2014; Tramontini *et al.*, 2017). Além disso, estudos que realizaram a análise de amostras pós morte não detectaram a proteína NS1 ou outras proteínas virais, nem componentes do sistema complemento no endotélio, sugerindo que a disfunção endotelial na dengue é ocasionada por mediadores inflamatórios produzidos pelo próprio indivíduo infectado (Saw *et al.*, 2014). Portanto, a curta duração do extravasamento do plasma durante a dengue grave é o principal motivo para acreditar que as células endoteliais não sofrem efeitos destrutivos, como a apoptose ou necrose

por exemplo, mas sim efeitos de natureza funcional, já que é um processo rapidamente revertido durante o curso da doença (Leong *et al.*, 2007).

As alterações estruturais na célula ou no rearranjo do citoesqueleto podem contribuir para o aumento da permeabilidade endotelial durante a infecção pelo vírus da dengue. Como exemplo, Appanna e colaboradores, em 2012, publicaram um estudo no qual se demonstrou, através de imunofluorescência, que células HUVEC estimuladas *in vitro* com o plasma de pacientes com dengue grave apresentaram uma mudança na morfologia celular e desarranjo das proteínas de junção intercelular VE-caderina e ZO-1. Como já citado anteriormente, o mediador PAF presente no plasma de pacientes com dengue é capaz de induzir aumento da permeabilidade de células endoteliais, e o mecanismo por trás desse efeito também pode ser explicado pela diminuição da expressão da proteína ZO-1 (Jeewandara *et al.*, 2015). Também há evidências de que a produção de IL-8 por células endoteliais da microvasculatura da derme humana (HMEC-1) infectadas pelo vírus contribui para as mudanças no citoesqueleto e na proteína ocludina (Talavera *et al.*, (2004). Além disso, Rathore e colaboradores (2019) observaram que a proteína triptase, produzida por mastócitos em resposta ao vírus da dengue é capaz de aumentar a permeabilidade vascular ao reduzir a quantidade da molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1) nas células endoteliais, o que resulta na perda das junções intercelulares oclusivas. Vitoria e colaboradores (2019), por sua vez, demonstraram que o aumento da expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais durante a dengue pode ser considerado um indicador do aumento da permeabilidade vascular no tecido renal.

1.2 12-HETE

O ácido hidroieicosatetraenóico (12-HETE) é um dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico (AA). O AA é um ácido graxo polinsaturado presente nos fosfolípidos de membranas biológicas e em corpúsculos lipídicos das células eucarióticas (Brash, 2001). A partir de estímulos como fatores de crescimento, hormônios ou citocinas, por exemplo, o AA é liberado através da ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). Desse ácido graxo são produzidos diversos mediadores lipídicos inflamatórios no organismo, como as prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX), pela ação da enzima ciclooxigenase (COX); leucotrienos e os HETEs pelas

lipoxigenases (LOX); e os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), através das enzimas da citocromo P450 (CYP450) (Porro *et al.*, 2014) (Figura 1.5). De acordo com as circunstâncias ou o órgão e tecido envolvidos, o equilíbrio entre as vias pode ser alterado, modificando o resultado da catálise enzimática (Aleem *et al.*, 2008).

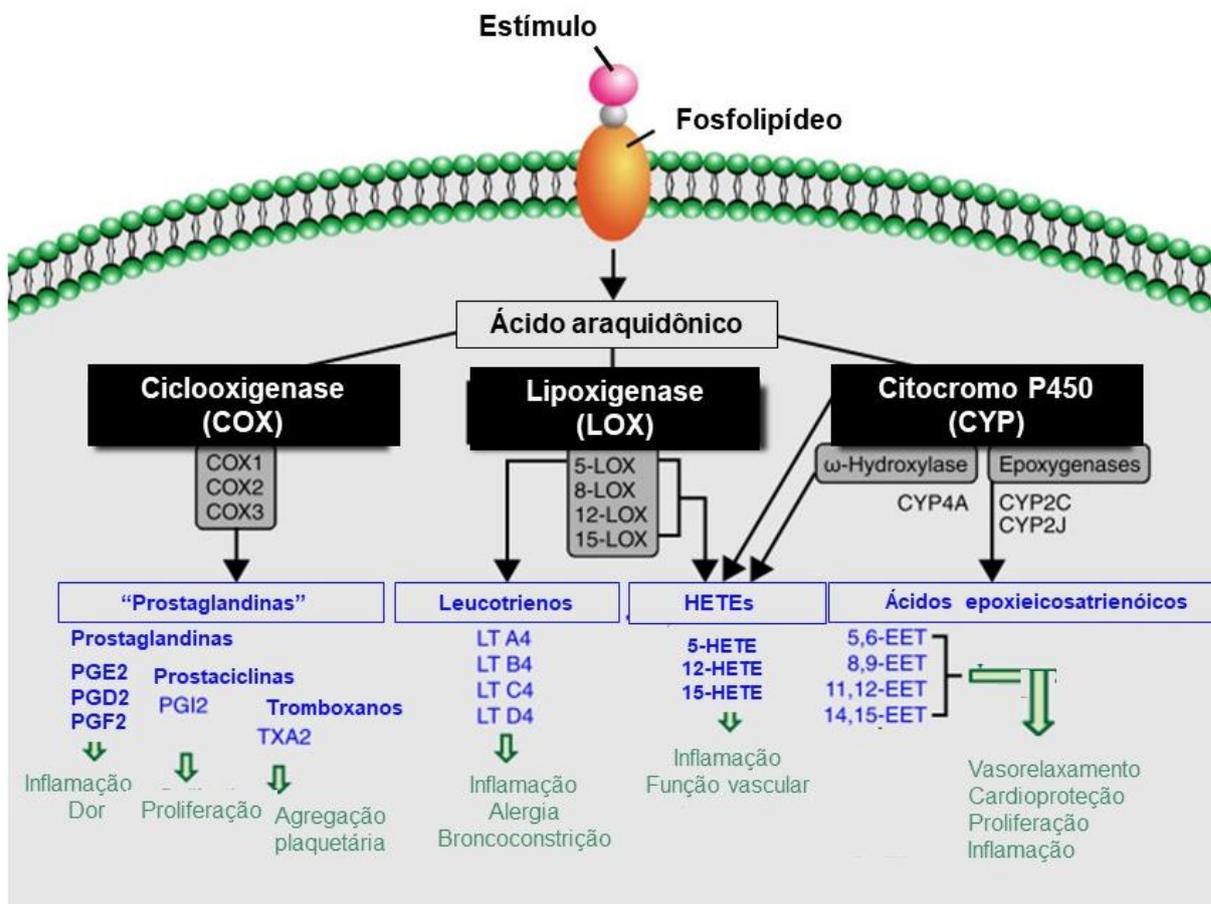


Figura 1.5: Metabolismo do ácido araquidônico. Eicosanoides bioativos derivados das três diferentes vias do metabolismo do ácido araquidônico. Em verde, as principais funções biológicas dos metabólitos no organismo. Adaptado de Panigraphy *et al.*, 2010.

A principal via para a formação dos HETEs é através da reação de redução dos produtos primários da LOX, os ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico (HpETEs) (Powell & Rokach, 2014). Assim, uma vez formados, os HpETEs são rapidamente convertidos nos HETEs. A via da CYP450 também é capaz de gerar os HETEs, apesar de predominantemente gerar o enantiômero R desses mediadores, principalmente no caso do 12-HETE (Capdevila *et al.*, 1986). Enquanto existem apenas três tipos conhecidos da enzima COX (COX-1 e COX-2, e mais recentemente a COX-3), há pelo menos seis tipos da enzima LOX, que são conservadas evolutivamente (Chandrasekharan *et al.*, 2002; Haeggström & Funk, 2011).

As LOX de mamíferos são nomeadas de acordo com os locais de oxidação do AA: os principais locais dessa reação estão nas posições -5, -12 e -15, originando as enzimas 5-, 12- e 15-LOX (Porro *et al.*, 2014). A enzima 12(S)-LOX, expressa em plaquetas humanas, é responsável pela produção majoritária do enantiômero S do 12-HETE (12(S)-HETE) (Aleem *et al.*, 2008), e o gene ALOX12, codificante para essa enzima, também é expresso em queratinócitos e em algumas células tumorais (Haeggström & Funk, 2011). A enzima 15-LOX é expressa de forma mais ampla nos tecidos do organismo do que a 12-LOX, e também é capaz de gerar 12(S)-HpETE como um produto minoritário (Dobrian *et al.*, 2011).

Embora a maior parte do 12-HETE seja encontrado na forma de seu enantiômero S, existe outra 12-LOX humana, expressa em leucócitos e fibroblastos da pele, e codificada pelo gene ALOX12B, capaz de produzir o 12(R)-HETE (Yoshimoto & Takahashi, 2002). Woollard e colaboradores (1986) descreveram pela primeira vez a diferença estereoquímica entre o 12-HETE isolado de plaquetas e daquele isolado de lesões de psoríase: o metabólito retirado das lesões apresentou um grupamento R-hidroxil, ao invés da presença do enantiômero S, o produto esperado da LOX “tradicional”. Assim, esses pesquisadores sugeriram que a via da CYP450 estaria ativa nas lesões de psoríase, explicando a quiralidade até então incomum do 12-HETE.

Em relação aos mecanismos de ação nas células, sabe-se que de forma similar a outros eicosanoides, as atividades do 12-HETE são desencadeadas pelo seu reconhecimento por receptores específicos nas membranas plasmáticas das células (Gomes *et al.*, 2018). Comprovando isso, Yokomizo e colaboradores (2001) descreveram o agonismo do 12-HETE para os receptores de leucotrieno B₄ (LTB₄) acoplados à proteína G (GPCR): BLT₁ e BLT₂. O 12-HETE, por sua vez, foi capaz de se ligar com alta afinidade ao receptor BLT₂ (de baixa afinidade para o LTB₄), e assim ativá-lo, sendo esta uma descoberta importante, uma vez que este receptor é expresso em diversos tecidos. Em contraste, o BLT₁, que é expresso predominantemente em leucócitos e é de alta afinidade para o LTB₄, é considerado um receptor de baixa afinidade para o 12-HETE. Seguindo essas informações, Kim e colaboradores (2008) realizaram um estudo que corroborou com a hipótese de que o receptor BLT₂ está envolvido na indução de coceira pelo 12-HETE em camundongos, através de sua inibição pela ação do antagonista do receptor BLT₂, que foi

administrado. Além disso, recentemente, Guo e colaboradores (2011) identificaram um outro GPCR de alta afinidade para o 12(S)-HETE, chamado de GPR31 ou 12-HETER. Nesse estudo, foi demonstrado que através da ligação nesse receptor, o 12(S)-HETE foi capaz de ativar vias de sinalização em células de câncer de próstata, que induziram a proliferação celular e outras funções relacionadas. Também foi visto que o 12(R)-HETE não é capaz de se ligar ao GPR31, e em relação a outros metabólitos como o 5(S)-HETE e 15(S)-HETE, há relativamente baixa afinidade a esse receptor. Ambos enantiômeros do 12-HETE são capazes de se ligar e agir como antagonistas competitivos nos receptores de TX, que medeiam as atividades biológicas do TXA₂ e da PGH₂, como a agregação plaquetária, segundo Fonlupt e colaboradores (1991). A atividade antagonista foi descrita pela capacidade do 12-HETE de relaxar células endoteliais de artéria mesentérica que anteriormente sofreram constrição por um mimético do TXA₂ (Siangjong *et al.*, 2013).

O 12-HETE já foi descrito como um metabólito com funções biológicas importantes em processos inflamatórios. Demonstrou-se que o 12-HETE foi capaz de induzir a quimiotaxia de neutrófilos humanos, de forma direta (Cunningham & Wollard, 1987), como também através da expressão da quimioatratante de macrófagos (MCP-1/CCL2) por macrófagos murinos (Wen *et al.*, 2008). Além disso, o 12-HETE também foi responsável por induzir em macrófagos a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α (Wen *et al.*, 2007) e a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (Patricia *et al.*, 1999). Apesar da 12-LOX e de seu principal produto, o 12(S)-HETE, terem sido descobertos em plaquetas (Hamberg, 1974), suas respectivas funções fisiológicas nessas células ainda não estão bem elucidadas, visto que o 12-HETE possui efeitos tanto pró-trombóticos como anti-trombóticos. Assim, definir precisamente o papel desse lipídeo na regulação da função plaquetária tem sido desafiador (Yeung & Holinstat, 2011). Apesar disso, o 12(S)-HETE mostrou-se um metabólito capaz de aumentar a expressão de moléculas de adesão na superfície, como a P-selectina (Ozeki *et al.*, 1998), que é um marcador de ativação plaquetária.

1.2.1 12-HETE em fisiopatologias

O 12-HETE também participa de processos patológicos no organismo, e contribui nos mecanismos de desenvolvimento de certas doenças, como o câncer,

diabetes e doenças cardiovasculares. Dessa forma, esse eicosanoide vem sendo citado nos últimos anos por alguns pesquisadores como um fator de significância clínica.

