

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TAMIRIS AZAMOR DA COSTA BARROS

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MEDIADORES SÉRICOS E PROTEÍNAS INTRAPLAQUETÁRIAS EM RELAÇÃO À PLAQUETOPENIA EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DENGUE

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

Colaboradora: Dra. Denise Cristina de Souza Matos

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B277 Barros, Tamiris Azamor da Costa

Avaliação do perfil de mediadores séricos e proteínas intraplaquetárias em relação à plaquetopenia em pacientes infectados pelo vírus dengue / Tamiris Azamor da Costa Barros. – Rio de Janeiro, 2015.

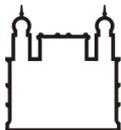
xx, 119 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 100-119

1. Plaquetas. 2. Dengue. 3. Plaquetopenia. I. Título

CDD 616.9185



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: Tamiris Azamor da Costa Barros

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MEDIADORES SÉRICOS E PROTEÍNAS
INTRAPLAQUETÁRIAS EM RELAÇÃO À PLAQUETOPENIA EM PACIENTES
INFECTADOS PELO VÍRUS DENGUE**

ORIENTADORA: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto
COLABORADORA: Dra. Denise Cristina de Souza Matos

Aprovada em: 12 / 02 / 2015

EXAMINADORES:

Dr^a. Patricia Torres Bozza
Dr. Robson de Queiroz Monteiro
Dr^a. Patrícia Cristina da Costa Neves
Dr^a. Flávia Barreto dos Santos
Dr. Adilson José de Almeida

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2015

*Dedico esta dissertação à minha família
Fatima, Gilson, Tainá, Luana e Pedro e
aos meus queridos amigos, que são a
família que eu escolhi. Obrigada!*

*“Nós descobrimos neste mundo
que o sucesso começa pela intenção da gente
e tudo se determina pelo nosso espírito.”*

Napoleon Hill

Agradecimentos

À força maior que nos rege, dando certeza de que devemos contribuir para o bem.

À minha orientadora Dra Luzia Maria de Oliveira Pinto por toda dedicação, competência, profissionalismo que contribuíram para a minha formação. Obrigado pela paciência, por acreditar em mim e por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

À minha líder e colaboradora, Dra. Denise Cristina de Sousa Matos, pelo incentivo constante à minha formação e por sempre acreditar que eu conseguiria. A você minha admiração e carinho.

Aos meus pais Fátima e Gilson pelo amor e por incentivar sempre meus sonhos, ensinar como realizá-los e afirmar que eles podem e devem se tornar realidade. Vocês me deram tudo que era necessário para me formar como ser humano: o exemplo de vocês.

Às minhas queridas irmãs Tainá e Luana pelos exemplos de vida totalmente distintos que deram à esta irmã caçula. Amo vocês e sempre estaremos juntas.

Ao meu sobrinho Pedro, que é quase um filho pra mim. Obrigada por aparecer nas nossas vidas e enchê-las de luz.

Aos meus amigos de fundão Bart, Barbara, Seve, Lilica, Carul, Karine e Chip, pela profunda amizade de todas as horas. Amo vocês. Agradeço também à Biologia UFRJ que fez parte do que sou hoje e que me rendeu as melhores experiências de vida.

À Bianca pelo companheirismo e ajuda com a formatação e design deste trabalho. Amo você.

Às queridas Catsauras e Catsauros do meu coração. Ter conquistado a amizade de vocês neste mestrado é um dos bens mais preciosos que carrego deste mestrado. Que venha o doutorado!

À equipe do LATIM: Andréa, Patrícia, Marcelo, Jane, Camilla, Alessandro e Luciana pelas risadas, cafés, corridas e as várias ralações em Bio-Manguinhos sempre com muita amizade e companheirismo.

À equipe do LIV, especialmente Amanda, Cíntia 1, Cíntia 2, Márcio, Jéssica, Iuri, Larissa, Luciana, Caroline e Gladys pelo companheirismo e pela prazerosa convivência.

À Dra. Amanda Torrentes pela amizade e valiosa contribuição para o desenvolvimento deste projeto.

À Dra. Claire Kubelka por ter me acolhido em seu laboratório.

Aos médicos Mauro Sérgio Barbosa e Paulo Vieira Damasco e suas equipes pela ajuda e competência no atendimento dos pacientes.

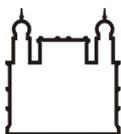
À Dra Rita Nogueira, Nieli Farias e toda equipe do Laboratório de Flavivírus pelo auxílio no diagnóstico dos pacientes.

À Dra. Myrna Bonaldo, Noemia Lima e toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus pelo auxílio com o ensaio do perfil de proteoma.

À Dra. Simone Moraes da Costa, Dra. Ada Alves, Kíssila Rabelo, Marcio Mantuano e toda equipe do LABIFIV, pela confecção do ensaio de western blot. A vocês todo o meu carinho e obrigado por matar um pouco da saudade da iniciação científica.

À Pós-graduação em Biologia Parasitária.

Finalmente, ao IOC/FIOCRUZ pelos recursos financeiros.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

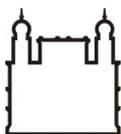
AValiação DO PERFIL DE MEDIADORES SÉRICOS E PROTEÍNAS INTRAPLAQUETÁRIAS EM RELAÇÃO À PLAQUETOPENIA EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DENGUE

RESUMO

Tamiris Azamor da Costa Barros

Plaquetas são fragmentos celulares derivados dos megacariócitos, que desempenham papel na hemostasia, coagulação, angiogênese, inflamação e resposta imune. Na infecção humana pelo Vírus Dengue (DENV), plaquetas constituem uma das populações celulares mais afetadas devido à plaquetopenia e disfunção plaquetária. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de citocinas, quimiocina e fatores de crescimento séricos e de proteínas intraplaquetárias relacionadas à angiogênese, coagulação, regulação da matriz extracelular e inflamação na plaquetopenia de pacientes infectados pelo DENV. Para tal, realizamos: (i) estudo populacional de pacientes e obtenção de soro e plaquetas em 2013, (ii) ensaios multiplex de micrarranjo líquido para quantificação dos níveis séricos de citocinas, quimiocina e fatores de crescimento e (iii) ensaio de determinação do perfil de expressão 55 proteínas intraplaquetárias. Quarenta e três pacientes DENV foram confirmados, com predominância do DENV-4. Independente da forma clínica, pacientes DENV apresentaram níveis séricos elevados de IL-10, TNF- α , CXCL8/IL-8, mas não de IL-1 β e IFN- γ quando comparados aos controles sadios. Análises estatísticas demonstraram que níveis de IL-10 e IFN- γ apresentaram correlação, respectivamente inversa e direta com a contagem de plaquetas. Ainda, IL-10 diretamente com leucócitos e linfócitos e TNF- α com linfócitos. Vinte e cinco proteínas intraplaquetárias foram quantificadas, mas apenas cinco delas, PDGF-AA, TGF- β 1, HGF, IGFBP-1 e Angiopoetina-1, apresentaram correlação direta com a contagem de plaquetas nos pacientes DENV. A quantificação sérica de PDGF e VEGF demonstrou que ambos estavam diminuídos no grupo DENV mais trombocitopênico. Análise entre proteínas intraplaquetárias com funções biológicas antagônicas demonstraram que a razão anti- *versus* pró-inflamatórios TGF- β 1/MIP-1 α foi diminuída em pacientes DENV trombocitopênicos e as razões anti *versus* pró-angiogênica serpina F1/angiopoetina-1 e serpina F1/ PDGF-AB/BB apresentaram níveis aumentados em pacientes DENV trombocitopênicos. Concluímos brevemente que a reintrodução do DENV-4 não resultou numa maior ocorrência de gravidade. Contudo esta reintrodução, induziu aumento dos níveis de TNF- α e CXCL8/IL-8 e da IL-10, influenciando de maneira direta ou indireta contagens de plaquetas e/ou demais células em resposta à infecção. Níveis

intraplaquetários de PDGF, TGF- β 1, IGFBP-1, Angiopoetina e HGF em pacientes mais trombocitopênicos poderiam prejudicar a ativação de mecanismos relacionados à angiogênese, coagulação, integridade do endotélio vascular e produção de mediadores inflamatórios. Assim, plaquetas poderiam ser consideradas células atuantes da resposta imunológica anti-DENV e, portanto, plaquetopenia é um fator prognóstico chave da imunopatogênese da dengue.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF SERUM MEDIATORS PROFILE AND INTRAPLATELET PROTEINS IN RESPECT TO THROMBOCYTOPENIA IN PATIENTS INFECTED WITH DENGUE VIRUS

ABSTRACT

Tamiris Azamor da Costa Barros

Platelets are cell fragments derived from megakaryocytes, which play a role in hemostasis, coagulation, angiogenesis, inflammation and immune response. In human infection with dengue virus (DENV), platelets are one of the most affected cell populations due to thrombocytopenia and platelet dysfunction. The objective of this study was to investigate the influence of serum cytokines, chemokines, intraplatelet growth factors and proteins related to angiogenesis, coagulation, regulation of extracellular matrix and inflammation in thrombocytopenia of patients infected with DENV. For this purpose, we conducted: (i) population study of patients and obtaining their serum and platelets in 2013, (ii) liquid microarray multiplex assays for quantitation of serum levels of cytokines, chemokine, and growth factors, and (iii) assay for determining expression profile of 55 intraplatelet proteins. Forty-three DENV patients were confirmed, with a predominance of DENV-4. Regardless of type of DENV, levels of IL-10, TNF- α , CXCL8 / IL-8, but not IL-1 β and IFN- γ were higher on serum of patients compared to healthy individuals. Statistical analyses showed that levels of IL-10 and IFN- γ presented correlation, respectively, inverse and direct with platelet count. Furthermore, IL-10 was directly correlated with leukocytes, lymphocytes, TNF- α and with lymphocytes. Twenty-five intraplatelet proteins were quantified, but only five of them, PDGF-AA, TGF- β 1, HGF, angiopoietin-1 and IGFBP-1 were directly correlated with platelet count in DENV patients. Both levels of PDGF and VEGF were decreased in group of DENV thrombocytopenic. Analyses between intraplatelet proteins with antagonistic biological functions have shown that ratios anti- versus pro-inflammatory TGF- β 1 / MIP-1 α were decreased in thrombocytopenic DENV patients and the ratios anti-versus pro-angiogenic serpin-F1 / angiopoietin-1 and serpin-F1 / PDGF-AB / BB showed increased levels in thrombocytopenic DENV patients. Briefly been concluded that the reintroduction of the DENV-4 did not result in a higher incidence of gravity. However, levels of TNF- α and CXCL8 / IL-8 and IL-10 were increased, influencing directly or indirectly platelet counts and/or other cells in response to infection. Levels of PDGF, TGF- β 1, IGFBP-1, angiopoietin and HGF intraplatelet of patients high thrombocytopenic may impair activation of mechanisms related to angiogenesis, coagulation, vascular endothelial integrity and production of inflammatory mediators. Thus, platelets might be considered active anti-DENV immune response cells and hence thrombocytopenia is a key prognostic factor in the immunopathogenesis of dengue.

Lista de abreviaturas

AA: aminoácido
Abs: anticorpos
ACD: ácido citrato dextrose
ADE: Imunoamplificação da infecção dependente de anticorpo
ADP: difosfato de adenosina
ALT: alanina aminotransferase
ANG: angiopoetina
APC: célula apresentadora de antígeno
ARC: células reticulares adventícias
ATP: adenosina trifosfato
BCA: ácido bicinônico
Bn: célula B virgem
BSA: albumina bovina do soro
BTG: beta tromboglobulina
C: proteína do capsídeo do vírus dengue
CCL2/MCP-1: ligante 2 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos-1
CCL3/MIP-1 α : ligante 3 de CC quimiocina/proteína 1 α inflamatória de macrófagos
CCL5/RANTES: ligante 5 de CC quimiocina/regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais
CCL7/MCP-3: ligante 7 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos-3
CD62E: E-selectina
CD62P: P-selectina
CD40L: glicoproteína 39
CE: célula endotelial
CLEC/ MDL-1: membro da família dos domínios da lectina do tipo C
CLR: receptor de lectina do tipo C
c-MLP: oncogene viral da leucemia mieloproliferativa
CTAP: peptídeo de ativação do tecido conectivo
CXCL1/KC: ligante 1 de CXC quimiocina/ quimiocina derivada de queratinócito
CXCL12/SDF: ligante 12 de CXC quimiocina/fator derivado de células estromais
CXCL4/PF4: ligante 4 de CXC quimiocina/fator plaquetário 4
CXCL5/ENA-78: ligante 5 de CXC quimiocina/ativador neutrofílico derivado do epitélio 78
CXCL7/NAP2: ligante 7 de CXC quimiocina/ peptídeo ativador de neutrófilo
CXCL8/IL-8: ligante 8 de CXC quimiocina/ interleucina 8
DA: Dopamina
DAMTS: A desintegrina e metaloproteinase com motivo da trombospondina
DC: célula dendrítica
DC-SIGN: molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intracelular 3 específica de células dendríticas
DENV: vírus da dengue
DIC: coagulação intravascular disseminada
DNA: ácido desoxirribonucleico
DR1P: deoxirribose-1-fosfato
E: proteína do envelope do vírus dengue

EGF: fator de crescimento epidérmico
EG-VEGF: fator de crescimento vascular endotelial derivado de glândula endócrina
EPO: eritropoietina
FcR: receptor Fc
FDSA: dengue com sinais de alarme
FD: febre do dengue
FHD: febre hemorrágica do dengue
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
FGF: fator de crescimento de fibroblastos
FN: fibronectina
FXa/FVa/protrombina: complexo protrombinase
FIXa/FVIIIa/FX: complexo tenase intrínseco
G-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos
Gli: Glicina
GM-CSF: fator estimulador de colônia granulócitos-macrófago
GP: glicoproteína
GRP78/BIP: Binding immunoglobulin protein
GTP: trifosfato de guanosina
H: Histamina
HB-EGF: fator de crescimento tipo EGF liigante de heparina
HGF: Fator de crescimento de hepatocitos
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HSP: heparan sulfato
HPSE: heparanase
HMGB1: proteína box de alta motilidade de grupo 1
HUVEC: célula endotelial de veia umbilical humana
ICAM: molécula de adesão intercelular
Ics: imunocomplexos
IFN: interferon
IGF: fator de crescimento tipo-Insulina
IgG: imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
IL: interleucina
IOC: Instituto Oswaldo Cruz
ITAM: imunorreceptor baseado em tirosina
JAM: molécula de adesão juncional
KGF: fator de crescimento do queratinócito
LAMP: proteína de membrana lisossomal
LC-SIGN: molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intracelular 3 específica de linfonodos e fígado
LP: lipoproteína
M: proteína da membrana do vírus dengue
MB: célula B de memória
ME: microscopia eletrônica
MIP: Proteína inflamatória de macrófagos
MK: megacariócito
MMP: metaloproteinase de matriz extracelular

Mo: monócitos / macrófagos
MR: receptor de manose
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
mT: células T de memória
NE: Noradrenalina
NK: célula T *natural killer*
NO: óxido nítrico
NOx: nitrito e nitrato
NS: proteína não estrutural do vírus dengue
NTP: nucleosídeo 5' trifosfato
ODF: outras doenças febris
PAF: fator de ativação plaquetária
PAFR: receptor de fator de ativação plaquetária
PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1
PAIgG: imunoglobulina G associada à plaquetas
PAIgM: imunoglobulina M associada à plaquetas
PAMP: padrão molecular associado a patógeno
PAR: receptor ativado por protease
PBS: tampão salina fostato
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2: prostaglandina E2
PMN: célula polimorfonuclear
prM: proteína precursora de membrana do vírus dengue
PRP: plasma rico em plaquetas
PSGL-1: ligante 1 da glicoproteína P-selectina
RE: retículo endoplasmático
RGD: sequência peptídica Arginina-Glicina-Asparagina
RJ: Rio de Janeiro
RNA: ácido ribonucleico
RTP: termino 5' de ácido ribonucleico
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SCA: sistema canicular aberto
SCD: síndrome do choque do dengue
SDM: sistema de demarcação de membranas
Sec1-Munc: homólogo mamífero da proteína Sec 1 de levedura
SINAN: Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SIP: esfingosina-1-fosfato
SNAP: proteína associada ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida
SNARE: receptor de ligação ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida
sTNFR : receptor solúvel de fator de necrose tumoral
sTRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado à fator de necrose tumoral
TF: fator tecidual
TF/FVIIa: complexo tenase extrínseco
TFPI: inibidor da via do fator tecidual
TGF: fator de crescimento tumoral
TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinases
TLR: receptor do tipo Toll

TM: trombomodulina
Tn: células T virgens
TNF: fator de necrose tumoral
TP: receptor de tromboxano A2
t-PA: ativador do plasminogênio tecidual
TPO: trombopoietina
TPS: trombospondina
TRAP: agonista do receptor da trombina
Treg: células T reguladoras
TXA2: tromboxano A2
TXB2: tromboxano B2
uPA: ativador de plasminogênio tipo uroquinase
VAMP: proteína de membrana associada a vesícula
VCAM: molécula de adesão vascular
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
VN: Vitronectina
vWF: fator de von Willebrand
WHO: organização mundial da saúde

Sumário

1 PLAQUETAS	01
1.1 Biologia de plaquetas	01
1.1.1 Origem, formação e morfologia	01
1.1.2 Ativação plaquetária	04
1.2 Síntese e secreção de moléculas biologicamente ativas	06
1.3 Papel das plaquetas na hemostasia e inflamação	09
1.3.1 Angiogênese e coagulação	09
1.3.2 Inflamação e resposta imunológica	12
1.3.3 Interação com células imunes e endotélio	15
2 VÍRUS DENGUE	17
2.1 História e epidemiologia atual da dengue	17
2.2 Estrutura e proteínas virais	19
2.2.1 Estrutura Viral	19
2.2.2 Replicação viral e interação com diferentes populações celulares	23
2.3 Manifestações e classificação clínicas	25
2.4 Principais mecanismos envolvidos na imunopatogênese da dengue	27
2.4.1 Resposta imunológica de reação-cruzada: Teoria da facilitação dependente de anticorpo e Teoria do pecado antigênico original	28
2.4.2 Mimetismo molecular	29
2.4.3 Produção exacerbada de citocinas	31
3 PLAQUETAS NA DENGUE	35
3.1 Principais mecanismos envolvidos na plaquetopenia	36
3.1.1. Supressão da medula óssea	37
3.1.2. Destruição periférica de plaquetas	40
3.1.2.1 Replicação do DENV em plaquetas?	40
3.1.2.2 Mecanismos de destruição induzidos pela infecção	43
3.2 Disfunção plaquetária na dengue	45
3.3 Desregulação entre mecanismos pró- versus anti-coagulantes na dengue.	47
3.4 Influência das plaquetas na alteração da permeabilidade endotelial	49
4 JUSTIFICATIVA	51

5 OBJETIVOS	52
5.1 Objetivo geral	52
5.2 Objetivos específicos	52
6 MATERIAIS E MÉTODOS	53
6.1 Amostragem populacional	53
6.2 Confirmação do diagnóstico laboratorial dos casos suspeitos de dengue ...	53
6.3 Isolamento de plaquetas em barreira de iodixanol Optiprep e separação de soro/plasma a partir do sangue periférico	54
6.4 Lise de plaquetas e quantificação de proteínas totais dos lisados de plaquetas por ensaio de bicinchoninic acid (BCA)	55
6.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas séricas por ensaio multiplex de microarranjo líquido	56
6.6 Ensaio de determinação do perfil de expressão de proteínas intraplaquetárias relacionadas à angiogênese pelo Human Angiogenesis Array Kit	58
6.7 Quantificação de PDGF-BB e VEGF séricos por ensaio de microarranjo líquido em pacientes utilizados no ensaio de determinação do perfil de expressão de proteínas intraplaquetárias	62
6.8 Análise estatística	63
7 RESULTADOS	64
7.1 Caracterização demográfica, clínica e laboratorial de pacientes e controles envolvidos no estudo	64
7.2 Quantificação dos níveis séricos de citocinas em pacientes e controles	67
7.3 Análise da associação de níveis séricos de citocinas com dados laboratoriais de pacientes infectados pelo DENV	68
7.4 Avaliação de proteínas intraplaquetárias em pacientes e controles e análise da associação de proteínas intraplaquetárias, níveis séricos de citocinas e dados clínico-laboratoriais de pacientes infectados pelo DENV	70
7.5 Níveis séricos de PDGF-BB e VEGF em pacientes utilizados no ensaio de expressão de proteínas intraplaquetárias	79
7.6 Análise da regulação funcional entre proteínas intraplaquetárias em pacientes infectados pelo DENV	81

8 DISCUSSÃO	83
8.1 Análise Comparativa dos Parâmetros Clínicos e Laboratoriais de Pacientes Infectados pelo DENV-4 durante Epidemia de 2013	83
8.2 Aumento dos Níveis Séricos dos Mediadores Pró-Inflamatórios TNF- α e CXCL8/IL-8 e Regulação da Inflamação pelo Aumento de IL-10 em Pacientes Infectados pelo DENV. Possíveis Impactos na Plaquetopenia?	85
8.3 Envolvimento das proteínas intraplaquetárias na plaquetopenia de pacientes infectados pelo DENV	92
8.4 Diminuição dos Níveis Intraplaquetário e Sérico de Mediadores Envolvidos na Manutenção da Integridade Endotelial Vascular na Dengue: Impacto da Plaquetopenia	94
8.5 Plaquetas como Células Inflamatórias Atuantes na Infecção pelo DENV ...	97
9 PERSPECTIVAS	99
10 CONCLUSÕES	100
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
12 ANEXOS	121

Lista de Figuras

Figura 01. Morfologia de plaquetas	02
Figura 02. Localização intracelular de proteína em plaquetas quiescentes por imunofluorescência	04
Figura 03. Morfologia de plaquetas ativadas	06
Figura 04. Ativação de plaquetas por agonistas	06
Figura 05. Papel das plaquetas na hemostasia	10
Figura 06. Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares	11
Figura 07. Mapas globais das áreas de risco e distribuição da dengue em 2010	17
Figura 08. Partícula viral	19
Figura 09. O genoma do DENV	20
Figura 10. Representação esquemática do ciclo de replicação viral e da partícula do DENV	24
Figura 11. Classificação de dengue revisada em 2009 pela Organização Mundial de Saúde	27
Figura 12. Patogênese da infecção pelo vírus da dengue nas diferentes fases da doença	34
Figura 13. Esquema de supressão da medula óssea e destruição de plaquetas periférica provocada na dengue	37
Figura 14. Células reticulares adventícias (ARC) em uma cultura de células do estroma inoculadas com DENV	38
Figura 15. Inibidores e estimuladores das etapas da formação de plaquetas	39
Figura 16. Células de aspirado de medula óssea coletadas de macacos rhesus submetidas à imuno-histoquímica com dupla marcação ...	40
Figura 17. Partículas semelhantes ao DENV em plaquetas isoladas de paciente infectados pelo DENV	41

Figura 18. Microscopia eletrônica de transmissão de cultura de plaquetas em contato com DENV-2.....	42
Figura 19. Membrana de nitrocelulose e câmara multilavagem do <i>Human Angiogenesis Array Kit</i>	60
Figura 20. Identificação dos spots reagentes	61
Figura 21. Sobreposição do percentual de positividade dos testes de diagnóstico	65
Figura 22. Dosagem dos níveis séricos de citocinas em pacientes DENV e Controles	68
Figura 23. Quantificação de citocinas de acordo com a contagem de plaquetas acima e abaixo de 150.000/mm ³	70
Figura 24. Correlação entre proteínas do lisado de plaquetas e o número de plaquetas no sangue de pacientes infectados pelo DENV	75
Figura 25. Análise comparativa de proteínas intraplaquetárias de acordo com os grupos de pacientes DENV acima <i>versus</i> abaixo de 150.000 plaq/mm ³	76
Figura 26. Correlação entre os níveis de TIMP-1 e MMP-9	77
Figura 27. Correlação entre os níveis de PD-ECGF e dias de doença em pacientes DENV	78
Figura 28. Quantificação de PDGF-AB/BB e VEGF em pacientes DENV e controles	79
Figura 29. Correlação entre níveis séricos de PDGF-AB/BB e a contagem de plaquetas/mm ³ em 8 pacientes DENV	80
Figura 30. Análise comparativa de PDGF-AB/BB e VEGF de acordo com os grupos de pacientes DENV acima <i>versus</i> abaixo de 150.000 plaq/mm ³	80
Figura 31. Regulação das funções de proteínas intraplaquetárias	82
Figura 32. Hipótese de papel das plaquetas na manutenção da integridade ou indução da permeabilidade vascular.....	96

Lista de Quadros

Quadro 01. Mediadores de ativação ou inibição da angiogênese e permeabilidade vascular derivados de plaquetas	08
Quadro 02. Mediadores inflamatórios e moduladores imunológicos derivados de plaquetas	14
Quadro 03. Referência dos kits de Luminex e diluições das curvas padrão...	57
Quadro 04. Proteínas avaliadas pelo <i>Human Angiogenesis Array Kit</i> e agrupadas segundo suas funções biológicas	59
Quadro 05. Diluições das curvas padrão de PDGF e VEGF.....	63

Lista de Tabelas

Tabela 01. Características demográficas, clínico-laboratoriais de controles e pacientes	66
Tabela 02. Correlações entre os níveis séricos de citocinas e contagem de células do sangue em pacientes infectados pelo DENV	69
Tabela 03. Análise de pacientes e controles quanto ao perfil de expressão de proteína intraplaquetárias e características clínicas e laboratoriais	72
Tabela 04. Vinte e cinco proteínas intraplaquetárias detectadas em lisados de plaquetas de pacientes e controles	74
Tabela 5. Comparação das proteínas intraplaquetárias relacionadas à gravidade	77
Tabela 6. Correlações estatisticamente significativas encontradas entre os níveis de proteínas intraplaquetárias e séricas em pacientes DENV	78



1. Plaquetas

1.1 Biologia de plaquetas

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados, com tamanho de aproximadamente $7\mu\text{m}^3$. Segundo tipo celular circulante mais numeroso em humanos, perdendo apenas para as hemácias, as plaquetas apresentam contagem normal de 150.000 a 400.000 plaquetas por microlitro de sangue. Constituem os primeiros elementos celulares que se acumulam em sítios onde há dano tecidual da parede vascular e por isso, quando estimuladas e ativadas, iniciam eventos como agregação, exocitose de constituintes presentes em grânulos, expressão de proteínas de adesão e secreção de citocinas e mediadores (Shi & Morrel, 2011). Tem-se demonstrado o papel das plaquetas como células-chave de processos inflamatórios e resposta imune contra patógenos, evidenciado pela interação direta de plaquetas ativadas com células endoteliais e células do sistema imunológico, o que é favorecido pela sua localização nos sítios de entrada de microorganismos patogênicos (Weyrich & Zimmerman, 2004).