Há diversos estudos na literatura que relacionam o 12-HETE com mecanismos de progressão, adesão e transmigração em vários tipos de câncer. O rompimento da barreira endotelial dos vasos linfáticos está envolvido com a capacidade de migração de células tumorais, relacionando com o desenvolvimento de metástases pelo organismo (Hanahan & Weinberg, 2011). Nguyen e colaboradores (2016) demonstraram que o 12-HETE secretado por células de câncer de mama foi capaz de ativar uma cascata de sinalização nas células do endotélio linfático, que está envolvida com a regulação da contração celular através da actina e miosina, causando a retração dessas células e por fim levando ao rompimento da barreira. Em conjunto, a quebra da barreira endotelial de vasos não linfáticos, como de artérias, também pela ação do 12-HETE, é um dos mecanismos descritos para facilitar a metástase de células tumorais. Foi demonstrado que o 12-HETE secretado por células de câncer de mama, através de micropartículas, foi responsável por induzir a retração das células endoteliais (Uchida *et al.*, 2007). Um estudo anterior demonstrou o papel do 12-HETE exógeno na adesão de células de melanoma murino a células endoteliais, através da expressão aumentada de integrinas na superfície, de maneira dose-dependente (Chopra *et al.*, 1991). Em células de tumor colorretal, o 12-HETE já foi descrito como um importante indutor do fenótipo migratório (Klamp *et al.*, 2011), como também em células de câncer de esôfago. Dessa forma, a expressão da 12-LOX foi proposta como um bom biomarcador para o prognóstico de pacientes com carcinoma esofágico (Qu *et al.*, 2019). Além disso, também já foram detectados altos níveis de 12-HETE em lesões de carcinoma de células escamosas (Laquer *et al.*, 2018).

Em cultura de células humanas de câncer de próstata, o 12-HETE foi identificado como o metabólito dominante do AA, além de seus níveis nesse tipo de câncer, obtidos através de biópsias, estarem aumentados (Yang *et al.*, 2012). Dessa maneira, os pesquisadores sugeriram que esse metabólito pode ser um possível marcador para a prognose da doença, ou até mesmo para a resposta em terapias contra esse câncer. Também no câncer de próstata, há evidências de que a superexpressão da 12-LOX nessas células resulta em um nível três vezes maior de VEGF, quando comparado às células do grupo controle (Nie *et al.*, 2006), associando

a angiogênese com o crescimento e progressão do câncer. Além disso, Pidgeon e colaboradores (2002) observaram que através da inibição da atividade da 12-LOX nesse mesmo tipo de câncer, ocorre a paralisação do ciclo celular e a indução da apoptose nas células.

O 12(R)-HETE, como já mencionado, foi primeiramente isolado de lesões de psoríase na pele (Hammarstrom *et al.*, 1975), e a partir desse estudo foram realizadas posteriores análises que compararam a configuração distinta desse metabólito com aquele produzido por plaquetas. Os pesquisadores que o identificaram observaram concentrações muito altas do 12(R)-HETE nas lesões na epiderme, sugerindo a esse eicosanoide uma importância tanto na fisiopatologia quanto no diagnóstico da psoríase.

Alguns estudos relacionam a atividade do 12-HETE no organismo com o desenvolvimento e grau de gravidade da diabetes. Foi proposto que a atividade aumentada da 12/15-LOX e a consequente produção de 12-HETE contribuem para o elevado estresse oxidativo, inflamação e injúria renal em camundongos diabéticos, através da inibição dessa enzima (Faulkner *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que também na diabetes o 12-HETE foi capaz de reduzir a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas humanas, contribuindo para o aumento da morte celular nessas ilhotas (Ma *et al.*, 2010). Taylor-Fishwick e colaboradores (2015) sugeriram que a inibição seletiva da atividade da 12-LOX é capaz de conferir proteção às células β das ilhotas pancreáticas durante exposição a citocinas inflamatórias. Através dessa conclusão, os autores propuseram a ideia de que a 12-LOX pode ser um alvo interessante na prevenção da perda de função das células β na diabetes. Além disso, também foi identificado que indivíduos recém diagnosticados com diabetes do tipo 1 apresentaram altos níveis séricos de 12-HETE (Henessy *et al.*, 2016).

Duchez e colaboradores (2015) observaram que a internalização de micropartículas plaquetárias por neutrófilos em indivíduos com artrite reumatóide, e a presença delas nas juntas de camundongos é dependente da expressão de enzimas relacionadas com a produção do 12(S)-HETE. Esse estudo evidenciou mais um exemplo de mecanismo molecular o qual o 12-HETE atua durante o desenvolvimento de doenças. Existem evidências de que o 12-HETE também participa dos mecanismos fisiopatológicos da formação da placa de ateroma: a enzima 12/15-LOX medeia as interações entre monócitos e células endoteliais na parede dos vasos - que

é um dos primeiros passos na formação das placas - durante a aterogênese, através da regulação da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio, em camundongos (Reilly *et al.*, 2004; Manega *et al.*, 2019). Zhang e colaboradores (2018) identificaram que o eixo de sinalização 12-LOX – 12-HETE – GPR31 é um determinante de grande importância no processo de lesão hepática por isquemia-reperfusão, e assim, posteriormente, Yang e colaboradores (2019) observaram que o mesmo eixo de sinalização descrito esteve presente no processo de recorrência de carcinoma hepatocelular pós lesão de isquemia-reperfusão (Yang *et al.*, 2019).

Em relação ao aumento da permeabilidade vascular, Youmine e colaboradores (1997) descreveram primeiramente, em um modelo funcional de células endoteliais primárias da aorta, que o 12-HETE agiu como um indutor da permeabilidade endotelial, a qual é uma das principais funções das células endoteliais. Alguns anos depois, outro estudo indicou que a ativação da 12-LOX e a consequente produção de seu metabólito, o 12-HETE, podem estar relacionadas com o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma induzidos pelo estímulo da bradicinina e pelo PAF na pele *in vivo*, um órgão no qual a via da LOX está altamente ativada (Wang *et al.*, 1999). Alguns pesquisadores sugeriram que a atividade da 12/15-LOX e os seus eicosanoides derivados são fatores importantes que contribuem para o aumento da permeabilidade vascular na retina durante a retinopatia diabética (Othman *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2015). Já em 2009, Zarbock e colaboradores descreveram que o bloqueio ou eliminação da enzima 12/15-LOX foi capaz de aumentar a sobrevivência e reduzir a permeabilidade vascular em camundongos em modelo de injúria pulmonar induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Dessa forma, o estudo auxiliou no entendimento de como o 12-HETE pode agir e mediar a permeabilidade vascular *in vivo* nesse modelo de injúria pulmonar.

1.3 Hipótese e justificativa

A dengue é uma das arboviroses mais importantes do mundo atualmente. O principal indicador de gravidade da dengue é o aumento da permeabilidade endotelial, que está relacionado com a resposta do organismo frente a infecção e a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, o que intensifica a resposta do hospedeiro além de ocasionar a ativação e disfunção do endotélio vascular, e consequentemente o extravasamento de fluidos e proteínas através desse endotélio. Além disso,

metabólitos do metabolismo do ácido araquidônico, como o 12-HETE, têm sido amplamente apresentados como mediadores ativos no processo inflamatório e em mecanismos fisiopatológicos. Entretanto, o papel do 12(S)-HETE, que é produzido majoritariamente pelas plaquetas ativadas, na fisiopatologia da doença ainda não foi investigado.

Tendo em vista os conceitos apresentados, nossa hipótese é que o 12(S)-HETE liberado durante a infecção pelo vírus da dengue é capaz de ativar o endotélio, levando ao aumento da permeabilidade endotelial e a liberação de mediadores inflamatórios. Dessa forma, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares e celulares da disfunção endotelial que ocorre durante a dengue e de como o metabólito 12-HETE está relacionado com essa patologia, é de grande importância para que posteriormente sejam identificados possíveis alvos terapêuticos para essa doença.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do mediador 12-HETE na ativação de células endoteliais e sua participação na permeabilidade vascular associada à dengue.

2.2 Objetivos específicos

- I. Quantificar os níveis de 12-HETE no plasma de pacientes com dengue;
- II. Avaliar o papel do mediador 12-HETE na ativação e permeabilidade das células endoteliais humanas *in vitro*;
- III. Analisar o papel do 12-HETE na permeabilidade das células endoteliais humanas *in vitro* estimuladas com plasma de pacientes com dengue.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostras Clínicas

Amostras de sangue periférico foram obtidas de 64 pacientes com dengue assistidos no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC) – FIOCRUZ durante as epidemias ocorridas de 2011 a 2013. Foram colhidos 17 mL de sangue a partir de punção venosa usando um escalpe de 21G em uma seringa contendo 3 mL de anticoagulante composto com ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose (ACD). O sangue foi centrifugado a 200 x g por 20 minutos a temperatura ambiente, e através da formação de um gradiente, o plasma foi recolhido e novamente centrifugado por 2500 x g, pelo mesmo tempo. Todas as amostras foram identificadas e armazenadas à -80°C, e para os ensaios de *Transwell*, os plasmas foram diluídos em meio de cultura, na concentração final de 10%. O diagnóstico foi confirmado sorologicamente a partir da detecção de IgM e IgG contra a proteína viral E (E-Den01M e E-Den01G; PanBio) e/ou do antígeno viral NS1 (BioRad); ou molecularmente a partir da detecção do RNA viral. Os pacientes foram atendidos no Hospital do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ) de acordo com projeto já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no mesmo instituto (2010, #016/2010). Todos os participantes foram esclarecidos sobre os termos da pesquisa e assinaram o Termo de consentimento esclarecido. Também foram obtidas 18 amostras de sangue periférico de voluntários saudáveis, os quais os plasmas foram obtidos e processados da mesma forma do que o plasma dos pacientes, para que fossem utilizados como controle nos ensaios realizados. A Tabela 1 identifica as principais características clínicas dos pacientes e indivíduos saudáveis em questão.

3.2 Dosagem de eicosanoides

Os níveis de 12(S)-HETE e tromboxano B₂ do plasma de pacientes com dengue e de voluntários saudáveis foram dosados por kits de imunoensaio enzimático (EIA), do fabricante Enzo Life Sciences, e as instruções foram seguidas. As reações enzimáticas foram lidas em uma leitora de placas (SpectraMax 190 - Molecular Devices), no comprimento de onda de 405 nm, e analisadas no software SoftMax Pro versão 5.4.1.

Tabela 1: Características dos pacientes com dengue e voluntários saudáveis:

	Controle (18)	Dengue branda (35)	Dengue com sinais de alarme ¹ (26)	Dengue grave ² (3)
Idade (anos)	31 (29-34)	39 (31-46)	38 (31-45)	34 (19-40)
Gênero (masculino)	8 (44.44 %)	19 (54.3 %)	19 (73 %)	1 (33.33 %)
Contagem de plaquetas (x1,000 /mm ³)	–	116.5 (95-170)	115 (85-162)	28 (22-88)*
Hematócrito %	–	42.6 (39.8-44.6)	43.3 (40.5-45.7)	39.7 (39.1-45.2)
Albumina, g/dL	–	3.7 (3.4-4.1)	3.6 (3.2-3.6)*	2.9 (2.9-3.4)*
TGO/AST, IU/L	–	52 (32.7-94)	40.5 (34-106.8)	158 (132-176)*
TGP/ALT, IU/L	–	82 (47.5-110.3)	60.5 (46.2-115.5)	108 (69-157)
Manifestações hemorrágicas ³	–	10 (28.6 %)	13 (50 %)	3 (100 %)
Sinais clínicos do aumento da permeabilidade vascular ⁴	–	10 (28.6 %)	20 (76,9 %)	3 (100%)
Hidratação intravenosa	–	4 (11.4 %)	13 (50 %)	3 (100 %)
Infecção secundária	–	26 (74.3 %)	22 (84.6 %)	2 (66.66 %)
PCR positivo	–	11 (31.5%)	15 (57.7%)	1 (33.33%)
DENV-1	–	4 (36.36%)	6 (40%)	1 (100%)
DENV-4	–	7 (63.63%)	9 (60%)	–
IgM+	–	27 (77.1%)	23 (88.5%)	3 (100%)
IgG+	–	29 (82.9%)	22 (84.6%)	3 (100%)
NS1+	–	12 (34.3%)	6 (23.1%)	1 (33.33%)

¹Dor ou sensibilidade abdominal, vômito persistente, edema, hipotensão postural, sangramento de mucosa, ou aumento no hematócrito concorrente com declínio rápido da contagem de plaquetas, de acordo com os critérios da WHO (2009);

²Extravasamento de plasma grave, acúmulo de líquido em cavidade – ascite (evidenciado por ultrassonografia abdominal) e/ou sangramento grave, de acordo com os critérios da WHO (2009);

³Sangramento de gengiva, metrorragia, hematêmese, hematúria, petéqueas e/ou exantema;

⁴Hipotensão postural, oligúria, ascite, hipoalbuminemia e/ou >20% de aumento no hematócrito.

*p<0,05 em relação à dengue branda.

Dados são expressos como mediana (intervalo interquartil) ou número (%).

3.3 Cultura de células

Células HMVEC-L (Human Lung Microvascular Endothelial Cell) (Lonza) foram cultivadas em meio EBM-2MV (Lonza) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), fatores de crescimento (0.04% de hidrocortisona, 0.4% do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), 0.1% do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), 0.1% do fator de crescimento tipo insulina (IGF), 0.1% do fator de crescimento epidermal (EGF), 0.1% do ácido ascórbico) e antibiótico e antifúngico (0.1% de gentamicina/anfotericina-B), todos da Lonza. As células foram então mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C, até atingirem 85% de confluência. As passagens foram realizadas com solução de tripsina/0,025% de EDTA (GIBCO – Thermo Fisher Scientific), e foram utilizadas células entre as passagens 6 e 10.

3.4 Reagentes

Foram utilizados nos ensaios o reagente 12(S)-HETE (Cayman Chemical) (0.1 μM e 1 μM), diluído em etanol. Os antagonistas dos receptores BLT₁ (U-75302) e BLT₂ (LY255283), aliquotados e diluídos em DMSO, ambos da Cayman Chemical, também foram utilizados na concentração de 1 μM. Os veículos etanol ou DMSO utilizados nos ensaios estavam nas maiores concentrações, de acordo com os reagentes.

3.5 Ensaio de permeabilidade endotelial *in vitro*

Células HMVEC-L, na concentração de 3x10⁴ células por poço, foram cultivadas nos *inserts* de placas de *Transwell* de 24 poços (4 μm) (Corning HTS-*Transwell*) por 72h, até atingirem confluência. As células foram estimuladas com 12(S)-HETE (0,1 μM e 1 μM) por 2 e 24 horas. Nos experimentos de bloqueio do receptor, as células foram pré-tratadas por 30 minutos com LY255283 e estimuladas com 10% do plasma de pacientes com dengue ou voluntários saudáveis, diluídos em meio de cultura, por 2 horas. Após o tempo de estímulo e tratamentos, a permeabilidade endotelial foi mensurada através da passagem de 50 μM de albumina-fluoresceína isotiocianato (FITC) (Sigma-Aldrich) pela monocamada de células, por 15 minutos, para a câmara inferior do sistema de *Transwell*. A quantidade de albumina-FITC foi lida em fluorescência, em um espectrofotômetro (SpectraMax M5 - Molecular Devices), com 485 nm de excitação e 520 nm de emissão.

3.6 Imunofluorescência

Células HMVEC-L, na concentração de 1×10^5 células por poço, foram plaqueadas em placas de 24 poços (Costar) cobertas com lamínulas circulares, e mantidas por 48 horas. Após o estímulo de 2 horas com $1 \mu\text{M}$ de 12-HETE ou veículo etanol, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%), permeabilizadas e incubadas com o anticorpo primário anti-CD144) (BD Bioscience) (1:200, durante a noite) ou controle isotípico IgG. Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo secundário DyLight 550 (Bethyl Laboratories) (1:500, 1 hora) e com Faloidina-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) (1:250, 20 minutos). Foi utilizado o meio de montagem Vectashield com DAPI (Vector Laboratories). As imagens foram obtidas no microscópio confocal de fluorescência Zeiss LSM710, na objetiva de 40, adquiridas e analisadas através do programa software Zeiss Zen - Black Edition.

3.7 Citometria de fluxo

Células HMVEC-L foram plaqueadas em placas de 24 poços (Costar) e mantidas por 48 horas. Assim, foram estimuladas com 12(S)-HETE ($0,1 \mu\text{M}$ e $1 \mu\text{M}$) ou o veículo etanol por 2 horas, e também pré-tratadas com U-75302 e LY255283 por 30 minutos e em seguida estimuladas com plasma de pacientes com dengue ou voluntários saudáveis (10%) por 2 horas. Após o tempo de estímulo, as células foram dissociadas e soltas da placa através da ação da solução Accutase (StemPro – Thermo Fisher Scientific), ajustadas para a concentração de 1×10^5 células/ml, incubadas com anticorpo anti-CD144 conjugado a PE (BD Pharmingen) (1:10, 20 minutos), ou IgG₁ PE (controle negativo) (BD Biosciences), e assim fixadas com PFA 4%. Os eventos foram adquiridos em citômetro FACSCalibur (BD Bioscience), e as aquisições analisadas com os programas CellQuest Pro (BD Bioscience) e FlowJo V10 (BD Bioscience).

3.8 Dosagem de citocinas

As citocinas presentes no sobrenadante das células foram quantificados por kits do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Os mediadores analisados foram IL-6, IL-8, MIF (R&D Systems), e as instruções do fabricante foram seguidas. As reações enzimáticas foram lidas em uma leitora de placas (SpectraMax 190 -

Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm e analisadas no software SoftMax Pro versão 5.4.1.

3.9 Ensaio da Lactato Desidrogenase

A viabilidade das células endoteliais foi avaliada através da quantificação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das células estimuladas com 12(S)-HETE (0,1 μ M e 1 μ M) ou etanol por 2 horas. A liberação da enzima LDH para o meio extracelular apenas ocorre em caso de ruptura da membrana plasmática, e conseqüentemente morte celular. Foi utilizado o kit de fluorescência CytoTox 96-NonRadioactive Cytotoxicity Assay (Promega) e as instruções do fabricante foram seguidas. O controle 100% morte foi feito com a concentração de 0,9% de Triton X-100 (Thermo Scientific), a qual é capaz de permeabilizar as células.

3.10 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism (GraphPad Software Incorporation, versão 5.0). Foi utilizado o teste t de Student e o teste ANOVA, seguido por pós-testes. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1 12-HETE e tromboxano B₂ no plasma de pacientes com dengue

Visto que as plaquetas são importantes efetores imunes durante a fisiopatologia da dengue, nosso primeiro objetivo foi o de quantificar os níveis de um dos principais produtos do metabolismo do ácido araquidônico em plaquetas, o 12(S)-HETE e também do TXB₂ - que é convertido a partir do metabólito plaquetário tromboxano A₂ (TXA₂) - no plasma de pacientes com dengue. De acordo com a Figura 4.1, é possível observar maiores níveis séricos de 12-HETE em pacientes com dengue se comparados indivíduos saudáveis. Além disso, os níveis plasmáticos de 12-HETE se mostraram maiores em pacientes com dengue grave e que apresentam sinais de alarme em relação a pacientes com dengue branda. Em contraste, ainda podemos observar que os níveis de TXB₂ são menores no plasma de pacientes com dengue, e que esse mediador apresentou uma tendência a níveis baixos em pacientes com dengue grave. Esse resultado nos sugere uma relação importante entre os níveis circulantes de 12-HETE e a gravidade da dengue.

4.2 O 12-HETE induz o aumento da permeabilidade endotelial em células HMVEC-L

Como próximo passo desse estudo, avaliamos, através de um ensaio de permeabilidade endotelial *in vitro*, se o mediador lipídico 12-HETE seria capaz de causar o aumento da permeabilidade nas células endoteliais, já que esse efeito é uma das características mais importantes da ativação do endotélio. Para isso, as células HMVEC-L confluentes foram estimuladas com diferentes concentrações de 12-HETE, durante 2 e 24 horas e posteriormente avaliadas para o extravasamento de albumina-FITC pela monocamada celular. De acordo com a Figura 4.2, é possível observar que as células endoteliais estimuladas com 12-HETE, em ambas concentrações, apresentaram maior extravasamento de albumina-FITC, e logo maior permeabilidade endotelial, quando comparado às células dos grupos controle. O tempo de 2 horas foi o suficiente para observar esse efeito, visto que não houve aumento considerável da permeabilidade no tempo de 24 horas.

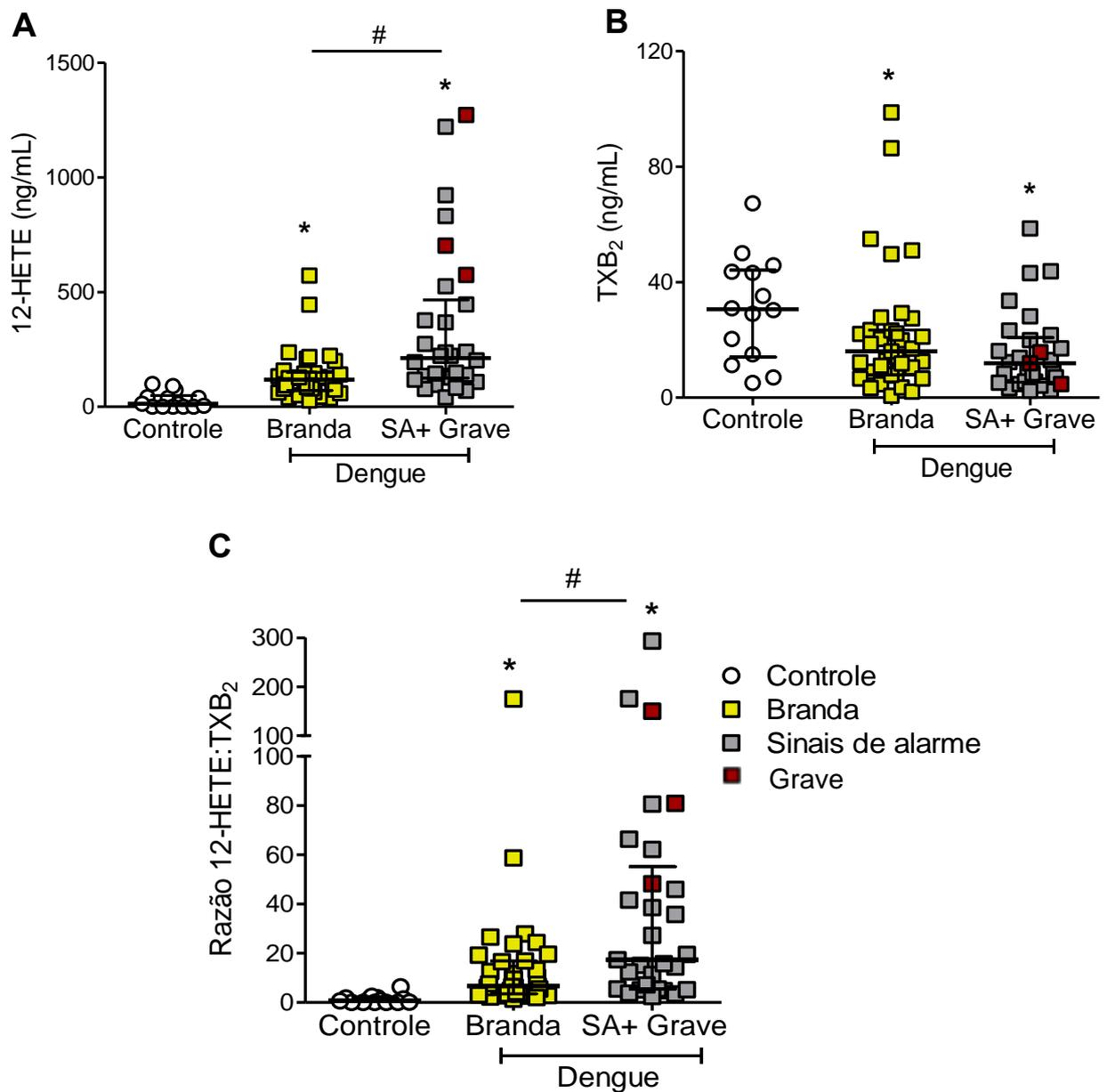


Figura 4.1 Níveis séricos de 12-HETE e tromboxano B₂ de pacientes com dengue e de indivíduos saudáveis. Foram quantificados os níveis de 12-HETE (A) e tromboxano B₂ (TXB₂) (B) no plasma de indivíduos saudáveis (controle) e de pacientes com dengue branda, dengue com sinais de alarme (SA) e dengue grave. A razão entre os níveis de 12-HETE e TXB₂ também foi representada (C). Linhas indicam a mediana e o intervalo interquartil. * p < 0,05 em relação ao controle; # p < 0,05 entre dengue branda e dengue SA + grave. N=80

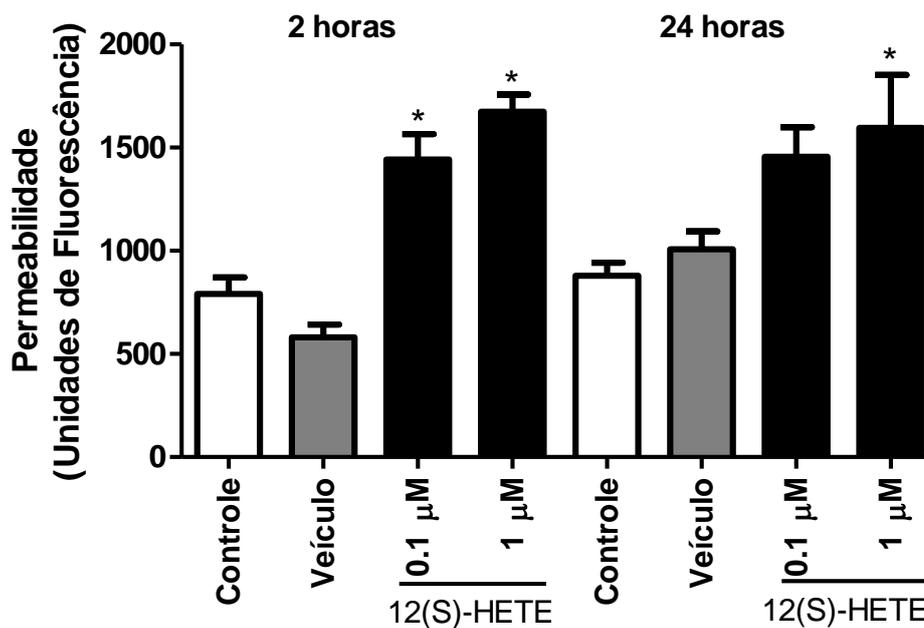


Figura 4.2 Extravasamento passivo de albumina-FITC pela monocamada de células endoteliais após estímulo com 12-HETE. Células HMVEC-L foram estimuladas com 12(S)-HETE ou com o veículo etanol, por 2 e 24 horas. As barras representam a média das triplicatas com erro padrão. Gráfico representativo de três experimentos independentes. * significa $p \leq 0,05$ em relação ao grupo veículo.

4.3 O estímulo do 12-HETE é capaz de diminuir a presença de VE-caderina e gerar aumento dos espaçamentos entre as células endoteliais.

Após observar que o 12-HETE foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade endotelial, nosso próximo passo foi investigar os mecanismos celulares envolvidos nesse efeito. Para isso, as células HMVEC-L confluentes foram estimuladas com diferentes concentrações de 12-HETE e posteriormente processadas para avaliação da morfologia, através do citoesqueleto, como também para análise da proteína de junção VE-caderina por microscopia confocal. A VE-caderina é o componente mais importante das junções de aderência (Trani & Dejana, 2015) e seu domínio extracelular é responsável por conectar as células vizinhas.