1.1.1 Origem, formação e morfologia

Existem aproximadamente 10^{12} plaquetas em repouso (não ativadas) na circulação sanguínea de um humano adulto. As plaquetas circulam na corrente sanguínea por 8 a 10 dias, sendo que 10^{11} novas plaquetas precisam ser produzidas diariamente a partir de megacariócitos da medula óssea para que o número normal de plaquetas (150 a 400 plaquetas/ μL de sangue) seja mantido (Kaushansky, 2006). Através de ciclos repetidos de replicação de DNA sem divisão celular, os megacariócitos sofrem endomitose e se tornam poliploides (Ebbe, 1976). Após o processo de endomitose, é iniciado o estágio de maturação, no qual o citoplasma é preenchido por organelas adquirindo características que incluem o desenvolvimento do sistema de membranas de demarca

ção (SDM), sistema canalicular aberto (SCA) e a formação dos grânulos intracelulares (Italiano e Hartwig, 2007). Proteínas específicas associadas às plaquetas, como os receptores de fibrinogênio, são sintetizados e expressos na superfície dos megacariócitos, enquanto que outras proteínas são empacotadas em grânulos secretórios, como o fator de von Willebrand (vWF). Outras proteínas como o fibrinogênio são endocitadas pelos megacariócitos e seletivamente empacotadas em grânulos específicos (Heijnen et al., 1998).

Os modelos propostos de formação de plaquetas incluem projeções citoplasmáticas de megacariócitos (Djaldetti et al., 1979) e fragmentação citoplasmática via SDM 16 (Behnke, 1968). Estudos demonstram que ao final do estágio de maturação, os megacariócitos formam longas e múltiplas extensões citoplasmáticas chamadas pró-plaquetas que cruzam a barreira endotelial, entram nos sinusóides, liberando-as na circulação, onde formam as plaquetas por fragmentação de suas extremidades (Junt et al., 2007). Este processo gera células com volume de cerca de $7 \mu\text{m}^3$, forma discóide atingindo 2 a $5 \mu\text{m}$ de diâmetro e que apesar de anucleadas, contém pré-mRNA empacotado e complexos pós-transcripcionais. Com relação à morfologia interna, destaca-se uma zona de organelas contendo mitocôndria e três tipos principais de grânulos secretórios: grânulos α , corpos densos e lisossomos (White, 2007) (Figura 1).

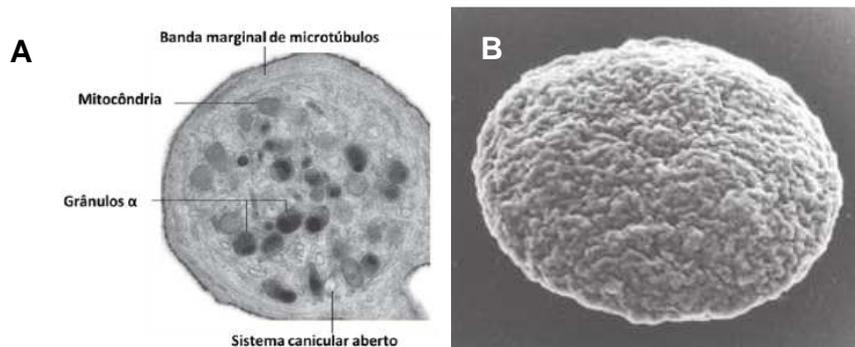


Figura 1. Morfologia de plaquetas. (A) Estrutura celular interna de uma plaqueta por microscopia eletrônica de transmissão, mostrando as organelas celulares (aumento x 30.000). Figura extraída de Semple e colaboradores, 2011. (B) Estrutura externa de uma plaqueta quiescente com formato discóide por microscopia eletrônica de varredura (aumento x 30.000). Figura extraída de White, 2007.

Plaquetas em estado quiescente apresentam três regiões. A primeira é a zona periférica, responsável pela adesão e agregação, e consiste no revestimento de glicocálice, membrana plasmática e citoesqueleto. Esta zona pode conter moléculas biologicamente ativas adsorvidas, como os fatores de coagulação V, VIII, XI e XII, receptores de adenosina difosfato (ADP), trombina, fator de von Willebrand (vWF), colágeno, fibrinogênio, fibrina, fibronectina, epinefrina, fator de ativação plaquetária (PAF), trombospondina (TSP), tromboxano A₂ (TXA₂), prostaciclina, epinefrina, serotonina e glicosiltransferase (Rendu e Brohard-Bohn, 2001). A segunda região é responsável pela contração e apoio ao sistema de microtúbulos que interliga SDM e SCA. A última é a zona de organelas contendo três tipos principais de grânulos secretórios: grânulos α , corpos densos e lisossomos. Corpos multivesiculares também estão presentes, já formados no megacariócito, através da fusão de pequenas vesículas que brotam da zona trans-Golgi e servem como “estações de triagem” para o desenvolvimento dos três grânulos (White, 2007). Uma pequena quantidade de mitocôndrias está presente no citoplasma, que estão envolvidas no metabolismo energético oxidativo (Parise et al., 2001). Outras organelas envolvidas por membrana e estruturas são encontradas, tais como: glicossomos, cadeias eletrodensas e inclusões tubulares (White, 2007; Cimmino e Golino, 2013).

Os grânulos α são os mais abundantes, aproximadamente 50 a 80 grânulos α por plaqueta, representando cerca de 10% do volume plaquetário (Blair e Flaumenhaft, 2009). No megacariócito, os grânulos α podem ser formados a partir dos corpos multivesiculares, através da junção de proteínas de revestimento (como clatrina), proteínas adaptadoras, maquinaria de fusão e GTPases monoméricas. A maturação dos grânulos continua na plaqueta circulante por endocitose da membrana plasmática, que é realizada por uma via dependente de clatrina (Klinger e Kluter, 1995) e é uma atividade constitutiva de plaquetas em repouso. O conteúdo dos grânulos α inclui tanto proteínas de membrana que são expressas na superfície da plaqueta, como a P-selectina (CD62P), como proteínas solúveis que são liberadas na matriz extracelular (Figura 2). Sabe-se que, quando ativadas, as plaquetas podem secretar centenas de proteínas solúveis de seus grânulos α (Blair e Flaumenhaft, 2009), que incluem

moléculas pró-coagulantes (Fator V, multimerina, Fator VIII), reguladores fibrinolíticos (α 2-macroglobulina, plasminogênio, inibidor 1 do ativador de plasminogênio), fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal, fator de crescimento hepático, fator de crescimento insulina-símile 1, fator de crescimento transformador β – TGF- β , fator de crescimento endotelial vascular – VEGF, fator de crescimento derivado de plaqueta-PDGF), quimiocinas (fator plaquetário 4 – CXCL4/PF4, β -tromboglobulina, CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL17/TARC, CXCL1/KC, CXCL5/ENA-78, CXCL8/IL-8) e moléculas de adesão (CD62P, vWF, trombospondina, fibrinogênio, integrina α IIb β 3, fibronectina) (Reed, 2007).

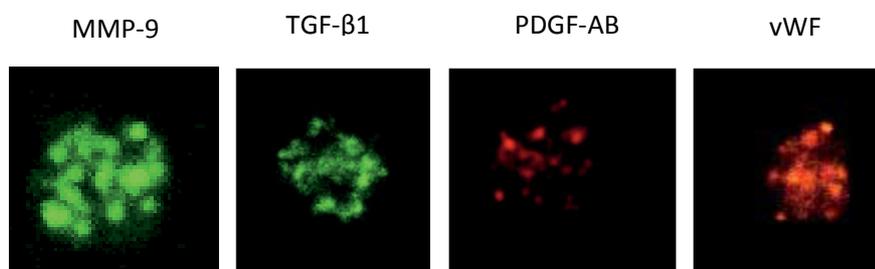


Figura 2. Localização intracelular de proteína em plaquetas quiescentes por imunofluorescência. Marcações intracelulares com anticorpos conjugados a Alexa-Fluor 488 (verde) ou Alexa-Fluor 568 (Vermelho) demonstram a localização de MMP-9, TGF- β 1, PDGF-AB e vWF nos grânulos- α . Modificada de Nurden, 2011.

Os grânulos densos são menos abundantes que os grânulos- α (3 a 8 por plaqueta), possuem meio ligeiramente ácido (pH 6,1), íons (cálcio, magnésio, fósforo e pirofostato), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), proteínas de membrana lisossomal (LAMP-2 e LAMP-3) e serotonina (Reed, 2007).

As plaquetas humanas contêm poucos lisossomos, geralmente uma plaqueta possui de zero a três lisossomos, que são esféricos, ligeiramente menores que os grânulos α e em seu conteúdo encontram-se pelo menos 13 hidrolases ácidas, além de catepsina D e E, e proteínas de membrana lisossomal (LAMP-1, LAMP-2 e CD63) (White, 2007). A função dos lisossomos plaquetários na hemostasia é desconhecida, porém durante um contexto de ativação *in vitro*, além da secreção de grânulos- α e grânulos densos, o conteúdo dos lisossomos também é exocitado (Chen et al., 2000).

A secreção de lisossomos após ativação de plaquetas *in vivo* também já foi relatada (Ciferri et al., 2000). Partículas sintéticas como látex endocitadas por plaquetas através do SCA são transferidas aos grânulos α , mas também podem reagir com lisossomos (Lewis et al., 1976) que seriam, portanto, um compartimento plaquetário de digestão endossomal (White, 2007).

1.1.2 Ativação plaquetária

A ativação plaquetária é um fenômeno comum a diversas situações de quebra do equilíbrio fisiológico, como danos aos vasos sanguíneos quando em contato com componentes da matriz subendotelial (colágenos e vWF) (Cimmino e Golino, 2013), infecções por DENV, vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) e bacterianas (Hotzz et al., 2013; Holme et al., 1998; Cox et al., 2011), isquemia coronariana (Fitzgerald et al., 1986), hipotermia (Michelson et al., 1994), diabetes mellitus (Davì et al., 1999) e trombose arterial (Davì e Patrono, 2007).

Durante sua ativação, as plaquetas passam por um processo de mudança estrutural, no qual as células discoides sofrem modificações no citoesqueleto, incluindo a desmontagem de um anel de microtúbulos, resultando em uma forma esférica intermediária. A seguir, ocorre a polimerização da actina e a extensão de filopódios, fazendo com que a célula adquira morfologia lamelar ou dendrítica (Figura 3) (Jurk e Kehrel, 2005). Contudo, os eventos relacionados à ativação não estão restritos às mudanças na morfologia externa, tendo consequências em diversas funções biológicas desenvolvidas pelas plaquetas.

Frente à ativação ocorre a formação de agregados celulares com outras plaquetas, neutrófilos, monócitos e células endoteliais (Michelson, 2007; Krishnamurti et al., 2002), exocitose de constituintes presentes em seus grânulos, expressão de proteínas de adesão e secreção de citocinas e mediadores imunológicos (Shi e Morrell, 2011).

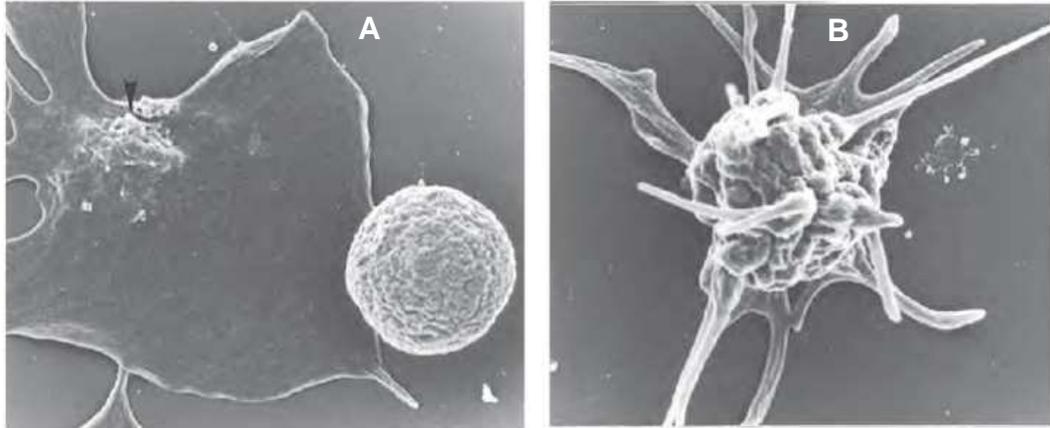


Figura 3. Morfologia de plaquetas ativadas. (A) Diferença entre a plaqueta quiescente com formato discóide e plaqueta ativada exibindo aspecto lamelar. A seta demarca os poros do SCA (aumento x 15.000). (B) Plaqueta ativada exibindo longos filopódios (aumento x 13.000). (A) e (B) foram extraídas de White, 2007.