Dessa forma, de acordo com a Figura 4.3, é possível observar que o estímulo do 12-HETE por 2 horas foi capaz de gerar interrupções na localização da VE-caderina nas células endoteliais, evidenciado pelas setas, quando comparado às células que não receberam nenhum estímulo ou que receberam o estímulo com o veículo etanol. Além disso, a Figura 4.3 ainda demonstra que o 12-HETE foi capaz de induzir a

formação de espaçamentos célula-célula apresentados pela morfologia e pela marcação dos filamentos de actina (F-actina), através da faloidina. Essa diferença é observada ao comparar as células estimuladas com 12-HETE com aquelas do grupo controle, que não apresentam nenhum espaço intercelular. Esses espaçamentos podem ter sido desencadeados devido à capacidade de retração das células endoteliais em resposta a alguns estímulos, a qual é controlada pela F-actina e por outros componentes do citoesqueleto. Contudo, não foram observadas grandes diferenças no padrão de distribuição da F-actina entre as células que receberam o estímulo do 12-HETE e daquelas que não receberam.

Para complementar esse dado, também analisamos as células endoteliais em relação a presença da VE-caderina na membrana plasmática através da citometria de fluxo (Figura 4.4). Corroborando os dados já exibidos anteriormente, o estímulo do 12-HETE por duas horas induz a diminuição da porcentagem de células endoteliais positivas para a VE-caderina, bem como da intensidade média de fluorescência (IMF) para a mesma proteína de junção. A diminuição da exposição da VE-caderina na membrana celular pode estar relacionada com a sua internalização pós estímulo do mediador 12-HETE.

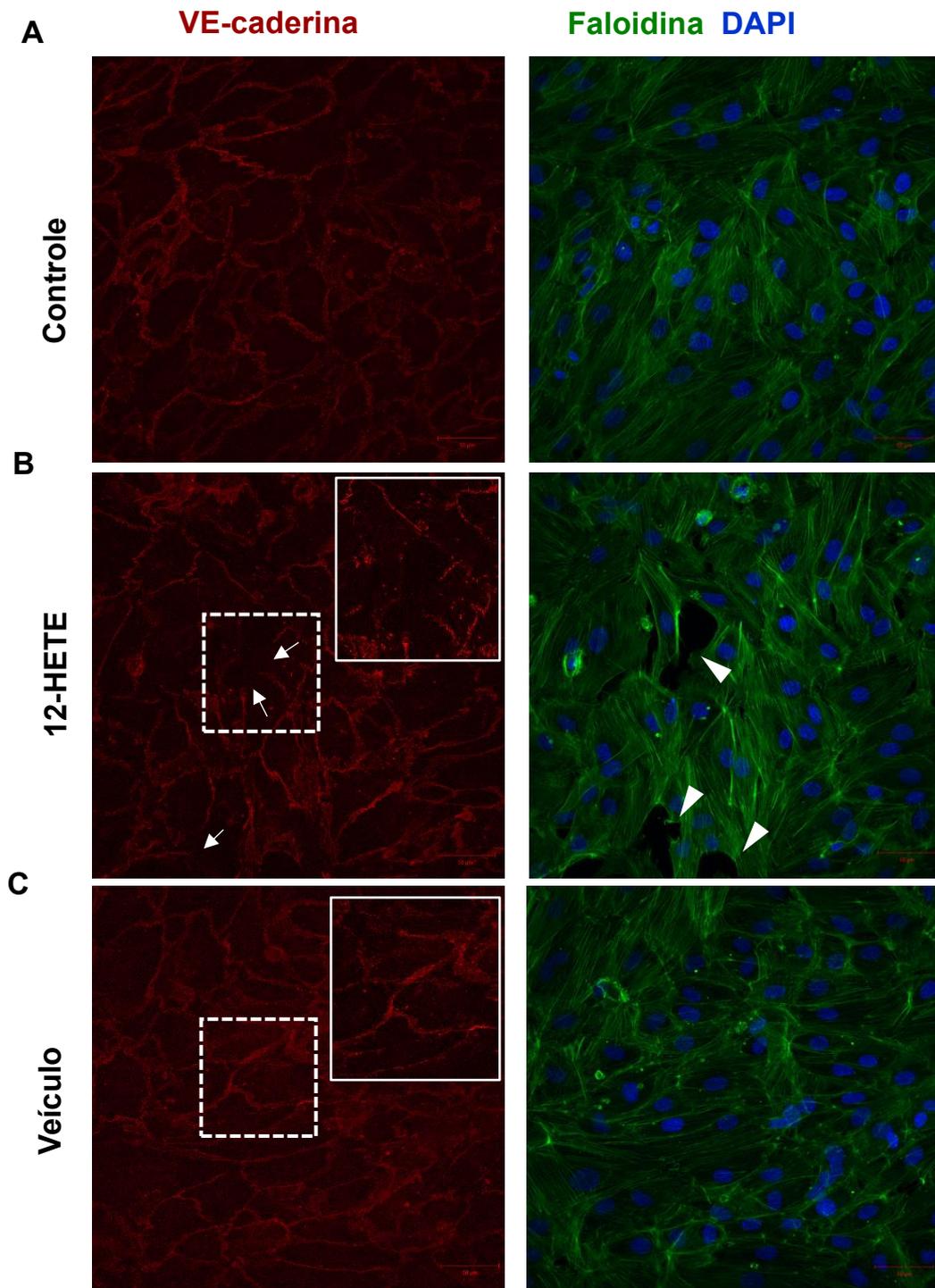


Figura 4.3. Imunofluorescência para VE-caderina e F-actina das células endoteliais estimuladas com 12-HETE. Células HMVEC-L nas condições não estimuladas (apenas meio de cultura) (A), estimuladas com 12-HETE (1 µM) (B) ou com o veículo etanol (C) por duas horas. As imagens foram obtidas no microscópio confocal de fluorescência Zeiss LSM710, no aumento de 400x. As barras de escala representam 50 µm. Setas apontam as interrupções na marcação de VE-caderina, e as pontas de seta mostram os espaçamentos entre as células presentes através do citoesqueleto, por faloidina. Imagens representativas de três experimentos independentes.

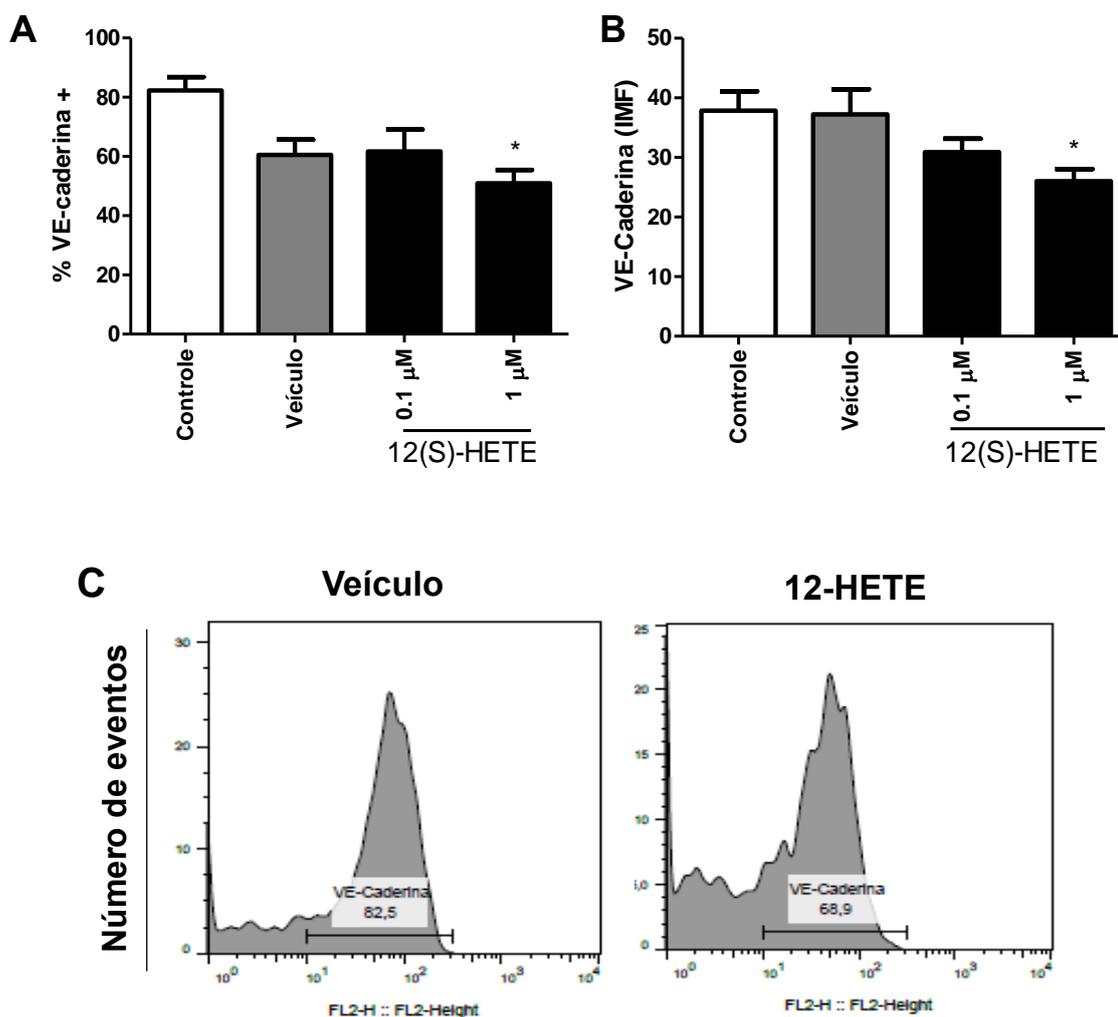


Figura 4.4. Análise da marcação de VE-caderina das células endoteliais estimuladas com 12-HETE. Células HMVEC-L foram estimuladas por 2 horas com 12-HETE ou com o veículo etanol e posteriormente processadas e analisadas para a presença de VE-caderina por citometria de fluxo. Estão demonstradas a porcentagem de células positivas (A) e a intensidade média de fluorescência (IMF) (B) para a VE-caderina. A Figura C mostra o histograma de um experimento representativo, para os grupos controle veículo e 12-HETE (1 μ M). Barras dos gráficos representam a média das triplicatas com erro padrão. Gráficos A e B apresentados como média dos dados de três experimentos independentes. * significa $p \leq 0,05$ em relação ao grupo veículo.

4.4 As células endoteliais produzem maiores níveis de IL-6 sob estímulo do 12-HETE

Partindo do princípio que as células endoteliais participam ativamente de processos inflamatórios e são capazes de produzir diversas citocinas e quimiocinas em resposta a estímulos, modulando a resposta do organismo a alguma lesão tecidual

ou patógeno (Poher & Sessa, 2007; Mai *et al.*, 2013), nosso próximo passo foi o de investigar a capacidade do mediador lipídico 12-HETE em induzir a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas células endoteliais, que é outra característica da ativação do endotélio. Desta forma, o sobrenadante das células estimuladas foi recolhido para quantificação dos níveis de citocinas, nos tempos de 2 e 24 horas. De acordo com a Figura 4.5, é possível observar que as células endoteliais sob efeito de 12-HETE foram capazes de secretar em maiores quantidades a citocina IL-6 no tempo de 2 horas. Em contraste, não foram observadas diferenças significativas entre a liberação dos outros mediadores avaliados, IL-8 ou MIF, pelas células endoteliais dos diferentes grupos analisados no mesmo tempo. Já no tempo de 24 horas, observa-se que os níveis dos três mediadores inflamatórios analisados aumentaram em relação ao tempo de 2 horas, mas não houve diferença significativa entre os grupos controle e 12-HETE. Isso demonstra que o 12-HETE ativou as células HMVEC-L especificamente em até 2 horas. Também foram quantificados os níveis de TNF- α secretados pelas células, porém não houve liberação significativa dessa citocina por nenhum dos grupos estudados, e em nenhum dos tempos observados (dado não exibido).

4.5 O 12-HETE não foi capaz de induzir morte das células endoteliais

Com o intuito de avaliar possíveis efeitos citotóxicos – diretos ou indiretos – do estímulo do 12-HETE para as células endoteliais, em seguida foi avaliada a taxa de morte celular após 2 horas de estímulo. A Figura 4.6 demonstra que a viabilidade celular não sofreu alteração com o estímulo do mediador lipídico 12-HETE, em ambas as concentrações utilizadas, quando comparada com os controles sem estímulo ou com o estímulo do veículo etanol, já que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Dessa forma, esse resultado nos sugere que a indução da morte celular não está envolvida nos possíveis mecanismos de ação do 12-HETE sob as células, em relação à ativação/disfunção endotelial.

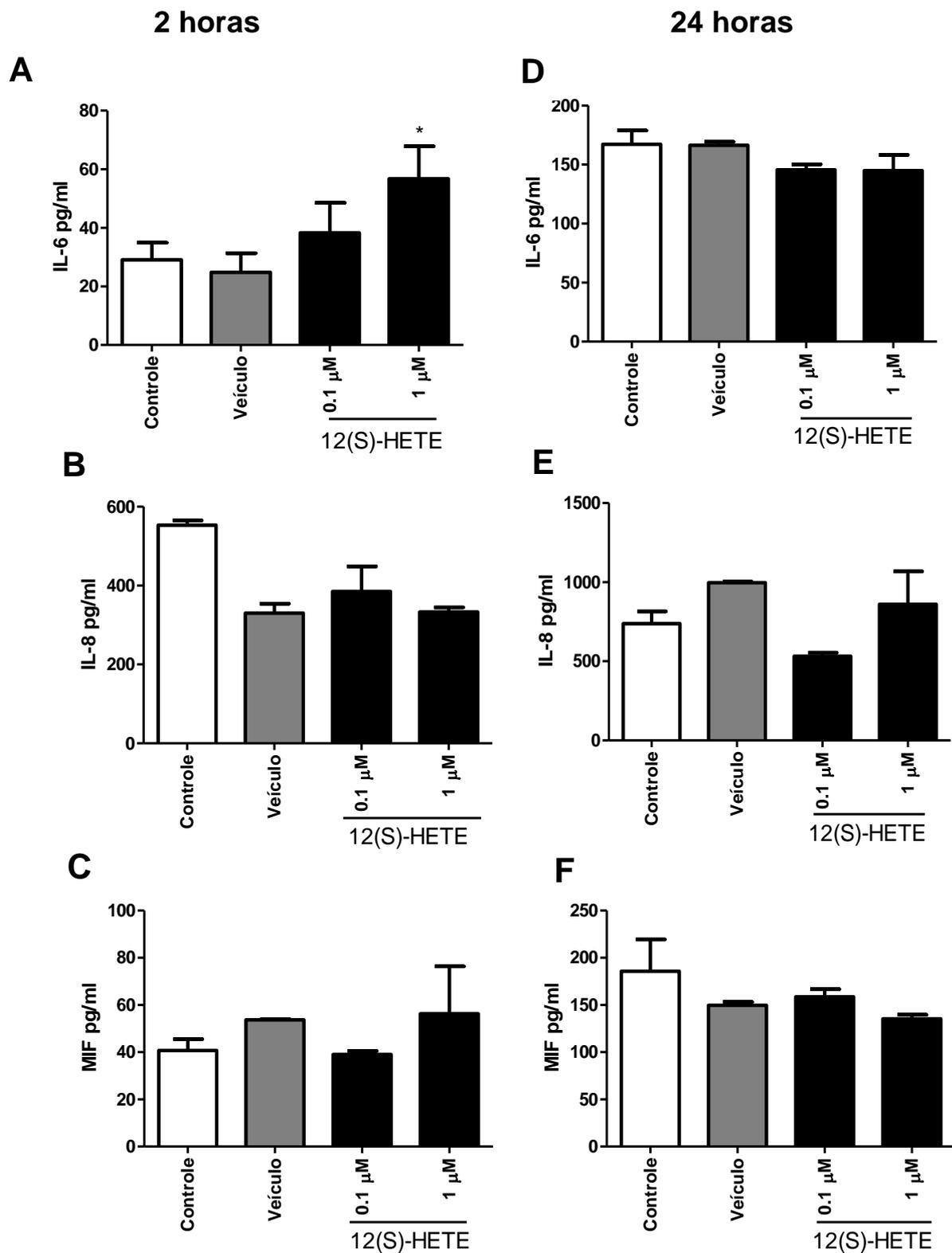


Figura 4.5. Níveis de citocinas liberadas pelas células endoteliais após estímulo do 12-HETE. Células HMVEC-L foram estimuladas por 2 e 24 horas com 12-HETE ou com o veículo etanol, os sobrenadantes recolhidos e os mediadores secretados IL-6 (A, D), IL-8 (B, E) e MIF (C, F) foram quantificados por ELISA. As barras representam a média das triplicatas com erro padrão. Gráfico apresentado como média dos dados de três experimentos independentes. * significa $p \leq 0,05$ em relação ao grupo veículo.

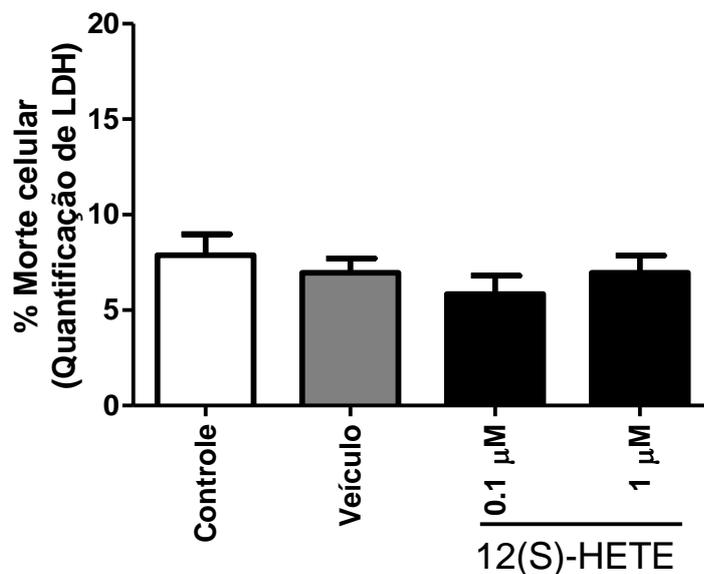


Figura 4.6. Análise da viabilidade das células endoteliais sob efeito do 12-HETE. Células HMVEC-L foram estimuladas por 2 horas com 12-HETE, e a enzima Lactato Desidrogenase (LDH) foi quantificada nos sobrenadantes colhidos. A quantificação foi analisada percentualmente em relação ao controle 100% morte (células sob efeito de 0,9% de Triton X-100). As barras representam a média das triplicatas com erro padrão. Gráfico apresentado como média dos dados de três experimentos independentes.

4.6 O bloqueio do receptor BLT_2 reverte o extravasamento vascular na dengue in vitro, e isso pode ser mediado pela diminuição da VE-caderina

O primeiro resultado do presente estudo mostra que pacientes com dengue apresentam maiores níveis séricos de 12-HETE do que voluntários saudáveis, e que além disso, há maiores quantidades do eicosanoide no plasma de pacientes com dengue grave e que apresentam sinais de alarme, do que em pacientes com dengue branda, sugerindo um papel desse mediador na infecção. Como já citado anteriormente, o 12-HETE é um agonista de alta afinidade para o receptor BLT_2 (Yokomizo *et al.*, 2001), que é expresso em diversos tecidos, incluindo o endotélio. A partir disso, bloqueamos previamente o receptor BLT_2 nas células endoteliais, e a seguir estimulamos essas células com plasma de pacientes com dengue. De acordo com a Figura 4.7, é possível observar que, quando comparado ao plasma de doadores saudáveis (controle), o soro dos indivíduos doentes gera um aumento na permeabilidade endotelial, mostrando que os mediadores presentes nesse plasma contribuem para o extravasamento vascular da dengue. A partir disso, observamos

que o pré-tratamento com o antagonista do receptor BLT₂ LY255283 é capaz de reverter esse extravasamento endotelial *in vitro*, a níveis similares àqueles observados pelo estímulo da amostra de voluntários saudáveis.

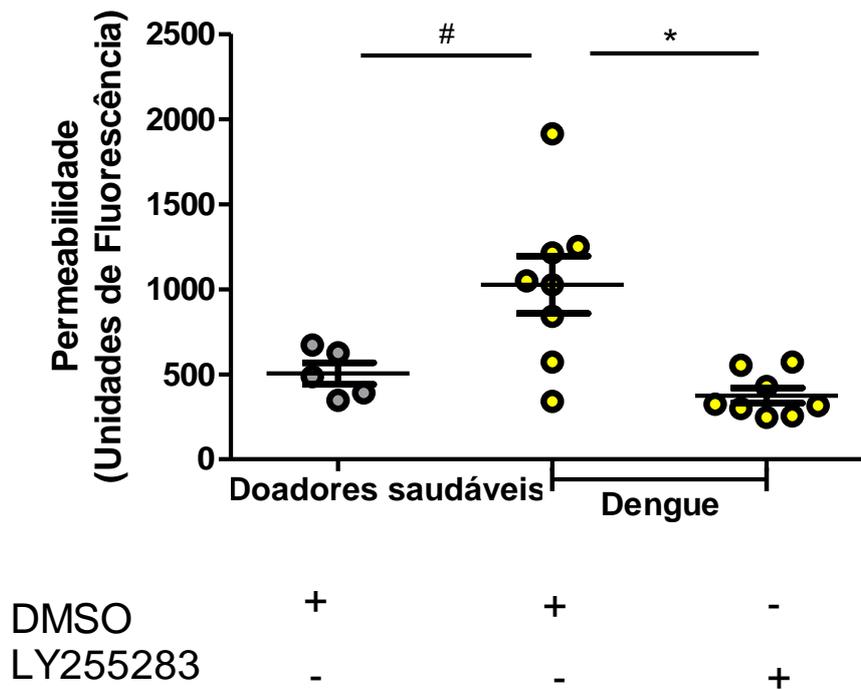


Figura 4.7. Extravasamento passivo de albumina-FITC pela monocamada de células endoteliais após bloqueio do receptor BLT₂. Células HMVEC-L foram previamente tratadas por 30 minutos com 0.1 μM de LY255283 ou o veículo DMSO, e depois estimuladas com plasma de pacientes com dengue ou voluntários saudáveis (controle) por 2 horas. As linhas indicam a mediana e o intervalo interquartil. * significa $p < 0,05$ em relação ao grupo dengue + LY255283. # significa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. (N= 13)

Para melhor investigar os mecanismos celulares relacionados ao aumento da permeabilidade observado no resultado anterior, novamente estimulamos células endoteliais com o plasma de pacientes com dengue, e dessa vez o pré-tratamento foi feito com antagonistas dos receptores BLT₁ e BLT₂. Através da citometria de fluxo, foi possível observar que a intensidade média de fluorescência para VE-caderina foi menor nas células estimuladas com o plasma de indivíduos doentes quando comparada com as células estimuladas com o plasma de doadores saudáveis (Figura 4.8).

Além disso, a Figura 4.8 ainda mostra que o bloqueio do receptor BLT₁ por seu antagonista específico (U-75302) não altera a presença de VE-caderina nas células estimuladas, se comparado com as células sem pré-tratamento ou do grupo veículo. No entanto, o bloqueio do receptor BLT₂ apresenta uma tendência para a diminuição da IMF para VE-caderina nas células estimuladas com o plasma. Logo, pode-se concluir que o mecanismo da diminuição de VE-caderina na superfície da célula, que está relacionada com o aumento da permeabilidade endotelial, pode ocorrer via receptor BLT₂, mas possivelmente não via receptor BLT₁, o qual o 12-HETE possui baixa afinidade. Esses resultados descritos acima, portanto, sugerem um papel importante do 12-HETE na contribuição do extravasamento vascular na dengue.

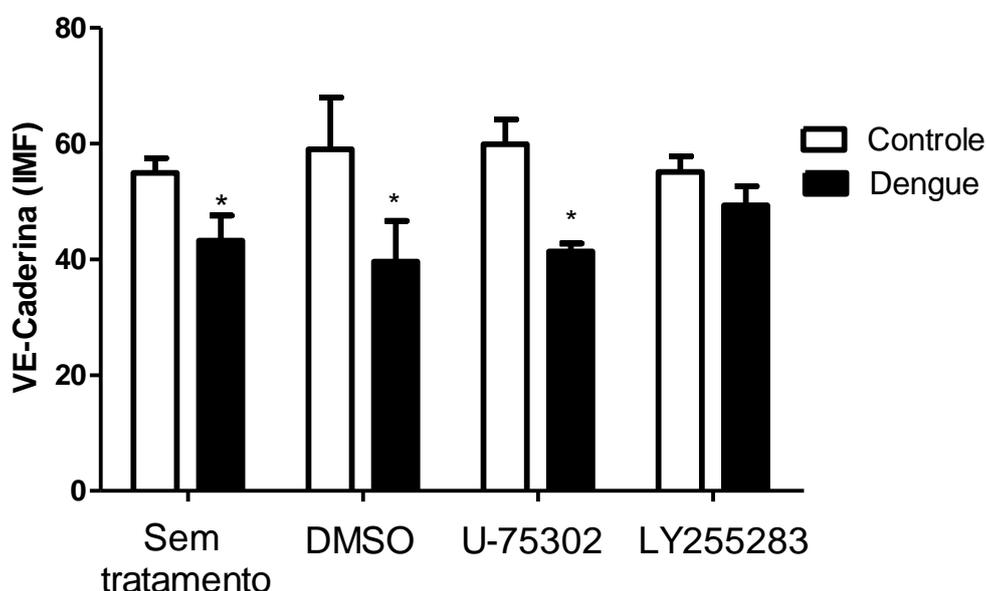


Figura 4.8. Avaliação da presença de VE-caderina em células endoteliais estimuladas após o bloqueio de receptores BLT₁ e BLT₂. Células HMVEC-L foram previamente tratadas por 30 minutos com LY255283 (0.1 µM), U-75302 (0.1 µM) ou o veículo DMSO, e depois estimuladas com plasma de pacientes com dengue ou voluntários saudáveis (controle) por 2 horas. Posteriormente as células foram processadas e analisadas para a intensidade média de fluorescência (IMF) de VE-caderina por citometria de fluxo. As barras representam a média das amostras com erro padrão. * significa p ≤ 0,05 em relação aos grupos controle correspondentes. (N=8)

5. Discussão

A ativação e posterior disfunção do endotélio estão relacionadas com a patogênese de diversas doenças, como as cardiovasculares e as doenças infecciosas, como malária e dengue, por exemplo (Hadi et al, 2005; Kim et al., 2011; Srikiatkachorn & Kelley, 2014). O 12-HETE, produto do metabolismo do ácido araquidônico, vem sendo citado como um modulador importante durante fisiopatologias que também envolvem as células endoteliais, como a diabetes, a migração de células tumorais e o aumento da permeabilidade vascular (Uchide *et al.*, 2007; Zarbock *et al.*, 2009; Othman *et al.*, 2013). Sabe-se que uma das principais características da patogênese da dengue é o aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento de plasma em nível microvascular das cavidades pleural e abdominal (Malavige & Ogg, 2017). Entretanto, ainda não está totalmente elucidado quais são os mediadores inflamatórios responsáveis ou que participam da fisiopatologia da dengue, e ainda não existem estudos que relacionam o 12-HETE ao desenvolvimento dessa doença.