Os principais receptores de plaquetas com ação nas interações com outras células são a glicoproteína IIb/ IIIa (CD41/ CD61) e P-selectina, ambos os receptores são expressos na superfície das plaquetas ativadas. Plaquetas expressando CD41/ CD61 ligam-se às proteínas de adesão que contêm a sequência RGD (sequência peptídica Arginina-Glicina-Asparagina), permitindo assim a agregação e ligação das plaquetas ativadas a leucócitos e células endoteliais através de “moléculas ponte”, como o fibrinogênio (Calvete et al., 1991).

1.2 Síntese e secreção de moléculas biologicamente ativas

As plaquetas, quando estimuladas e ativadas, secretam mediadores armazenados ou sintetizados em seus grânulos, que atuam em diversas funções como as exemplificadas no quadro 1. Alguns agonistas envolvidos na ativação plaquetária incluem ADP, TXA₂, colágeno, serotonina, epinefrina e trombina (Jennings, 2009), além de patógenos e toxinas (Figura 4) (Vieira-de-Abreu et al., 2012).

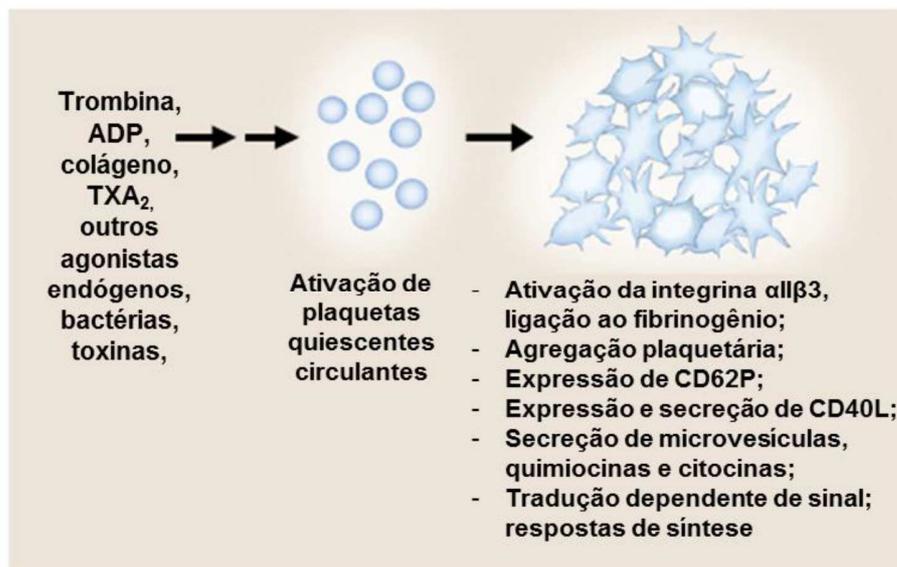


Figura 4. Ativação de plaquetas por agonistas. Plaquetas ativadas por agonistas realizam sinalização intracelular, resultando em respostas funcionais que modulam eventos importantes durante a inflamação e hemostasia. Adaptada de Vieira-de-Abreu e colaboradores, 2012.

Quadro 1. Mediadores de ativação ou inibição da angiogênese e permeabilidade vascular derivados de plaquetas*

Pró-angiogênicos
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) Fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) Fator de crescimento derivado de plaquetas (platelet derived growth factor ou PDGF) Fator de crescimento epidermal (EGF) Fator de crescimento do hepatócito (HGF) Fator de crescimento tipo-Insulina 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) Angiopoetina-1 (ANGPT1) Metaloproteinase de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) Lipoproteína A (LPA) Esfingosina-1-fosfato (sphingosine-1-phosphate ou SIP) Fator derivado de células do estroma (SDF-1) Heparanase (HPSE) Fator V/Va e XI Deoxiribose-1-fosfato (DR1P) CD40-L Fator tecidual (TF) Interleucina-8 (IL-8/CXCL8)
Anti-angiogênicos
Angiostatina Endostatina Fator plaquetário 4 (PF4) β -tromboglobulina Inibidor de ativador de plasminogênio (PAI-1) Fator de crescimento transformador- β (TGF- β) Trombospondina-1 (TSP-1) Inibidor tecidual de metaloproteinases 1–4 (TIMP-1–4) Fibronectina (FN) Vitronectina (Vn) α 2-macroglobulina (α 2M) α 2-antiplasmina Inibidor da via do fator tecidual (TFPI) Antitrombina (SERPINC1)
Regulação negativa da permeabilidade vascular
Angiopoietin-1 (ANG-1) Serotonina (5HT) Esfingosina-1-fosfato (sphingosine-1-phosphate ou SIP)
Aumento da permeabilidade vascular
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) Histamina (H) Noradrenalina (NE) Dopamina (DA)

Quadro modificado de Andia e Abate, 2012.

Além disso, as plaquetas realizam tradução de mRNA gerando a formação de proteínas em resposta a sinais de ativação (Zimmerman e Weyrich, 2008). A síntese *de novo* acontece porque as plaquetas possuem um complexo repertório pós-transcricional para a tradução pós-ativação (Weyrich et al., 2009). Essa via é possível, uma vez que megacariócitos transferem pré-mRNAs específicos para as plaquetas durante a plaquetogênese, como no caso do pré-mRNA de fator tecidual (TF) que é processado a mRNA maduro e traduzido em TF biologicamente ativo, um mediador inflamatório e regulador da coagulação (Schwartz et al., 2006).

A exocitose ocorre por mecanismos homólogos as de células secretórias. O processo envolve reorganização da estrutura de actina, translocação dos grânulos para a membrana plasmática, fusão do grânulo às membranas do SCA e liberação do conteúdo intracelular. A secreção acontece através de mecanismo altamente regulado dependente de receptor de ligação ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida (SNARE). As principais SNARE são as sintaxinas (VAMPs) e proteína associada ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida (SNAPs) (Sudhof & Rothman, 2009). As SNAREs associadas aos grânulos são chamadas SNAREs vesiculares (vSNAREs), enquanto que aquelas associadas às membranas plasmática e do SCA são chamadas tSNAREs. A associação entre vSNARE e tSNARE produz energia necessária para a fusão das membranas. As plaquetas humanas possuem as proteínas SM Munc18a, Munc18b e Munc18c (Schraw et al., 2003), sendo que dessas, a Munc18c forma um complexo com a sintaxina 4, que se dissociado durante a ativação, estimula a secreção dos constituintes dos grânulos (Hong Polgár & Reed 2003). As proteínas Rab, GTPases de baixo peso molecular, também são capazes de modificar a função das SNAREs. As plaquetas possuem as Rabs 1, 3b, 4, 6, 8, 11, 27 e 31 que, quando ativadas, fosforilam as Rabs 3b, 6c e 8 (Reed, 2007). Estudos sugerem que a secreção de grânulos densos é regulada pela Rab 27b (Tolmacheva et al., 2007).

1.3 Papel das plaquetas na hemostasia e inflamação

1.3.1 Coagulação e angiogênese

A hemostasia é um processo dinâmico no qual mecanismos físicos e bioquímicos promovem a coagulação sanguínea (parada da perda de sangue em um vaso danificado) de forma rápida e regulada, cujos principais ativadores são TXA₂, ADP e trombina (Qu e Chaikof 2010). A adesão e ativação das plaquetas são mediadas através das interações entre os receptores GPIb-IX-V com o vWF e GPVI com o colágeno subendotelial (Rumbaut e Thiagarajan 2010). Alternativamente, quando o endotélio vascular é danificado, sítios de colágeno são expostos, facilitando a adesão de plaquetas nestes sítios específicos. As plaquetas aderem às moléculas nos tecidos subendoteliais no sítio da lesão, onde se agregam e interagem com leucócitos e células endoteliais, iniciando assim a cascata de coagulação (Figura 5) (Furie e Furie, 2008).

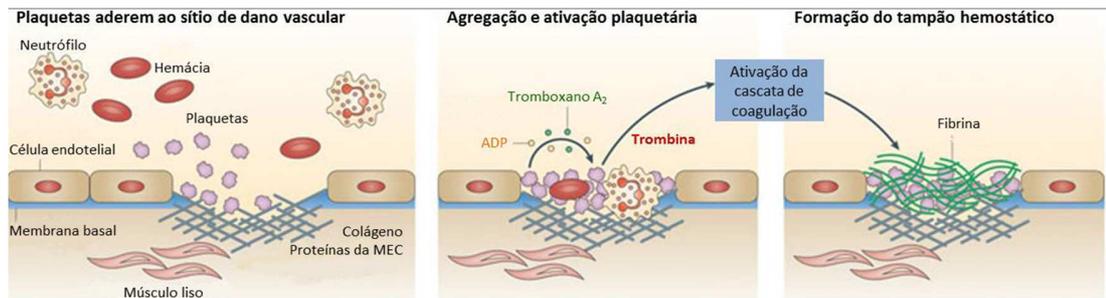


Figura 5. Papel das plaquetas na hemostasia. As plaquetas se agregam quando há dano do endotélio vascular e exposição de colágeno e de proteínas da matriz extracelular (MEC). As plaquetas ativadas liberam mediadores de ativação como TXA₂ e ADP. Após ativação, as plaquetas produzem trombina, catalisando a iniciação da cascata de coagulação e, eventualmente, formando o depósito de fibrina. Figura adaptada de Semple e colaboradores, 2011.

Os fatores de coagulação presentes na circulação sanguínea estão envolvidos em uma sequência rigorosamente controlada de reações de ativação que resultam na formação de trombina e subsequentemente de fibrina. Esses fatores circulam na forma de zimogênios, que requerem processamento por proteólise para que sejam ativados. De acordo com o novo modelo de coagulação sanguínea, a mesma ocorre em três estágios que se sobrepõem: fase de iniciação, fase de amplificação e fase de propagação (Figura 6) (Hoffman, 2003)

A fase de iniciação ocorre com a exposição do TF na superfície celular, como por exemplo, em células subendoteliais e monócitos ativados. O complexo tenase

extrínseco (TF/FVIIa) é produzido, resultando na formação de FXa e FIXa, e na geração de pequenas quantidades de trombina. Essa fase de iniciação é regulada pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI): o FXa formado no início da coagulação se liga ao TFPI, levando à inibição do complexo TF/FVIIa, constituindo uma alça de regulação negativa. Na fase de amplificação, a trombina formada na fase inicial é essencial para a ativação de plaquetas e dos cofatores das enzimas FXa e FIXa, respectivamente FV e FVIII, permitindo a amplificação da geração de trombina. Assim, o FXa constituinte do complexo protrombinase é protegido da inibição por antitrombina. Na fase de propagação, grandes quantidades de trombina são geradas na superfície da plaqueta ativada, onde a exposição de fosfolípidios aniônicos, especialmente fosfatidilserina, é essencial para a formação dos complexos tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa/FX) e protrombinase (FXa/FVa/protrombina). Níveis mais elevados de trombina levam à ativação de FXI, disponível no plasma e também liberado dos grânulos α de plaquetas. A superfície da plaqueta ativada protege ainda o FXIa da inibição por inibidores plasmáticos. O FXIa pode induzir a formação maciça de trombina através da ativação mais eficiente de FIX na superfície da plaqueta ativada (Hoffman, 2003).

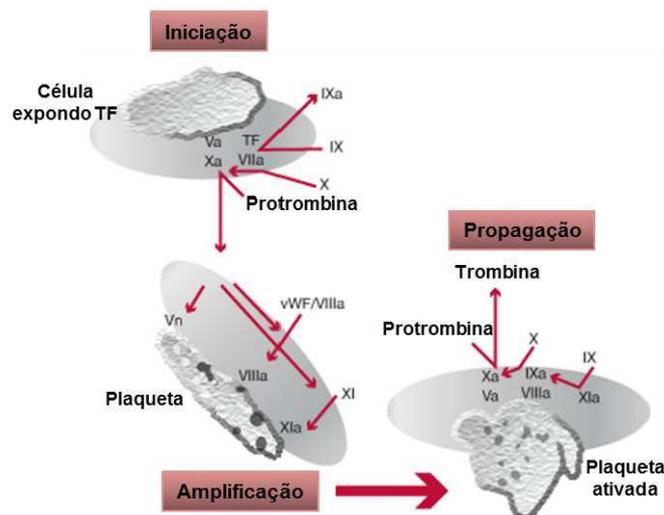


Figura 6. Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares. As três fases da coagulação ocorrem em superfícies celulares. A fase de iniciação ocorre em células que apresentam TF em sua superfície, a fase de amplificação na superfície de plaquetas ao serem ativadas e a fase de propagação ocorre na superfície de plaquetas já ativadas. Modificada de Hoffman & Monroe, 2001.