Dessa forma, sabendo que há evidências de que as plaquetas são importantes efetores imunes que participam ativamente na fisiopatologia da dengue (Hottz *et al.*, 2018), objetivamos investigar se mediadores produzidos pelas plaquetas durante a dengue influenciariam na resposta imune dessas células frente a infecção. Assim, primeiramente quantificamos os níveis plasmáticos de 12-HETE e TXB₂ em indivíduos com dengue. O TXB₂ é um metabólito secundário do metabolismo do AA nas plaquetas, produto de uma hidrólise do TXA₂, que é produzido em altas quantidades por plaquetas (Hamberg & Samuelsson, 1974; Wang *et al.*, 2001). Por ser um metabólito biologicamente inerte, o TXB₂ foi escolhido como alvo a ser dosado no plasma para avaliar a atividade do metabolismo do AA em plaquetas. Já o 12(S)-HETE é um dos principais produtos do metabolismo plaquetário do AA. Observamos que há maiores quantidades de 12-HETE no plasma de pacientes doentes, em relação aos indivíduos saudáveis, e que além disso, os níveis de 12-HETE são maiores no plasma de pacientes com dengue grave ou que apresentaram sinais de alarme do que pacientes com dengue branda. Entretanto, os níveis de TXB₂ estavam em menores quantidades no plasma de pacientes com dengue do que em voluntários saudáveis. Diversos estudos na literatura demonstram que citocinas e mediadores pró-inflamatórios presentes no plasma sanguíneo de pacientes com dengue são

responsáveis por desencadear o extravasamento vascular observado na doença (Cardier *et al.*, 2005; Martina *et al.*, 2009; Appanna *et al.*, 2012; Raekiansyah *et al.*, 2014; Tramontini *et al.*, 2017), mas ainda não há na literatura nenhum estudo que identifica altos níveis de 12-HETE no plasma dos pacientes doentes, ou relaciona esse fato com o desenvolvimento e fisiopatologia da dengue.

Com o resultado obtido, nosso próximo objetivo foi o de melhor investigar o papel do eicosanoide 12-HETE em desencadear a ativação do endotélio. Através de ensaio de permeabilidade *in vitro*, demonstramos que o 12-HETE foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade na monocamada de células endoteliais da microvasculatura pulmonar humana (HMVEC-L) no tempo de 2 horas, e que esse efeito se manteve, sem aumentar significativamente, em 24 horas. Esse dado corrobora com o estudo de YOUMINE e colaboradores (1997), que descreveram pela primeira vez, *in vitro*, a capacidade do 12-HETE de aumentar a permeabilidade vascular, em modelo de células endoteliais de aorta porcina. Também *in vitro*, Zarbock e colaboradores (2009) demonstraram que o 12-HETE aumenta a permeabilidade de células endoteliais pulmonares humanas. Outros estudos também evidenciam a capacidade desse mediador de modular o aumento do extravasamento vascular *in vivo*, para além de modelos de cultivo de células (Wang *et al.*, 1999; Zarbock *et al.*, 2009).

Com isso, nosso próximo passo foi o de investigar os mecanismos celulares relacionados com o aumento da permeabilidade endotelial pelo 12-HETE, através da observação dos efeitos na morfologia da monocamada das células endoteliais e na marcação para a proteína de junção VE-caderina. As células endoteliais apresentaram interrupções na marcação de VE-caderina após o estímulo de 2 horas do 12-HETE, e de forma complementar a esse dado, através da técnica de citometria de fluxo também foi possível concluir que houve diminuição da porcentagem de células positivas e da intensidade média de fluorescência na marcação para essa proteína. Visto que a VE-caderina é considerada um componente importante nas junções de aderência das células endoteliais (Trani & Dejana, 2015), o seu papel crucial na integridade vascular a torna um alvo para diversos eventos de sinalização, os quais podem levar à disfunção da barreira endotelial e o aumento da permeabilidade vascular (Gavard, 2013). Logo, a menor exposição da VE-caderina desencadeada pelo estímulo do 12-HETE pode estar conectada com a sua internalização, visto que essa proteína é

considerada uma molécula de adesão altamente dinâmica com um tráfico endossomal via clatrina bem regulado (Xiao *et al.*, 2005), relacionando diretamente sua internalização com a perda das junções intercelulares. Esse mecanismo pode, portanto, contribuir direcionando o comportamento do endotélio, e então induzir a migração celular e aumento da permeabilidade vascular (Trojanovsky *et al.*, 2006; Schulte *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

Além disso, ainda pela técnica de microscopia, observamos que sob efeito do 12-HETE, as células endoteliais apresentaram maiores espaçamentos intercelulares do que as células que não receberam esse estímulo, via visualização do citoesqueleto de actina. Esse dado corrobora novamente com o trabalho de Zarbock e colaboradores (2009), que demonstrou que, ao estimular células de endotélio pulmonar humano com 12-HETE, há um aumento do espaçamento entre as células, o que também foi observado pela marcação de faloidina, que se liga diretamente aos filamentos de actina.

Considerando que já foi descrito que o 12-HETE é capaz de modular a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos (Wen *et al.*, 2007), decidimos avaliar se esse eicosanoide seria capaz de interferir na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais, que é uma das características de um endotélio ativado. Como resultado, observamos que as células endoteliais estimuladas com 12-HETE foram capazes de produzir em maiores níveis a citocina IL-6, mas não de IL-8 e MIF no tempo de 2 horas. Já no tempo de 24 horas, observamos que a quantidade das três citocinas avaliadas e liberadas pelo endotélio estimulado aumentou em relação ao tempo de 2 horas, porém não apresentou diferença significativa entre os grupos de estímulo e controle analisados. De forma a relacionar a produção do IL-6 induzida pelo 12-HETE com a ativação do endotélio, evidências como o trabalho de Maruo e colaboradores (1992) foram capazes de demonstrar a ação da IL-6 no aumento da permeabilidade vascular em células endoteliais bovinas. Em células endoteliais de veia de cordão umbilical humano em hipóxia, foi demonstrado que as espécies reativas de oxigênio geradas durante essa condição regulam a secreção de citocinas como IL-6, a qual leva à alterações da permeabilidade endotelial (Ali *et al.*, 1999). Somando a isso, em 2018, Alsaffar e colaboradores demonstraram que a IL-6 promove a perda da barreira endotelial via fosforilação de proteínas quinases e síntese proteica *de novo*, o que foi avaliado

utilizando como um dos parâmetros a localização da VE-caderina por imunofluorescência. Assim, evidencia-se um papel importante da IL-6 na indução do aumento da permeabilidade endotelial e em mecanismos de ativação do endotélio.

Também foi observado nesse presente estudo que o estímulo pelo 12-HETE não causa a morte de células HMVEC-L no tempo de 2 horas. Analisamos a morte celular por meio da quantificação da enzima citosólica LDH, que só é liberada para o meio extracelular após dano e ruptura da membrana da célula. Logo, é podemos inferir que o mecanismo de morte que foi avaliado é decorrente da ruptura da membrana, com liberação do conteúdo citoplasmático, como a necroptose ou piroptose. Entretanto, não foi possível afirmar com os dados obtidos nesse trabalho que o 12-HETE não induz outros tipos de morte celular programada, como a apoptose, por exemplo. Há evidências na literatura que demonstram que a inibição da enzima 12-LOX aumenta a ocorrência de apoptose em células vasculares de musculo liso, avaliada pela fragmentação de DNA, e que o tratamento dessas células com 12-HETE previne a indução da morte (Weisinger *et al.*, 2013). Em contraste, foi observado previamente que o estímulo do 12-HETE induziu neurotoxicidade em modelo de células neuronais de camundongos (Kwon *et al.*, 2005).

Através do ensaio de permeabilidade *in vitro*, também estimulamos células endoteliais com o plasma de pacientes com dengue a 10%, por 2 horas, e observamos um aumento considerável da permeabilidade endotelial, através do comprometimento da integridade do endotélio. Esse dado corrobora diversos outros estudos na literatura já citados nesse trabalho. Além disso, ao utilizar o antagonista competitivo do receptor BLT₂, que é um receptor o qual o 12-HETE possui alta afinidade, observamos que o extravasamento vascular induzido pelo estímulo do plasma foi revertido, e pode ser comparável com o extravasamento ocorrido pela ação de plasmas de indivíduos saudáveis.

Nosso último resultado também sugere que a diminuição da presença de VE-caderina nas células endoteliais é um dos mecanismos funcionais envolvidos no aumento da permeabilidade vascular, causada pelo plasma de pacientes com dengue. Esse mecanismo ocorreu através do receptor BLT₂, mas não pelo receptor BLT₁. Yokomizo e colaboradores (2001) demonstraram pela primeira vez o agonismo do 12-HETE pelo receptor BLT₂, com alta afinidade. O receptor BLT₁ é de alta afinidade para

o LTB₄, mas de baixa afinidade para o 12-HETE, o que pode explicar a ação desse receptor especificamente durante o processo.

Alguns estudos relacionaram a diminuição da expressão ou presença de outras proteínas de junção com o aumento da permeabilidade induzido por fatores contidos no plasma de indivíduos com dengue. Jeewandara e colaboradores (2015) observaram a diminuição da molécula ZO-1 em células endoteliais após estímulo do soro de pacientes com dengue, e Appanna e colaboradores (2012), além de constatarem a diminuição de ZO-1, também observaram o desarranjo da localização de VE-caderina por imunofluorescência em células HUVEC.

Vale ressaltar que nesse trabalho não foi avaliada a ação do LTB₄ no aumento da permeabilidade vascular durante a dengue, apesar de seus receptores terem sido um dos alvos do estudo. Portanto, com os dados obtidos e discutidos, ainda não é possível afirmar que não há contribuição do LTB₄ no extravasamento vascular observado na dengue, ou saber sobre os níveis desse eicosanoide no plasma de indivíduos doentes. Assim, estudos posteriores são necessários para que essas informações possam ser esclarecidas. Além disso, também não podemos afirmar que o mecanismo do aumento da permeabilidade induzido pelo 12-HETE durante a dengue ocorre única e obrigatoriamente pelo receptor BLT₂, visto que nos últimos anos foi identificado um receptor específico para o 12-HETE, o GPR31 ou 12-HETER (Guo *et al.*, 2011). Dessa forma, novas análises *in vitro* necessitam ser realizadas para melhor entender os mecanismos por trás do aumento da permeabilidade vascular que ocorre na dengue.

Com os dados obtidos, podemos sugerir que o 12-HETE participa e contribui para o aumento da permeabilidade vascular da dengue. Entretanto, é importante salientar que o eicosanoide é apenas um dos diversos fatores presentes no plasma que desencadeiam esse efeito no endotélio. Como já foi descrito por outros estudos, fatores pró-inflamatórios produzidos pelo hospedeiro frente à infecção pelo vírus da dengue como IL-1 β , PAF, TNF- α , VEGF entre outros, juntos, podem ter efeitos sinérgicos ao induzir o aumento da permeabilidade de células endoteliais, contribuindo portanto para a fisiopatologia dessa doença (Malavige & Ogg, 2017).

6. Conclusões

- ✓ Pacientes com dengue apresentam maiores níveis plasmáticos de 12-HETE, em comparação com o TXB₂. Além disso, observou-se que os níveis de 12-HETE circulantes foram maiores em pacientes com dengue grave e que apresentam sinais de alarme do que em pacientes com dengue branda e doadores saudáveis;
- ✓ O estímulo *in vitro* com 12-HETE pode ativar células endoteliais microvasculares, modulando a presença da proteína de junção VE-caderina e induzindo o aumento da permeabilidade endotelial e da produção de mediadores inflamatórios;
- ✓ O estímulo *in vitro* do 12-HETE não foi capaz de induzir morte com liberação do conteúdo citoplasmático nas células endoteliais;
- ✓ A capacidade do plasma de indivíduos com dengue de aumentar a permeabilidade endotelial *in vitro* foi inibida via receptor BLT₂, e isso sugere um papel importante do 12-HETE na fisiopatologia da dengue.

7. Perspectivas

Como perspectivas futuras inerentes a esse trabalho, pretende-se dosar LTB₄ no plasma dos pacientes com dengue e relacionar os níveis desse eicosanoide com a gravidade da doença observada nos pacientes, assim como foi realizado com o 12-HETE. Além disso, investigar se o estímulo do 12-HETE nas células endoteliais seria capaz de induzir outras formas de morte celular programada, como a apoptose, e de como essa morte se relacionaria com o aumento da permeabilidade vascular são objetivos futuros desse estudo. Também se objetiva elucidar os mecanismos os quais o 12-HETE contribui para o extravasamento vascular da dengue, através do bloqueio do receptor específico GPR31/12-HETER nas células endoteliais, antes do estímulo com o plasma de pacientes doentes.

Referências bibliográficas

- Aleem, A. M., Jankun, J., Dignam, J. D., Walther, M., Kühn, H., Svergun, D. I., & Skrzypczak-Jankun, E. (2008). Human Platelet 12-Lipoxygenase, New Findings about Its Activity, Membrane Binding and Low-resolution Structure. *Journal of Molecular Biology*, 376(1), 193–209. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.086>
- Ali, M. H., Schlidt, S. A., Chandel, N. S., Hynes, K. L., Schumacker, P. T., Gewertz, B. L., ... Bruce, L. (1999). Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. *American Journal of Physiology*, 31(99), 1057–1065.
- Alsaffar, H., Martino, N., Garrett, J. P., & Adam, A. P. (2018). Interleukin-6 promotes a sustained loss of endothelial barrier function via Janus kinase-mediated STAT3 phosphorylation and de novo protein synthesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 314(5), 589–602. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00235.2017>
- Alwis, R. De, Williams, K. L., Schmid, M. A., Lai, C.-Y., Patel, B., Smith, S. A., ... Silva, A. M. De. (2014). Dengue Viruses Are Enhanced by Distinct Populations of Serotype Cross-Reactive Antibodies in Human Immune Sera. *Plos Pathogens*, 10(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004386>
- Amarasinghe, A., Kuritsky, J. N., Letson, G. W., & Margolis, H. S. (2011). Dengue Virus Infection in Africa. *Emerging Infectious Disease*, 17(8), 1349–1354. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101515>
- Appanna, R., Wang, S. M., Ponnampalavanar, S. A., Chai, L., Lum, S., & Sekaran, S. D. (2012). Cytokine Factors Present in Dengue Patient Sera Induces Alterations of Junctional Proteins in Human Endothelial Cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(5), 936–942. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0606>
- Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmecca, S., Auethavornanan, K., ... Malasit, P. (2006). Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections : A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(8), 1078–1088.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Jaenisch, T. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bozza, F. A., Cruz, O. G., Zagne, S. M. O., Azeredo, E. L., Nogueira, R. M. R., Assis, E. F., ... Kubelka, C. F. (2008). Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infectious Diseases*, 8(86), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-86>
- Brash, A. R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. *Journal of Clinical Investigation*, 107(11), 1339–1345. <https://doi.org/10.1172/JCI13210>
- Capdevila, J., Yadagiri, P., Manna, S., & Falck, J. R. (1986). Absolute configuration of the hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acid by microsomal cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical*

Research Communications, 141(3), 1007–1011.

Cardier, E., Marin, E., Romano, E., Taylor, P., Liprandi, F., Bosch, N., & Rothman, A. L. (2005). Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: Possible role of TNF- α in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine*, 30(6), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.01.021>

Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13926–13931.

Chao, C.-H., Wu, W.-C., Lai, Y.-C., & Tsai, P.-J. (2019). Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLoS Pathogens*, 15(4), 1–26.

Chopra, H., Timar, J., Chen, Y. Q., Taylor, J. D., & Honn, Kenneth, V. (1991). The lipoxigenase metabolite 12(S)-HETE induces a cytoskeleton-dependent increase in surface expression of integrin α IIb β 3 on melanoma cells. *International Journal of Cancer*, 786, 774–786.

Cipitelli, M. da C., Paiva, I. A., Badolato-Corrêa, J., & De-Oliveira-Pinto, L. M. (2019). Influence of chemokines on the endothelial permeability and cellular transmigration during dengue. *Immunology Letters*, 212(May), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.06.001>

Cunningham, F. M., & Wollard, P. M. (1987). 12(R)-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid is a chemoattractant for human polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Prostaglandins*, 34(1), 71–78. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(87\)90264-4](https://doi.org/10.1016/0090-6980(87)90264-4)

Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., & Weinstein, B. M. (2009). The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Cell Press*, 16(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.004>

Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirirakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., ... Screaton, G. (2010). Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science*, 328(5979), 745–749.

Dobrian, A. D., Lieb, D. C., Cole, B. K., Taylor-Fishwick, D. A., Chakrabarti, S. K., & Nadler, J. L. (2011). Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 115–131. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.005>

Duchez, A.-C., Boudreau, L. H., Naika, G. S., Bollinger, J., Belleannée, C., & Cloutier, N. (2015). Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A₂-IIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), 564–573. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507905112>

- Fares, R. C. G., Souza, K. P. R., Añez, G., & Rios, M. (2015). Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *BioMed Research International*, 2015(321873), 1–13.
- Faulkner, J., Pye, C., Al-Shabrawey, M., & Elmarakby, A. A. (2015). Inhibition of 12/15-Lipoxygenase Reduces Renal Inflammation and Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 6(6), 706–721. <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000555>
- Fink, J., Gu, F., & Vasudevan, S. G. (2006). Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Reviews in Medical Virology*, 16(4), 263–275.
- Fonlupt, P., Croset, M., & Lagarde, M. (1991). 12-HETE inhibits the binding of PGH2/TxA2 receptor ligands in human platelets. *Thrombosis Research*, 63(2), 239–248. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(91\)90287-7](https://doi.org/10.1016/0049-3848(91)90287-7)
- Furuta, T., Murao, L. A., Thi, N., Lan, P., Huy, N. T., Thi, V., ... Ohmoto, Y. (2012). Association of Mast Cell-Derived VEGF and Proteases in Dengue Shock Syndrome. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001505>
- Gavard, J. (2013). Endothelial permeability and VE-cadherin. *Cell Adhesion & Migration*, 7(6), 465–471. <https://doi.org/10.4161/cam.27330>
- Giannotta, M., Trani, M., & Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. *Developmental Cell*, 26(5), 441–454. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.020>
- Glasner, D. R., Puerta-Guardo, H., Beatty, P. R., & Harris, E. (2018). The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis. *Annual Reviews of Virology*, 5, 227–253.
- Glasner, D. R., Ratnasiri, K., Puerta-Guardo, H., Espinosa, D. A., Beatty, P. R., & Harris, E. (2017). Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. *Plos Pathogens*, 13(11), 1–22.
- Gomes, R. N., Souza, C., & Colquhoun, A. (2018). Eicosanoids and cancer. *Clinics*, 3(17), 1–10. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e530s>
- Goncalvez, A. P., Engle, R. E., Claire, M. S., Purcell, R. H., & Lai, C.-J. (2007). Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9422–9427.
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 480–496.
- Gubler, D. J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21 st Century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4), 3–11. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
- Guo, Y., Zhang, W., Giroux, C., Cai, Y., Ekambaram, P., Dilly, A., ... Honn, Kenneth,

- V. (2011). Identification of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR31 as a Receptor for 12-(S)-Hydroxyeicosatetraenoic. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(39), 33832–33840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216564>
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Publishing Group*, 2, 1–26. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). Dengue. *The Lancet*, 385(9966), 453–465. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9)
- Guzman, M. G., & Vazquez, S. (2010). The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 2(12), 2649–2662. <https://doi.org/10.3390/v2122649>
- Hadi, H. A. R., Carr, C. S., & Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular Health and Risk Management*, 1(3), 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.12.013>
- Haeggström, J. Z., & Funk, C. D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: Biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical Reviews*, 111(10), 5866–5896. <https://doi.org/10.1021/cr200246d>
- Halstead, S. B. (2019). Recent advances in understanding dengue. *F1000 Faculty Reviews*, 8, 1–12.
- Halstead, S. B., & O'Rourke, E. J. (1977). Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature*, 265, 739–741.
- Halstead, S. B., Shotwell, H., & Casals, J. (1973). Studies on the Pathogenesis of Dengue Infection in Monkeys. II. Clinical Laboratory Responses to Heterologus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 128(1), 15–22.
- Hamberg, M., & Samuelsson, B. (1974). Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(9), 3400–3404. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.9.3400>
- Hammarstromt, S., Hamberg, M., Samuelsson, B., Duell, E. A., Stawiskit, M., & Voorheest, J. J. (1975). Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E2, and prostaglandin F2 α in epidermis of psoriasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(12), 5130–5134.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Henessy, E., Rakovac Tisdall, A., Murphy, N., Carroll, A., O'Gorman, D., Breen, L., ... Sreenan, S. (2016). Elevated 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) levels in serum of individuals with newly diagnosed Type 1 diabetes. *Diabetic Medicine*, 34(2), 292–294. <https://doi.org/10.1111/dme.13177>

- Her, Z., Kam, Y.-W., Gan, V. C., Lee, B., Thein, T.-L., Tan, J. J. L., & Lee, L. K. (2017). Severity of Plasma Leakage Is Associated With High Levels of Interferon γ – Inducible Protein 10, Hepatocyte Growth Factor , Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2), and MMP-9 During Dengue Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(1), 42–51. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw494>
- Hottz, E. D., Bozza, F. A., & Bozza, P. T. (2018). Platelets in Immune Response to Virus and Immunopathology of Viral Infections. *Frontiers in Medicine*, 5(121), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00121>
- Hottz, E. D., Lopes, J. F., Freitas, C., Oliveira, M. F., Bozza, M. T., Da Poian, A. T., ... Bozza, P. T. (2013). Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3 inflammasome activation. *Blood*, 122(20), 3405–3415. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-504449.F.A.B.>
- Hottz, E. D., Medeiros-de-Moraes, I. M., Vieira-de-Abreu, A., de Assis, E. F., Valls-de-Souza, R., Castro-Faria-Neto, H. C., ... Bozza, P. T. (2014). Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue. *The Journal of Immunology*, 193(4), 1864–1872. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400091>
- Hottz, E. D., Oliveira, M. F., Nunes, P. C. G., Nogueira, R. M. R., Valls-de-Souza, R., Da Poian, A. T., ... Bozza, F. A. (2013). Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(5), 951–962. <https://doi.org/10.1111/jth.12178>
- Hottz, E. D., Tolley, N. D., Zimmerman, G. A., Weyrich, A. S., & Bozza, F. A. (2011). Platelets in dengue infection. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 8(1–2), e33–e38. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2011.09.001>
- Huang, Y., Lei, H., Liu, H., Lin, Y., Liu, C., & Yeh, T. (2000). Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63(1,2), 71–75.
- Ibrahim, A. S., Tawfik, A. M., Hussein, K. A., Elshafey, S., Markand, S., Rizk, N., ... Al-Shabrawey, M. (2015). Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal microvascular dysfunction induced by 12/15-lipoxygenase-derived eicosanoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851(3), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.12.017>
- Jeewandara, C., Gomes, L., Wickramasinghe, N., Gutowska-Owsiak, D., Waithe, D., Paranavitane, S. A., ... Malavige, G. N. (2015). Platelet Activating Factor Contributes to Vascular Leak in Acute Dengue Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003459>
- Johnston, L. J., Halliday, G. M., & King, N. J. C. (2000). Langerhans Cells Migrate to Local Lymph Nodes Following Cutaneous Infection with an Arbovirus. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(3), 560–568. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00904.x>
- Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., ...

Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in human. *Science*, 358(6365), 929–932.

Kim, H., Higgins, S., Liles, W. C., & Kain, K. C. (2011). Endothelial activation and dysregulation in malaria: a potential target for novel therapeutics. *Current Opinion Hematology*, 18(3), 177–185. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328345a4cf>

Kim, H., Kim, D. K., Koh, J. Y., Kim, K. M., Noh, M. S., Lee, S., ... Lee, C. H. (2008). Involvement of the BLT2 receptor in the itch-associated scratching induced by 12-(S)-lipoxygenase products in ICR mice. *British Journal of Pharmacology*, 154(5), 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.220>

Klamp, T., Bogner, E., Bednar, W., Mager, L., Massudom, D., Kalny, I., ... Marian, B. (2011). Up-regulation of 12(S)-lipoxygenase induces a migratory phenotype in colorectal cancer cells. *Experimental Cell Research*, 318(6), 768–778. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.12.017>

Kwon, K. J., Jung, Y., Lee, S. H., Moon, C., & Baik, E. J. (2005). Arachidonic Acid Induces Neuronal Death Through Lipoxygenase and Cytochrome P450 Rather Than Cyclooxygenase. *Journal of Neuroscience Research*, 81(1), 73–84. <https://doi.org/10.1002/jnr.20520>

Lam, P. K., Thi, D., Tam, H., Diet, T. V., Tam, C. T., Thi, N., ... Wills, B. (2013). Clinical Characteristics of Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children: A 10-Year Prospective Study in a Single Hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 57(11), 1577–1586. <https://doi.org/10.1093/cid/cit594>

Laquer, V., Dellinger, R. W., Mannering, I., Gomez, A., Bs, G., Bs, V. A., ... Kelly, K. M. (2018). 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid levels are increased in actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 79(6), 1152–1153. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.05.1251>

Leong, A. S., Wong, K. T., Tan, P. H., & Wannakrairot, P. (2007). The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 24(4), 227–236. <https://doi.org/10.1053/j.semmdp.2007.07.002>

Li, R., Ren, M., Chen, N., Luo, M., Zhang, Z., & Wu, J. (2012). Vitronectin increases vascular permeability by promoting VE-cadherin internalization at cell junctions. *PLoS ONE*, 7(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037195>

Lin, C.-Y., Kolliopoulos, C., Huang, C.-H., Tenhunen, J., & Heldin, C.-H. (2019). High levels of serum hyaluronan is an early predictor of dengue warning signs and perturbs vascular integrity. *EBioMedicine*, 48, 425–441. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.09.014>

Loke, W. M., Chow, A. Y., Lam Mok Sing, K., Lee, C. Y. J., Halliwell, B., Lim, E. C., ... Seet, R. C. (2013). Augmentation of 5-lipoxygenase activity and expression during dengue serotype-2 infection. *Virology Journal*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-322>

Ma, K., Nunemaker, C. S., Wu, R., Chakrabarti, S. K., Taylor-Fishwick, D. A., &

- Nadler, J. L. (2010). 12-Lipoxygenase Products Reduce Insulin Secretion and B-Cell Viability in Human Islets. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(2), 887–893. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1102>
- Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H., & Yang, X.-F. (2013). An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(61), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61>
- Malavige, G. N., Huang, L.-C., Salimi, M., Gomes, L., Jayaratne, S. D., & Ogg, G. S. (2012). Cellular and Cytokine Correlates of Severe Dengue Infection. *PLoS ONE*, 7(11), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050387>
- Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, 151(3), 261–269. <https://doi.org/10.1111/imm.12748>
- Mammen, M. P., Libraty, D. H., & Ennis, F. A. (2007). Natural History of Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever - A Serial Ultrasonographic Study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26(4), 283–290. <https://doi.org/10.1097/01>
- Manega, C. M., Fiorelli, S., Porro, B., Turnu, L., Cavalca, V., Bonomi, A., ... Eligini, S. (2019). 12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid downregulates monocyte-derived macrophage efferocytosis: New insights in atherosclerosis. *Pharmacological Research*, 144(April), 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.012>
- Marovich, M., Grouard-vogel, G., Louder, M., Eller, M., Sun, W., Wu, S., ... Mascola, J. (2001). Human Dendritic Cells as Targets of Dengue Virus Infection. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(3), 219–224. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00037.x>
- Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564–581. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09>
- Maruo, N., Morita, I., Shirao, M., & Sei-Itsu, M. (1992). IL-6 Increases Endothelial Permeability in Vitro. *The Endocrinology Society*, 131(2), 710–714.
- Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., ... Hay, S. I. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Cell Press*, 22(3), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.011>
- Ministério da Saúde. (2010). Secretaria de Vigilância em Saúde: Informe epidemiológico da dengue análise de situação e tendências.
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., ... Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science Translational Medicine*, 7(304), 1–10.
- Montoya, R. H., Diego, J., Zambrano, B., Dayan, G. H., & Dick, O. B. (2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 584–593. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>

Nelwan, E. J. (2018). Early Detection of Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever. *Acta Medical Indonesiana*, 50(3), 183–184.