A angiogênese é o processo de iniciação e configuração de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, e envolve dois estágios biológicos consecutivos, indução e resolução. O primeiro estágio, indução, é regulado pela presença de VEGF, TGF- β 1, β FGF, PDGF e EGF secretados por plaquetas ou células do estoma, que induzem à ativação e à migração de células endoteliais (Andia e Abade, 2012).

Já na resolução observa-se que a ativação plaquetária leva à liberação de proteínas pró-angiogênicas, tais como: VEGF, HGF, TGF- β 1, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF-A, B ou C) e de outras citocinas solúveis (CXCL8/IL-8, angiopoetina e CXCL12) e metaloproteases MMP-1, -2 e -9 (Nurden et al., 2007). Moléculas pró-angiogênicas influenciam a migração e proliferação de células endoteliais, organização e estabilização dos vasos. Contudo, as plaquetas também podem secretar diversos fatores anti-angiogênicos, incluindo endostatina, fibronectina, PF4, TSP-1, α 2-macroglobulina, PAI-1, angiostatina, bem como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1-4) (Nurden et al., 2008). O efeito do balanço final entre as proteínas liberadas por plaquetas dependerá não só do ambiente em que são lançadas, mas também do grau de secreção alcançado. As proteínas podem atuar sinergicamente, mas também em competição. No quadro 1 (p.7) podemos ver os fatores que atuam neste balanço e o quão complexa esta interação molecular pode ser (Andia e Abate, 2012).

1.3.2 Inflamação e resposta imunológica

As plaquetas, ao interagir fisicamente com leucócitos e células endoteliais, atuam como sinalizadoras que conectam a inflamação e resposta imunológica à hemostasia. As plaquetas, quando estimuladas e ativadas, iniciam eventos como agregação, formação de micropartículas e exossomos (Aatonen, 2014), expressão de proteínas de adesão e receptores e exocitose de constituintes presentes em seus grânulos (Cimmino

e Golino, 2013). Esta exocitose dos grânulos- α , densos e lisossomos gera a secreção de citocinas e mediadores biológicos com diversas funções imunológicas e inflamatórias, como podemos ver no quadro 2.

Quadro 2. Mediadores inflamatórios e moduladores imunológicos derivados de plaquetas

Molécula	Ação imunológica/inflamatória
Grânulos- α	
PFA	Quimiocina: recrutamento de monócitos, neutrófilos e células T; diferenciação em Th2
Ppbp β -tromboglobulina	Ativação e recrutamento de neutrófilos;
NAP-2	Atividade fagocítica dos macrófagos
P-selectina	Adesão de leucócitos; ativação do complemento
CD40L	Superfamília TNF: ativação de células apresentadoras de antígeno; resposta de células B, ativação de células endoteliais.
TGF- β	Citocina: proliferação celular, diferenciação de células T; regulação fenotípica de células B e macrófagos.
PDGF	Fator de crescimento: crescimento e diferenciação celular; diferenciação monócito/macrófago
vWF	Adesão plaquetária; extravasamento de PMN
CD63	Tetraspanina: proteína adaptadora transmembrana; recrutamento de leucócitos
CXCL12	Quimiocina: quimiotaxia para células-T, monócitos e PMN
VEGF	Fator de crescimento: angiogênese; expressão de moléculas de adesão
Thrombospondina	Apoptose, inflamação por células endoteliais; formação de agregados macrófago-plaquetas
MIP-1 α	Citocina: ativação de neutrófilos e eosinófilos, produção de imunoglobulinas por células B
MMP-2, MMP-9	Protease: quebra de matriz extracelular; formação de agregados plaquetas-leucócitos
Ciclofilina A	Fator de crescimento de musculatura vascular lisa
Grânulos Densos	
Serotonina	Funcionamento de células T e células dendríticas
Glutamato	Tráfego de células-T
Polifosfatos	Amplificação da resposta inflamatória
ADP	Ativação de plaquetas, leucócitos e células endoteliais
Histamina	Aumento da reatividade e degranulação vascular
Expressão constitutiva ou produção	
IL-1 β	Citocina: resposta de fase aguda; ativação leucocitária e endotelial
Tromboxano	Eicosanoide: diferenciação de células T; ativação de monócitos
Oxido Nítrico	Espécie reativa de oxigênio: anti-inflamatório e anti-trombótico
GP1ba	Molécula de adesão: ligação de Mac-1 a leucócitos

PAF, fator de ativação plaquetária; CD40L, glicoproteína 39; TGF- β , fator de crescimento tumoral β ; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; vWF: fator de von Willebrand; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; MIP- 1 α , proteína inflamatória de macrófagos - 1 α ; MMP, metaloproteinase de matriz; ADP, adenosina difosfato; PMNs, células polimorfonucleares; GP, glicoproteína. Quadro modificado de Morrell e colaboradores 2014.

Além da secreção de mediadores, as plaquetas também expressam receptores com funções de defesa em suas superfícies, incluindo os receptores de Fc que reconhecem imunoglobulinas das classes IgG, IgE e IgA. Estes receptores podem conferir às plaquetas atividades antibacterianas rudimentares como secreção de peptídeos antimicrobianos e fagocitose frente à interação direta com bactérias, vírus, protozoários ou helmintos. Com a expressão destes receptores, as plaquetas podem contribuir para imunidade inata e adaptativa. Estes imunorreceptores parecem influenciar na atividade de adesão plaquetária com a modulação da produção de integrinas (Mathew e Rothman, 2008).

As plaquetas expressam seis diferentes integrinas, sendo que dessas, a que é expressa exclusivamente por plaquetas é a integrina CD41/CD61, que possui vários ligantes, dentre os quais fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, trombospondina-1 e vWF, sendo essencial para a adesão e agregação plaquetária (Plow et al., 2000).

Outro conjunto de receptores presentes nas plaquetas com ação imunológica é o de receptores Toll-like (TLRs). Dentre os receptores TLR-1 a 10 identificados em humanos, seis deles são expressos em plaquetas: TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-8 e TLR-9. Dentre as funcionalidades destes receptores nas plaquetas, tem-se, por exemplo, que TLR-4 é capaz de modular a plaquetopenia na sepse e induzir a produção de TNF- α *in vivo* (Aslam et al., 2006) e TLR-2 modula o processamento de RNA da IL-1 β , induzindo à produção de IFN do tipo 1 e de outras citocinas inflamatórias (Shashkin et al., 2008).

1.3.3 Interação com células imunes e endotélio

O conjunto de reações inflamatórias, homeostáticas, angiogênicas e coagulatórias são eventos multicelulares que incluem quimiotaxia, adesão, e as interações controladas entre leucócitos, células endoteliais e plaquetas na parede dos vasos sanguíneos. As plaquetas contribuem para essas interações através da secreção de

proteínas de adesão, estímulo de leucócitos aderidos e regulação de síntese de quimiocinas nos leucócitos e células endoteliais, podendo inclusive levar à formação de complexos plaquetas-neutrófilos e plaquetas-monócitos na corrente sanguínea, observada tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Ott et al., 1996; Furman et al., 1998).

Moléculas como IL-1, PAF e CD62P destacam-se como principais mediadores derivados de plaquetas, sendo capazes de ativar os leucócitos nestes complexos (Peters et al., 1999). Mediadores plasmáticos derivados de monócitos também estão envolvidos na interação destas células. Estudos demonstram que plaquetas ativadas induzem ao aumento da expressão de IL-10 e à diminuição de TNF- α por monócitos (Gudbrandsdottir et al., 2013).

2. Vírus Dengue

2.1 História e epidemiologia atual da dengue no Brasil

Dengue é uma das arboviroses de maior impacto na saúde pública mundial, ocorrendo de 50 a 100 milhões de infecções pelo DENV ao ano no mundo, com 2,5 bilhões de pessoas, 40% da população mundial, em áreas de risco de transmissão do vírus (Figura 7) (WHO, World Health Organization, 2009). Seu agente etiológico é o vírus dengue (DENV) que tem quatro sorotipos virais antigenicamente distintos (DENV 1-4). Infecções por qualquer um dos quatro sorotipos, que são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes* em um ciclo humano-mosquito-humano, confere imunidade de longa duração para aquele sorotipo especificamente. Os vírus da dengue compartilham 65%-75% de homologia em suas sequências de RNA. A imunidade cruzada entre sorotipos existe logo após a infecção primária, porém, após 6 meses o hospedeiro torna-se suscetível aos três demais sorotipos de DENV (Bhatt et al., 2013).

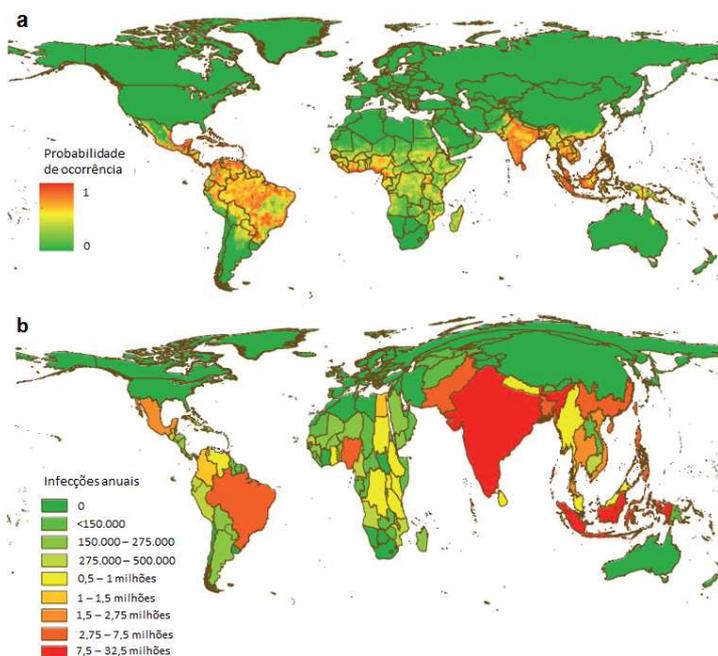


Figura 7. Mapas globais das áreas de risco e distribuição da dengue em 2010. Probabilidade da ocorrência de dengue com resolução espacial de 5 a 35km. Áreas com alta probabilidade de dengue estão em vermelho e aquelas com baixa probabilidade em verde (a). Cartograma dos números de infecções por DENV no ano de 2010 proporcionais às áreas geográficas nacionais e subnacionais (b). Modificada de Bhatt e colaboradores 2013.

Os primeiros relatos de uma doença com características similares à dengue foram documentados entre os anos de 1779 e 1788 (Gubler et al., 2006). No Brasil, a primeira epidemia de dengue aconteceu em 1981 no estado de Roraima, com isolamento dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (Osanai et al., 1983). Após um período sem relatos de surtos, em 1986 o DENV-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro (RJ), tornando-se um problema nacional de saúde pública em consequência da rápida disseminação do vírus em vários estados (Osanai et al., 1983). Em 1990, a situação se agravou com o aparecimento do DENV-2 também no RJ (Nogueira, et al., 1993), quando também foram registrados os primeiros casos fatais da dengue devido principalmente às infecções secundárias. Em 1994, DENV já circulava por várias regiões, ocasionando um aumento progressivo da incidência da doença no país (Siqueira et al., 2005). DENV-3 foi introduzido no Brasil em 2001 no RJ (Nogueira et al., 2001), resultando em uma epidemia com casos clínicos graves no verão de 2001 a 2002, com 1.831 casos de dengue hemorrágica (Nogueira et al., 2005). Até o final de 2006, 25 dos 27 estados brasileiros já haviam relatado epidemias de dengue em consequência da co-circulação de três sorotipos virais (Nogueira et al., 2007). DENV-4 já havia sido relatado na Amazônia, em 1982, e em Manaus, em 2008, em apenas três pacientes sem histórico de viagem recente (de Melo et al., 2009). Em 2010, DENV-4 reemergiu no país nos municípios de Boa Vista e Cantá, em Roraima, cocirculando com os sorotipos DENV-1 e DENV-2 (Temporão et al., 2011), porém somente em 2012 foi reportada a sequência completa do genoma de uma cepa de DENV-4 isolado em paciente infectado em Roraima em 2010 (Naveca et al., 2012). Em 2013, foram notificados 1.452.489 casos de dengue, com 36,7% de prevalência para o sorotipo DENV-1, 4,2% para DENV-2, 0,3% para DENV-3 e 58,9% para DENV-4. No estado do Rio de Janeiro houve 213.058 casos notificados, sendo 7,5% DENV-1, 0,5% DENV-3 e 92% de DENV-4 (Ministério da Saúde, 2013). Em 2014, foram notificados 511.080 casos de dengue no país até o mês de agosto, concentrados principalmente nos estados do Acre (321,2 casos/100 mil habitantes), Espírito Santo (418,7 casos/100 mil habitantes), São Paulo (487,3 casos/100 mil habitantes), Distrito Federal (406,2 casos/100 mil habitantes) , além do Goiás (1.255,1 casos/100 mil habitantes) de acordo com a Secretaria de Vigilância em

saúde do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2014) .No estado do Rio de Janeiro houve uma queda brusca no número de casos que foram de 1.283,4 casos/100 mil habitantes em 2013 para 38,3 casos/100 mil habitantes em 2014.