Nguyen, C. H., Stadler, S., Brenner, S., Huttary, N., Krieger, S., Jäger, W., ... Krupitza, G. (2016). Cancer cell-derived 12(S)-HETE signals via 12-HETE receptor, RHO, ROCK and MLC2 to induce lymph endothelial barrier breaching. *British Journal of Cancer*, 115(3), 364–370. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.201>

Nie, D., Krishnamoorthy, S., Jin, R., Tang, K., Chen, Y. C., Qiao, Y., ... Honn, Kenneth, V. (2006). Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18601–18609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601887200>

Ojha, A., Nandi, D., Batra, H., Singhal, R., Annarapu, G. K., Vikram, N. K., & Guchhait, P. (2017). Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Nature Publishing Group*, 7(41697), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep41697>

Othman, A., Ahmad, S., Megyerdi, S., Mussell, R., Choksi, K., Maddipati, K. R., ... Al-Shabrawey, M. (2013). 12/15-Lipoxygenase-Derived Lipid Metabolites Induce Retinal Endothelial Cell Barrier Dysfunction: Contribution of NADPH Oxidase. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057254>

Ozeki, Y., Ito, H., Nagamura, Y., Unemi, F., & Igawa, T. (1998). 12(S)-HETE plays a role as a mediator of expression of platelet CD62 (P-selectin). *Platelets*, 9(5), 297–302. <https://doi.org/10.1080/09537109876537>

Page, A. V., & Liles, W. C. (2013). Biomarkers of endothelial activation / dysfunction in infectious diseases. *Virulence*, 4(6), 507–516.

Pang, T., Cardoso, M. J., & Guzman, M. G. (2007). Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunology and Cell Biology*, 85(1), 43–45. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100008>

Panigrahy, D., Kaipainen, A., & Greene, E. R. (2010). Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(4), 723–735. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9264-x>

Pathak, V. K., & Mohan, M. (2019). A notorious vector - borne disease: Dengue fever, its evolution as public health threat. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(10), 3125–3129. <https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc>

Patil, R., Bajpai, S., Ghosh, K., & Shetty, S. (2018). Microparticles as prognostic biomarkers in dengue virus infection. *Acta Tropica*, 181, 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.017>

Patricia, M. K., Kim, J. A., Harper, C. M., Shih, P. T., Berliner, J. A., Natarajan, R., ... Hedrick, C. C. (1999). Lipoxygenase Products Increase Monocyte Adhesion to Human Aortic Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19(11), 2615–2622.

- Patro, A. R. K., Mohanty, S., Prusty, B. K., & Singh, D. K. (2019). Cytokine Signature Associated with Disease Severity in Dengue. *Viruses*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/v11010034>
- Pidgeon, G. P., Kandouz, M., Meram, A., & Honn, Kenneth, V. (2002). Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Research*, *62*(9), 2721–2727. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11980674
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *7*(10), 803–815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Porro, B., Songia, P., Squellerio, I., Tremoli, E., & Cavalca, V. (2014). Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: A neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product. *Journal of Chromatography B*, *964*, 26–40.
- Powell, S., & Rokach, J. (2014). Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1851*(4), 340–355. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.10.008>
- Punyadee, N., Mairiang, D., Thiemmecca, S., Komoltri, C., Pan-ngum, W., & Chomanee, N. (2015). Microparticles Provide a Novel Biomarker To Predict Severe Clinical Outcomes of Dengue Virus Infection. *Journal of Virology*, *89*(3), 1587–1607. <https://doi.org/10.1128/JVI.02207-14>
- Qu, Y., Wen, Z., Mi, S., Chen, P., Wang, J., Jia, Y., & Cheng, Y. (2019). 12-lipoxygenase promotes tumor progress by TGF- β 1-mediated epithelial to mesenchymal transition and predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Management and Reserch*, *2019*(11), 8303–8313.
- Raekiansyah, M., Espada-murao, L. A., & Okamoto, K. (2014). Dengue Virus neither Directly Mediates Hyperpermeability nor Enhances Tumor Necrosis Factor- α Induced Permeability In Vitro. *Japanese Journal Of Infectious Disease*, *67*(2), 86–94.
- Rathore, A. P. S., Gubler, D. J., St, A. L., Mantri, C. K., Aman, S. A. B., Syenina, A., ... Goh, C. C. (2019). Dengue virus – elicited tryptase induces endothelial permeability and shock. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(10), 4180–4193.
- Reilly, K. B., Srinivasan, S., Hatley, M. E., Patricia, M. K., Lannigan, J., Bolick, D. T., ... Hedrick, C. C. (2004). 12/15-Lipoxygenase Activity Mediates Inflammatory Monocyte/Endothelial Interactions and Atherosclerosis in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 9440–9450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303857200>
- Salles, T. S., Sá-Guimarães, T. E., de Alvarenga, E. S. L., Guimarães-Ribeiro, V., Meneses, M. A. F., Castro-Salles, P. F. De, ... Moreira, M. F. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasites & Vectors*, *11*, 1–12.

Saw, K., Charngkaew, K., Win, N., & Zin, K. (2014). Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. *Human Pathology*, 45(6), 1221–1233. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.01.022>

Schulte, D., Küppers, V., Dartsch, N., Broermann, A., Li, H., Zarbock, A., ... Vestweber, D. (2011). Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *European Molecular Biology Organization Journal*, 30(20), 4157–4170. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.304>

Shah I., Dubish V. (2005) Dengue and dengue hemorrhagic fever dengue shock syndrome. *Pediatric Oncall Journal*, 2(3), 48.

Siangjong, L., Gauthier, K. M., Pfister, S. L., Smyth, E. M., & Campbell, W. B. (2013). Endothelial 12(S)-HETE vasorelaxation is mediated by thromboxane receptor inhibition in mouse mesenteric arteries. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 304(3), H382–H392. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00690.2012>

Simmons, C. P., Farrar, J. J., Chau, N. V. V., & Wills, B. (2012). Dengue. *The New England Journal of Medicine*, 366(15), 1423–1432.

Srikiatkachorn, A., & Green, S. (2010). Markers of Dengue Disease Severity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 338, 67–82. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02215-9>

Srikiatkachorn, A., & Kelley, J. F. (2014). Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 109, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.07.005>

St John, A. L., Rathore, A. P. S., Raghavan, B., Ng, M. L., & Abraham, S. N. (2013). Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. *ELife*, 2013(2), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.00481>

Talavera, D., Castillo, A. M., Dominguez, M. C., Gutierrez, A. E., & Meza, I. (2004). IL-8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *Journal of General Virology*, 85(7), 1801–1813. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19652-0>

Taylor-Fishwick, D. A., Weaver, J., Glenn, L., Kuhn, N., Rai, G., Jadhav, A., ... Nadler, J. L. (2015). Selective inhibition of 12-lipoxygenase protects islets and beta cells from inflammatory cytokine-mediated beta cell dysfunction. *Diabetologia*, 58(3), 549–557. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3452-0>

Tramontini, F., Sousa, G. De, Baimukanova, G., Lanteri, C., Keating, S. M., Ferreira, F. M., & Heitman, J. (2017). Serum from dengue virus-infected patients with and without plasma leakage differentially affects endothelial cells barrier function in vitro. *PLoS ONE*, 12(6), 1–17.

Trani, M., & Dejana, E. (2015). New insights in the control of vascular permeability :

vascular endothelial-cadherin and other players. *Current Opinion Hematology*, 22(3), 267–272. <https://doi.org/10.1097/MOH.000000000000137>

Troyanovsky, B. R., Sokolov, P. E., & Troyanovsky, M. S. (2006). Endocytosis of Cadherin from Intracellular Junctions Is the Driving Force for Cadherin Adhesive Dimer Dissassembly. *Molecular Biology of the Cell*, 17(8), 3484–3493. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>

Uchide, K., Sakon, M., Ariyoshi, H., Nakamori, S., Tokunaga, M., & Monden, M. (2007). Cancer cells cause vascular endothelial cell (vEC) retraction via 12(S)-HETE secretion: The possible role of cancer cell derived microparticle. *Annals of Surgical Oncology*, 14(2), 862–868. <https://doi.org/10.1245/s10434-006-9225-3>

Vaughn, D. W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., ... Ennis, F. A. (2000). Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 2–9.

Vitoria, W. O., Thomé, L. S., Kanashiro-galo, L., Carvalho, L. V. De, Penny, R., Luis, W., ... Pagliari, C. (2019). Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in renal tissue in severe dengue in humans: Effects on endothelial activation/dysfunction. *Journal of The Brazilian Society of Tropical Medicine*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0353-2018>

Wang, M. M., Reynaud, D., & Pace-asciak, C. R. (1999). In vivo stimulation of 12(S) - lipoxygenase in the rat skin by bradykinin and platelet activating factor : formation of 12(S)- HETE and hepoxilins , and actions on vascular permeability. *Biochimia et Biophysica Acta*, 1436(3), 354–362.

Wang, L. H., Tsai, A. L., & Hsu, P. Y. (2001). Substrate binding is the rate-limiting step in thromboxane synthase catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14737-14743.

Weisinger, G., Gra, M., Hirsh, M., Knoll, E., Sharon, O., Many, A., & Limor, R. (2013). 12S-Lipoxygenase is necessary for human vascular smooth muscle cell survival. *Experimental Cell Research*, 319(10), 1586–1593. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.04.001>

Wen, Y., Gu, J., Chakrabarti, S. K., Aylor, K., Marshall, J., Takahashi, Y., ... Nadler, J. L. (2007). The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in macrophages. *Endocrinology*, 148(3), 1313–1322. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0665>

Wen, Y., Gu, J., Vandenhoff, G., Liu, X., & Nadler, J. L. (2008). Role of 12/15-lipoxygenase in the expression of MCP-1 in mouse macrophages. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 294(4), 1933–1938. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00260.2007>

Wilder-Smith, A., Ooi, E.-E., Horstick, O., & Wills, B. (2019). Dengue. *The Lancet*, 393(10169), 350–363. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32560-1)

- Woollard, P. M. (1986). Stereochemical difference between 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid in platelets and psoriatic lesions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 136(1), 169–176. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90891-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90891-0)
- World Health Organization. (2009). Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control.
- World Health Organization. (2019). Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations. *Vaccine*, 37(35), 4848–4849.
- World Health Organization. (2012). Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020.
- World Health Organization. (2011). Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever.
- Xiao, K., Garner, J., Buckley, M. K., Vincent, A. P., Chiasson, M. C., Dejana, E., ... Kowalczyk, P. A. (2005). p-120-Catenin Regulates Clathrin-dependent Endocytosis of VE-Cadherin. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5141–5151. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05>
- Yacoub, S., Wertheim, H., Simmons, C. P., Screaton, G., & Wills, B. (2015). Microvascular and endothelial function for risk prediction in dengue: an observational study. *The Lancet*, 385(102), S102. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60417-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60417-2)
- Yang, F., Zhang, Y., Ren, H., Wang, J., Shang, L., Liu, Y., & Zhu, W. (2019). Ischemia reperfusion injury promotes recurrence of hepatocellular carcinoma in fatty liver via ALOX12-12HETE-GPR31 signaling axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(489), 1–14.
- Yang, P., Cartwright, C. A., Li, J., Wen, S., Prokhorova, I. N., Shureiqi, I., ... Kim, J. (2012). Arachidonic acid metabolism in human prostate cancer. *International Journal of Oncology*, 41(4), 1495–1503. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1588>
- Yeung, J., & Holinstat, M. (2011). 12-Lipoxygenase: A Potential Target Novel Anti-Platelet Therapeutics. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 193(1), 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.08.011>.Autogenic
- Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T., & Shimizu, T. (2001). Hydroxyeicosanoids Bind to and Activate the Low Affinity Leukotriene B 4 Receptor, BLT2. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12454–12459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011361200>
- Yoshimoto, T., & Takahashi, Y. (2002). Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 69, 245–262.
- Youmine, H., Martin, C. A., Hichami, A., Saïag, B., & Legrand, A. B. (1997). Enhancement of endothelial permeability in vitro by 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 57(2), 191.

Zarbock, A., DiStasi, M. R., Smith, E., Sanders, J. M., Kronke, G., Harry, B. L., ... Ley, K. (2009). Improved Survival and Reduced Vascular Permeability by Eliminating or Blocking 12/15-Lipoxygenase in Mouse Models of Acute Lung Injury (ALI). *The Journal of Immunology*, 183(7), 4715–4722.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802592>

Zhang, X.-J., Cheng, X., Yan, Z.-Z., Fang, J., Wang, X., Wang, W., ... Wang, P.-X. (2018). An ALOX12–12-HETE–GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia–reperfusion injury. *Nature Medicine*, 24, 73–83.
<https://doi.org/10.1038/nm.4451>