De forma interessante, no ano de 2007 foi registrado um caso de um paciente no sudeste asiático com um sorotipo viral novo desconhecido que foi chamado de DENV-5. Contudo, até o momento não foram registrados novos casos (Vasilakis, 2013).

2.2 Estrutura e proteínas virais

2.2.1 Estrutura viral

Como integrante da família Flaviviridae, o DENV é constituído por um envelope formado por uma bicamada lipídica derivada do retículo endoplasmático da célula hospedeira, no qual são inseridas as proteínas do envelope (E) e membrana (M). A partícula viral tem formato esférico e diâmetro de aproximadamente 50 nm. Abaixo do envelope viral há um nucleocapsídeo com diâmetro próximo de 30 nm, composto por um capsídeo viral icosaédrico, formado pela proteína do capsídeo (C) e complexado a uma molécula de RNA fita simples, com polaridade positiva (Figura 8) (Lindenbach e Rice, 2001; Kuhn *et al.*, 2002).

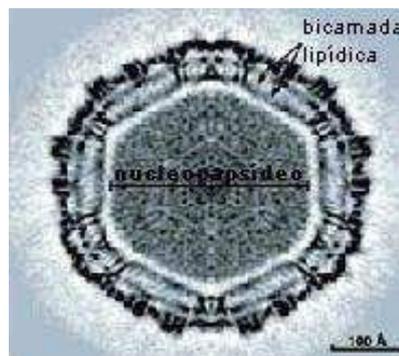


Figura 8: Partícula viral. Imagem de partícula viral madura do DENV obtida por criomicroscopia eletrônica (Purdue University. www.infection-research.de/.../cb5efb59a8.jpg, acessado em novembro de 2013).

O RNA viral tem aproximadamente 10,7 Kb e é modificado em sua extremidade 5' pela adição da estrutura *cap*, mas é destituído de cauda poli-A na extremidade 3' e apresenta uma única fase de leitura aberta que codifica uma poliproteína precursora das proteínas virais. Esta proteína precursora é clivada tanto por proteases celulares do hospedeiro quanto pela protease viral, gerando dez proteínas: as estruturais C, pré-Membrana (prM)/M, E e as não-estruturais 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B e 5 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, respectivamente) (Figura 9). As proteínas estruturais (C, M e E) traduzidas são incorporadas nas partículas virais durante sua maturação, enquanto as proteínas não-estruturais estão envolvidas na replicação e/ou montagem dos vírions. As regiões não-codificantes 3' e 5' também são importantes para a replicação viral (Chambers *et al.*, 1990; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2008).

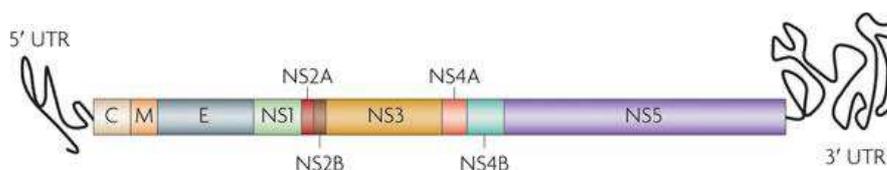


Figura 9. O genoma do DENV. O genoma viral codifica as proteínas estruturais C, M e E e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Extraído de Guzman e colaboradores, 2010.

A proteína C, altamente básica, possui cerca de 11 kDa e se associa ao RNA viral formando o nucleocapsídeo. Sua porção central contém domínios hidrofóbicos que interagem com membranas celulares, tendo um papel na montagem da partícula viral (Lindenbach & Rice, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

A glicoproteína prM, de aproximadamente 26 kDa, é gerada pela clivagem da sua região N-terminal no retículo endoplasmático durante o processamento da poliproteína viral. Aparentemente, essa proteína funciona impedindo que a proteína E sofra mudanças conformacionais durante o seu trânsito de compartimentos ácidos na fase de maturação do vírus. A porção N-terminal dessa proteína é clivada durante o

transporte pelo complexo de Golgi, originando a proteína M presente na partícula madura (Lindenbach & Rice, 2003; Stiasny e Heinz, 2006).

A proteína E, a maior proteína viral, é glicosilada e tem peso molecular de aproximadamente 53 KD. Alguns de seus epítopos induzem resposta imune humoral capazes de impedir a entrada do vírus na célula-alvo, promovendo a neutralização viral. O mecanismo de neutralização relaciona-se à dissociação do dímero E pela presença do anticorpo, impedindo as alterações conformacionais que levam à formação dos trímeros da molécula. Além disso, o domínio III da proteína E é responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira, de forma que, anticorpos produzidos contra este domínio obstruem o sítio de ligação viral ao receptor de membrana celular (Chambers, 1990).

A glicoproteína NS1 é essencial para a viabilidade do DENV, contudo, pouco é conhecido sobre o papel desta proteína. Possui aproximadamente 45-48 kDa e pode ser encontrada tanto no interior das células infectadas pelo vírus como associada à membrana destas células (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach & Rice, 2003). Além disso, também é secretada em grandes quantidades, sendo detectada no soro de pacientes na fase aguda da infecção (Young *et al.*, 2000). Alguns estudos sugerem que a NS1 está envolvida na replicação viral, provavelmente nos estágios iniciais da replicação do RNA viral (Mackenzie *et al.*, 1996; Muylaert, Galler & Rice, 1997; Lindenbach e Rice, 2003).

Durante a infecção viral, a NS1 é translocada pela via do retículo endoplasmático utilizando a sequência sinal localizada na região C-terminal da proteína E. Este peptídeo sinal é clivado por uma peptidase sinal da célula hospedeira, gerando a porção N-terminal da proteína NS1 (Falgout, Chanock e Lai, 1989; Lindenbach & Rice, 2003). A proteína NS1 é translocada pela via secretora e permanece ancorada a membrana plasmática da célula infectada ou é secretada para o meio extracelular na forma de hexâmeros (Winkler *et al.*, 1989; Flamand *et al.*, 1999). Alguns estudos sugerem que a associação da proteína NS1 à membrana da célula se dê provavelmente via sequência hidrofóbica que corresponde à porção C-terminal da proteína NS2A, que parece funcionar como sequência sinal para a ligação via âncora Glicosil-Fosfatidil-Inositol (GPI) (Pryor & Wright, 1993; Jacobs *et al.*, 2000).

Pouco é descrito sobre a atividade das pequenas proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A e NS4B. A proteína NS4A aparentemente funciona como âncora da replicase viral à membrana celular. A proteína NS4B parece auxiliar na modulação da replicação viral em associação à NS3. Além disso, essas proteínas poderiam também atuar na inibição da resposta de interferon- α/β em indivíduos infectados (Lindenbach & Rice, 2003; Miller, Sparacio & Bartenschlager 2006; Umareddy *et al.*, 2006).

A NS3 é uma proteína de aproximadamente 70 kDa, bastante conservada entre os flavivírus, que participa da replicação do DENV. Esta proteína apresenta múltiplas atividades enzimáticas, incluindo um domínio serino-protease localizado na região N-terminal, enquanto a sua porção C-terminal apresenta atividades de helicase, nucleosídeo 5' trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase 5' terminal (RTPase) (Valle & Fagout, 1998; Lindenbach & Rice, 2003; Xu *et al.*, 2005; Sampath *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2008). A função helicase não está completamente esclarecida, mas pode atuar dissociando a estrutura dupla-fita durante a replicação do RNA viral ou desdobrar estruturas secundárias envolvidas no início da síntese de RNA. Esta atividade é dependente de energia, que é fornecida pela atividade NTPase que hidrolisa ATP (Cui *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2005; Sampath *et al.*, 2006). A função RTPase é provavelmente necessária para a remoção do grupo fosfato 5'-terminal e formação da estrutura de *cap* do RNA viral (Murthy, Clum e Padmanbhan, 1999; Lindenbach & Rice, 2003; Sampath *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2008). Foi também observado em células infectadas por DENV-2 que a proteína NS3 sofre uma clivagem interna dentro da sequência da helicase, contudo, não se sabe a importância deste processamento para o ciclo viral (Arias, Preugschat & Strauss, 1993; Teo & Wright, 1997).

A proteína NS5 apresenta três atividades enzimáticas essenciais para replicação viral. Aproximadamente 320 resíduos da porção N-terminal compreendem uma metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina, que apresenta atividade de metiltransferase e guanililtransferase. Esse domínio da NS5 é responsável pelo *cap* e pela metilação da extremidade 5' do RNA viral. A região C terminal da NS5 é uma RNA polimerase dependente de RNA, que atua na síntese do RNA intermediário que serve

de molde para transcrição da fita positiva de RNA (Lindenbach & Rice, 2003; Zhou *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2008).

2.2.2 Replicação e interação do DENV com populações celulares

A infecção pelo DENV inicia-se com a picada do mosquito e liberação dos vírus juntamente com a secreção salivar do vetor. A partícula viral interage com a membrana plasmática da célula alvo e é internalizada (Lindenbach & Rice, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Este vírus tem como alvos primários células dendríticas (DC), monócitos e macrófagos (Chen, Maguire & Marks, 1996; Wu *et al.*, 2000; Clyde *et al.*, 2006; Kou *et al.*, 2008).

O DENV entra por endocitose mediada por clatrina na qual a proteína E ou glicoproteínas do DENV atuam como ligantes para diversos receptores celulares, como DC-SIGN/CD209 (dendritic cell ICAM-3 grabbing nonintegrin) presente em subpopulações de DC; LC-SIGN (liver/ lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) expresso em células endoteliais dos sinusóides do fígado, órgãos linfóides e capilares placentários; receptores de manose presentes em macrófagos; e proteoglicanos heparan sulfato (HSP) expressos nas células endoteliais, além do ICAM-3, CD14, HSP70/90, GRP78 e receptores de laminina (revisado por De La Guardia & Leonard, 2014).

Após endocitose e acidificação do endossoma, ocorre a modificação conformacional da proteína E de dímero para trímero, que levando à fusão com a membrana plasmática, liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula e a dissociação do capsídeo e do RNA viral (Qi *et al.*, 2008). Com a entrada e exposição do RNA, inicia-se a tradução da poliproteína viral precursora. Esta poliproteína viral é clivada por proteases celulares e pela protease viral NS3 associada a NS2B, gerando as proteínas virais. A seguir, fitas de RNA de polaridade negativa são transcritas, servindo de molde para a polimerização de novas fitas de RNA de polaridade positiva, utilizadas na tradução das proteínas e na montagem de novas partículas virais (Clyde

et al, 2006; Qi et al., 2008). A montagem ad partícula viral ocorre em associação às membranas celulares internas, dentro do lúmen do retículo endoplasmático. As proteínas do capsídeo interagem com o RNA viral no citoplasma formando o nucleocapsídeo, que adquire o envelope viral por brotamento para o lúmen do retículo endoplasmático. As partículas são transportadas pela via secretora para a membrana plasmática em vesículas e ,por fim, liberadas por exocitose. A clivagem da região N-terminal da glicoproteína prM, que ocorre no complexo de Golgi, resulta na formação da proteína M e no rearranjo da proteína E, levando à formação de partículas maduras (Figura10) que são liberadas pela célula (Lindenbach & Rice, 2003; Qi *et al.*, 2008).

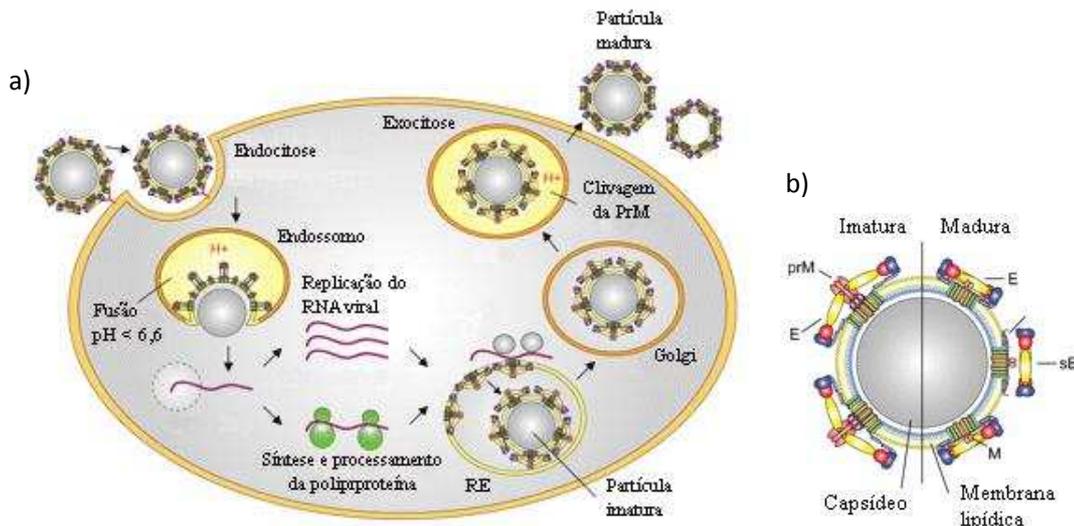


Figura 10: Representação esquemática do ciclo de replicação viral e da partícula do DENV. Em (a), a partícula viral infecta a célula, ocorre a replicação de seu material genético e a tradução da poliproteína precursora. A proteína do capsídeo interage com o RNA viral. O envelope é adquirido por brotamento para o lúmen do retículo endoplasmático. Por fim, há maturação no complexo de Golgi e exocitose das novas partículas virais infectantes. Em (b) observa-se diferenças estruturais nas partículas maduras e imaturas com a clivagem da glicoproteína prM, resultando na proteína M e no rearranjo da proteína E (Modificado de Stiasny & Heinz, 2006).

Estudos *in vitro* mostram que o DENV demonstrou ser capaz de infectar uma grande diversidade de células humanas, incluindo DC, monócitos / macrófagos, células B, células T, células endoteliais, hepatócitos, células neuronais, assim como linhagens

celulares cultiváveis utilizadas para a propagação viral (Anderson, R. 2003). Apesar da existência de um consenso geral de que as células mononucleares da linhagem fagocítica (monócitos, macrófagos e DCs) sejam os principais alvos *in vivo*, estudos de autópsia clínica levaram à emergência de controvérsias quanto aos principais tipos celulares alvo de DENV em seres humanos (Jessie, 2004). Estudos de tropismo celular *in vivo* tem incluído hepatócitos, linfócitos, células endoteliais e neuronais, células de Langerhans (DCs residentes na pele) e células B como células alvo importantes (Clyde, 2006). A replicação de DENV em plaquetas e megacariócitos ainda não está clara, contudo, estudos em plaquetas de pacientes infectados pelo DENV indicam a presença de RNA fita negativa e proteínas estruturais e não-estruturais do vírus, sugerindo fortemente que estas células também são alvos de replicação viral (Noisakran, 2009 a; Noisakran, 2009 b).

2.3 Manifestações e classificação clínicas

A dengue é, em geral, uma doença aguda, com amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde uma infecção clinicamente inaparente, uma doença febril aguda indiferenciada, a febre do dengue (FD) até as formas mais graves, a febre hemorrágica do dengue e síndrome do choque da dengue FHD/SCD. As formas mais graves da FHD foram previamente classificadas em uma escala de grau I-IV. Os primeiros sintomas da FD e FHD são indistinguíveis, mas FHD é associada às manifestações hemorrágicas, extravasamento de plasma resultante de um aumento da permeabilidade vascular e trombocitopenia (contagem abaixo de 150.000 plaquetas/mm³). A trombocitopenia não é necessariamente restrita às formas graves de dengue, uma vez que é possível observar pequenos sangramentos em infecções brandas. O extravasamento de plasma é caracterizado por hemoconcentração (aumento do hematócrito de 20%), desenvolvimento de ascite, derrame pleural, pericárdio e outros. A SCD é distinguida da FHD pela presença de comprometimento cardiovascular, o que ocorre quando a perda de plasma para os espaços intersticiais resulta em choque. Em geral, a SCD é uma doença grave, com taxas de mortalidade de até 20%, mas pode também ser inferior a 1% em locais com recursos suficientes e com profissionais de experiência

clínica. Sinais clínicos de alerta são comuns a SCD e incluem rápido aumento do hematócrito, dor abdominal intensa e vômitos persistentes (Gubler,2002; Bäck e Lundkvist, 2013). A doença sintomática segue tipicamente três fases: uma fase febril inicial com duração de 3 a 7 dias; uma fase crítica em torno da defervescência durante a qual complicações podem aparecer em alguns pacientes; e uma fase de recuperação espontânea (Simmons et al.,2012).

Uma categorização simplificada para a classificação da gravidade da dengue foi proposta pelo Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da OMS em 2009, no qual FHD e SCD foram agrupados como dengue grave para evitar um diagnóstico FHD/SCD falso-negativo (WHO, 2009). Essa classificação foi baseada em um estudo multicêntrico que trata a enfermidade como um evento dinâmico e sistêmico (figura 11). Uma das vantagens desta classificação sob a anterior, que levava em consideração os grupos FHD e SCD separadamente, foi a diminuição do número de casos sem classificação de 13,7% para 1,6% (Barniol et al., 2011), facilitando a abordagem dos casos e, conseqüentemente, o manejo clínico dos pacientes. Após confirmação laboratorial, a nova classificação descreve três conjuntos de sinais e sintomas clínicos: 1) Febre do dengue sem sinais de alarme (FD) caracterizada por: náusea, vômitos, erupções cutâneas, mialgia, cefaléia, artralgia, teste do torniquete positivo sem sinais de hemorragia e leucopenia; 2) Febre do dengue com sinais de alarme (FDSA) inclui: dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido, letargia, agitação, hepatomegalia (aumento > 2 cm), elevação das transaminases séricas e diminuição na contagem de plaquetas; e 3) Febre do Dengue Grave (Grave) caracterizada por: extravasamento plasmático grave, podendo levar ao choque e acúmulo de fluido, acompanhado de desconforto respiratório, hemorragias graves e comprometimento de órgãos como fígado, sistema nervoso central (com alteração da consciência), coração e outros órgãos. Essa nova classificação demonstrou ser mais sensível em relação à classificação clínica anterior quanto a identificação das formas graves, reduziu a proporção de pacientes anteriormente não passíveis de classificação, o que facilitou o manejo clínico dos pacientes (Barniol et al., 2011).

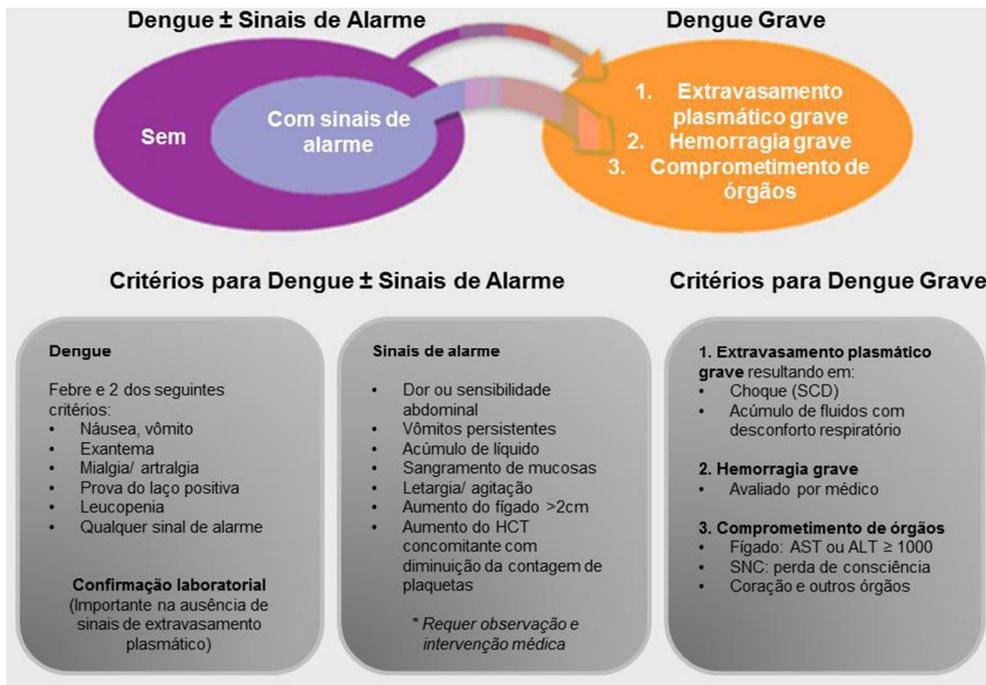


Figura 11. Classificação de dengue revisada em 2009 pela Organização Mundial de Saúde. Modificada de Barniol e colaboradores, 2011.

2.4 Principais mecanismos envolvidos na imunopatogênese da dengue

Considerando a variabilidade de manifestações clínicas apresentadas na dengue, diferentes fatores influenciariam a gravidade da doença (Srikiatkachorn & Green, 2010). Dentre esses fatores, aqueles associados ao vírus, visto que genótipos virais específicos (Cologna et al., 2005; Leitmeyer et al., 1999) e altos níveis de carga viral são associados à gravidade da doença (Libraty et al., 2002; Vaughn et al., 2000). Além disso, dados epidemiológicos indicam a participação de infecções sequenciais na gravidade (Halstead, 1988).

2.4.1 Resposta imunológica de reação-cruzada: Teoria da facilitação dependente de anticorpo e Teoria do pecado antigênico original

Na infecção humana pelo DENV, a resposta humoral é direcionada principalmente para as proteínas virais prM, E e NS1, enquanto que principalmente nos casos de infecção secundária observa-se resposta contra NS3 e NS5 (Valdés et al., 2000; Churdboonchart et al., 1991). Acredita-se que uma infecção primária seja capaz de criar proteção efetiva, duradoura, possivelmente ao longo da vida contra uma reinfeção pelo mesmo sorotipo, porém também há uma proteção cruzada de curto prazo contra os demais sorotipos (Rothman, 2004). A neutralização da infecção por anticorpos específicos pode ocorrer por inibição da entrada do vírus através de seus receptores específicos na superfície da célula-alvo (Nybakken et al., 2005) ou por inibição da fusão viral no citoplasma da célula-alvo (Vogt et al., 2009). Por outro lado, estudos epidemiológicos sugerem que a imunidade a um dos quatro sorotipos do DENV pode aumentar a gravidade da doença durante um desafio subsequente com um segundo sorotipo, levando em alguns casos à dengue grave, caracterizada por extravasamento plasmático e manifestações hemorrágicas (Halstead, 1970). Acredita-se que anticorpos de baixa capacidade neutralizante, de reação cruzada, produzidos em resposta a um sorotipo anterior contribuam para a patogênese da dengue grave ao promover a entrada do vírus através de receptores Fcγ (FcγR), particularmente o FcγRII e infecção de células mielóides (Halstead, 2003), gerando uma Imunoamplificação da infecção dependente de anticorpo (ADE).

A ADE ocorre quando a endocitose do complexo vírus-anticorpo anti-DENV é mais eficiente do que a entrada de partículas virais livres nas células-alvo. Em geral, a ADE é mediada por anticorpos específicos contra a proteína E em condições de baixa concentração ou baixa avidéz de anticorpos, tornando o número de anticorpos ligados ao vírus abaixo do limite necessário para sua neutralização (Pierson et al., 2007). Esse processo aumenta potencialmente o risco de desenvolvimento de formas graves na dengue em virtude do aumento de células infectadas e conseqüentemente, da carga viral (Halstead, 2003; Mathew & Rothman 2008; Guzman et al., 1990). Anticorpos anti-prM parecem também participar da ADE em decorrência da clivagem parcial da

proteína prM na superfície do DENV durante o processo de maturação, em vista da redução da densidade de antígenos virais disponíveis para neutralização (Dejnirattisai et al., 2010; Rodenhuis-Zybert et al., 2010). A ADE pode ocorrer durante infecção primária em crianças de 4 a 12 meses de idade nascidas de mães imunes a dengue, uma vez que mesmo após o desaparecimento de anticorpos neutralizantes maternos após 3 meses de idade, os anticorpos não neutralizantes continuam presentes (Kliks et al., 1988; Libraty et al., 2009).

Além da resposta humoral, tem sido demonstrada uma ativação exagerada de células T de memória de reatividade cruzada com consequente liberação de mediadores biológicos pelos linfócitos T e pelas células infectadas pelo vírus, hipótese definida pelo “Pecado Antigênico Original”. Com base na hipótese do “Pecado Antigênico Original” a infecção secundária por um sorotipo distinto da infecção atual resultaria na expansão de células T de memória pré-existentes, com baixa avidéz e de reatividade-cruzada para o sorotipo infectante. Assim, observa-se uma diminuição da eficácia do sistema imune em desenvolver uma resposta imune celular específica para o sorotipo infectante (Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Mongkolsapaya *et al.*, 2006). Além disso, os linfócitos T de memória cruzada exibem baixa capacidade de degranulação, mas uma aumentada capacidade de produzir citocinas como TNF- α e IFN- γ , levando a um prejuízo no “clearance” viral. No entanto, uma produção exacerbada desses mediadores pró-inflamatórios estaria relacionada às alterações características das células endoteliais, levando ao aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático (Srikiatkachorn & Kelley, 2014; Remy, 2014).

2.4.2 Mimetismo molecular

Autoimunidade e mimetismo molecular representam outros mecanismos importantes na patogênese da dengue. Estudos demonstraram que a infecção pelo DENV leva à produção de autoanticorpos contra as plaquetas (Lin et al., 2001; Saito et al., 2004), células endoteliais (Falconar, 1997; Lin et al., 2003) e moléculas envolvidas na coagulação (Falconar, 1997; Falconar, 2007). Determinadas proteínas de superfície

celular em plaquetas, células endoteliais e moléculas envolvidas na coagulação parecem apresentar mimetismo molecular com as proteínas NS1, prM e E do DENV, respectivamente, podendo explicar a reatividade cruzada dos anticorpos anti-NS1, anti-prM e anti-E com proteínas do hospedeiro. Como resultado, ocorrem disfunção plaquetária, apoptose de células endoteliais, desregulação da rede de coagulação e ativação de macrófagos (Lin et al., 2011; Wan, 2013).

Estudos demonstraram que os níveis séricos de auto anticorpos anti-plaquetários e anti-endoteliais são mais elevados em pacientes com FHD / SCD quando comparados aos pacientes com FD. A imunoglobulina M (IgM) presente no soro de pacientes com FHD apresentou uma maior reatividade cruzada com plaquetas e células endoteliais do que imunoglobulina G (IgG). Experimentos de absorção revelaram que anticorpos anti-NS1 são responsáveis pela reatividade cruzada, resultando em disfunção plaquetária e apoptose de células endoteliais (Lin et al., 2001; Lin et al, 2003; Lin et al, 2008). Estes resultados sugerem que anticorpos induzidos pela infecção com DENV devem estar associados a trombocitopenia e ao extravasamento de plasma. Análises proteômicas revelaram que potencialmente as proteínas endoteliais que seriam reconhecidas pelos anticorpos anti-NS1 seriam a cadeia- β da ATP sintase, vimentina, proteína de choque térmico 60 e proteína dissulfeto isomerase. Sabe-se que os aminoácidos (aa) C-terminais das regiões 311-352 da NS1 mostram homologia com a proteína dissulfureto isomerase e esta foi reconhecida pelos anticorpos anti- NS1 tanto em células endoteliais quanto em plaquetas (Cheng et al., 2009). Estudos demonstram que a região C-terminal da NS1 é responsável por reações cruzadas com as plaquetas. A supressão da região C-terminal da NS1 (aa 277-352) inibiu a agregação plaquetária e tendência a sangramento mediadas por anticorpos anti-NS1 (Cheng et al., 2009). Estes resultados sugerem um mecanismo de mimetismo molecular no qual anticorpos contra proteínas E e NS1 apresentam reação cruzada com os fatores de coagulação sanguínea humanos, fibrinogênio e plasminogênio (Falconar, 1997; Markoff et al., 1991; Chungue et al., 1994). O alinhamento de sequências realizado para as proteínas E, prM, e NS1 mostrou diferentes níveis de similaridade de sequência com moléculas associadas à coagulação como o fator X, fator XI e plasminogênio (Lin et al., 2011). Embora os efeitos desses autoanticorpos sobre os fatores de coagulação ainda não

estejam claros, alguns estudos demonstraram que autoanticorpos induzidos por DENV poderiam interferir na fibronólise humana (Huang et al., 1997; Chuang et al., 2011).

Foi demonstrado que os títulos de anticorpos induzidos por DENV atingiu níveis de pico na fase aguda, diminuindo durante a fase de convalescença e teve duração de meses (Lin et al., 2001; Lin et al., 2003). Um estudo de acompanhamento a longo prazo de pacientes infectados com DENV mostrou que estes pacientes apresentam persistência de sintomas clínicos com distúrbios em fatores do complemento, fatores reumatoides, proteína C reativa, anticorpos anti-nucleares e complexos imunes. Assim, a infecção por DENV parece levar a respostas imunes anormais, desencadeando reações autoimunes. Portanto, as complicações autoimunes devem ser consideradas no desenvolvimento de uma vacina segura contra a dengue (Wan 2013).

2.4.3 Produção exacerbada de citocinas

Sabe-se que diversas citocinas regulam a produção de outras citocinas que irão interagir de forma complexa, podendo promover uma exacerbção de seus níveis, regulação da produção de outros mediadores químicos, exercer efeitos antagônicos ou sinérgicos. As citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-1- β atuam de forma sinérgica na alteração da permeabilidade vascular na dengue. Diversos estudos têm demonstrado que altas concentrações de citocinas circulantes, liberadas principalmente por células T, monócitos, macrófagos e células endoteliais de pacientes infectados pelo DENV, estariam envolvidas na patogênese das formas graves da doença (Malavige & Ogg, 2012).

Inicialmente, mecanismos antivirais da resposta imune inata como aqueles mediados pelos interferons (IFNs), produzido principalmente pelas DCs, monócitos, macrófagos e células NK, estão envolvidos no controle inicial da infecção. A atividade antiviral dos IFNs do tipo I (IFN- α / β) é iniciada horas após a infecção e promove a inibição da replicação viral de células infectadas, ativação do estado antiviral por células não-infectadas e o estímulo da atividade antiviral das células NK e linfócitos T CD8+ (Samuel, 2001; Le Bon & Tough, 2002). Foi demonstrado que proteínas do DENV como a NS4B e NS5 inibem a sinalização do IFN- α / β (Jones et al., 2005; Ashour, 2009; Muñoz-Jordán, 2005). Contudo, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o DENV é

capaz de ativar a produção de IFN- α por células dendríticas plasmocitoides humanas (Gandini et al., 2013).

Estudos em pacientes DENV+ demonstraram que os níveis de IFN- α foram significativamente mais elevados em pacientes com FD quando comparados aos níveis de pacientes com FHD, independentemente do sorotipo testado (DENV-1 ou 2), e reduziram rapidamente 3 dias após o início da febre. Para infecções por DENV-2, foi encontrado um maior nível de IFN- α durante infecções primárias do que nas secundárias. Por tanto, estes dados sugerem que a resposta inicial com forte produção de IFN- α relaciona-se com um melhor desfecho clínico (De La Cruz Hernández et al., 2014).

O IFN do tipo II, IFN- γ , é uma citocina envolvida com o perfil de resposta Th1, produzido primariamente por linfócitos T, células NK e, em menor quantidade, por macrófagos. O IFN- γ , como os outros IFNs, possui efeito antiviral e promove o aumento da expressão de moléculas de HLA (antígenos leucocitários humanos) de classe I e II, estimula a apresentação antigênica e produção de citocinas pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) (Commins et al., 2010). Kurane e colaboradores relataram níveis mais elevados de IFN- γ no soro de pacientes com FHD e FD quando comparados aos níveis de indivíduos saudáveis, porém os níveis de IFN- γ ainda eram maiores após a defervescência nos pacientes com FHD. Segundo os autores, esses resultados sugerem que IFN- γ desempenharia um papel importante no controle da infecção, contudo níveis elevados desta citocina após a defervescência, juntamente com maior ativação de células T, contribuiria para a patogênese da FHD (Kurane et al., 1991). Ainda, Priyadarshini e colaboradores demonstraram correlação direta entre os níveis de IFN- γ e alanina aminotransferase (ALT), confirmando a hipótese da contribuição das citocinas na imunopatogênese da dengue (Priyadarshini et al., 2010).

Outra citocina que parece desempenhar papel importante na dengue é o TNF- α , que é produzido por fagócitos mononucleares, neutrófilos, linfócitos e células NK. A interação do TNF- α e células endoteliais promove indução de moléculas de adesão, como ICAM-1 (Molécula de Adesão Intracelular-1), VCAM-1 (Molécula de Adesão de Células Vasculares-1) e E-selectina. O TNF- α também está envolvido no dano vascular, no choque séptico e na imunidade antitumoral (Commins et al., 2010). Na dengue, TNF-

α parece estar envolvido no dano vascular, como demonstrado por Dewi e colaboradores (2004), que observaram aumento na permeabilidade e alterações morfológicas em células endoteliais tratadas *in vitro* com TNF- α (Dewi et al., 2004)

Estudos têm demonstrado níveis plasmáticos elevados de outras citocinas na patogênese da dengue, como IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TGF- β (Azeredo et al., 2001; Bozza et al., 2008; Casadevall & Pirofski, 1999; Juffrie et al., 2001; Mustafa et al., 2001; Nguyen et al., 2004; Raghupathy et al., 1998; Restrepo et al., 2008; Suharti et al., 2002). Chaturvedi e colaboradores dosaram citocinas séricas de perfil Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) em pacientes infectados pelo DENV e observaram que pacientes com FD apresentaram níveis mais altos de IFN- γ e IL-2, enquanto a maioria dos pacientes com FHD apresentaram elevação nos níveis de IL-4, IL-6 e IL-10, no 4° e 8° dias de doença, coincidindo com a fase de defervescência (Chaturvedi et al., 2000). O pré-tratamento de monócitos/macrófagos com citocinas de perfil Th2 (IL-4 ou IL-13) aumentou a susceptibilidade destas células à infecção pelo DENV (Miller et al., 2008). Níveis plasmáticos de IL-10 foram correlacionados com a trombocitopenia em pacientes infectados pelo DENV (Azeredo et al., 2001; Libraty et al., 2002).

Recentemente, foram vistos níveis elevados de IL-6, receptor solúvel -1 de TNF (sTNFR1) e receptor solúvel -2 de TNF (sTNFR2) foram observados em pacientes com FDCSA e FDG e IL-12 e ligante indutor de apoptose relacionado à TNF (sTRAIL) em pacientes com FD. Níveis mais elevados de TNF- α e IL-17 em relação aos controles foram observados, porém, não associados à gravidade da doença. Foi observada também uma elevada produção de TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-17, sST2 (proteína 1 tipo receptor de IL-1 solúvel) e sTRAIL, além de apoptose em culturas monócitos / macrófagos infectados por DENV. Demonstrou-se, assim, que os biomarcadores benéficos ou deletérios podem estar presentes na dengue, independentemente da gravidade da doença e que os monócitos pode ser, em parte, a fonte de moléculas estudadas (Arias et al., 2014).

Além dos mecanismos descritos, outros poderiam contribuir para a imunopatogênese da dengue. Na figura 12 segue um breve resumo dos demais mecanismos imunopatogênicos na dengue.

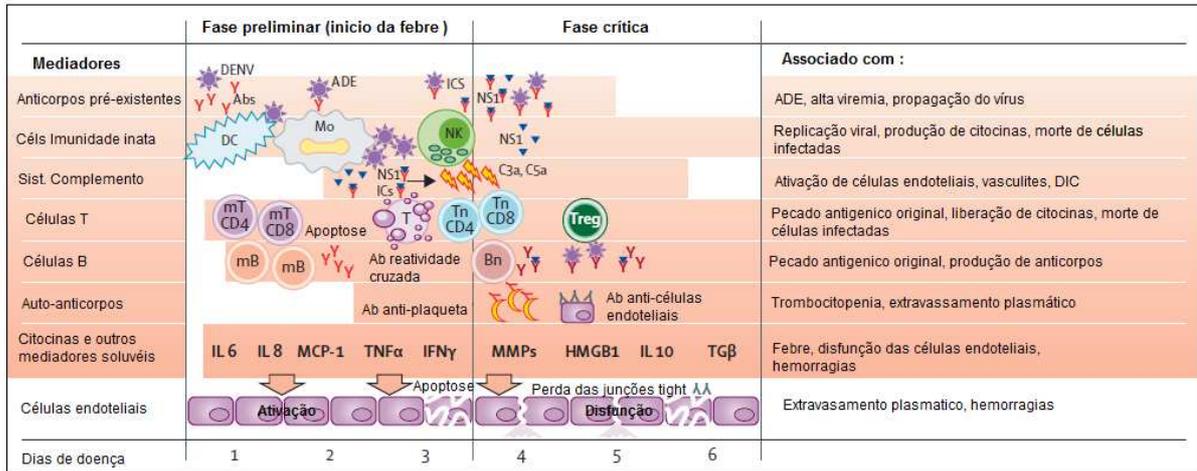


Figura 12: Patogênese da infecção pelo vírus da dengue nas diferentes fases da doença. Os possíveis mecanismos incluem a presença de anticorpos pré-existent que possam mediar ADE, infecção e ativação da imunidade celular inata, ativação do sistema de complemento, células T e células B e a produção de autoanticorpos. Citocinas e mediadores solúveis, liberados por diferentes células como resultado da ativação imune, desempenham um papel importante na patogênese da doença, mediando extravasamento de plasma. O aumento da ativação imune está associado à gravidade da dengue. Os níveis aumentados de algumas citocinas pró-inflamatórias que agem sobre o endotélio vascular não necessariamente coincidem cronologicamente com o extravasamento de plasma, já que moléculas ativadoras da imunidade precedem a fase de defervescência e extravasamento de plasma. Abreviaturas: DENV (vírus da dengue), Abs (anticorpos), ADE (imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos), Ics (imunocomplexos), DC (células dendríticas) Mo (monócitos / macrófagos), mT (células T de memória), Tn (células T virgens), Treg (células T reguladoras), MB (células B de memória), Bn (células B virgens), DIC (coagulação intravascular disseminada). Figura modificada de Guzman e Harris, 2014.

3. Plaquetas na dengue

Em 1964, Nelson e Bierman questionaram se a dengue é uma doença trombocitopênica ou não (Nelson e Bierman, 1964). De fato, nas últimas orientações da OMS de 2009, o rápido declínio na contagem de plaquetas ou a contagem de plaquetas abaixo de 150 mil por microlitro de sangue tem sido considerado como um dos critérios indicadores de gravidade na dengue (WHO, 2002; Jayashree et al.; 2011, WHO, 2009). Além da contagem de plaquetas, a perturbação funcional destas células associada à desregulação significativa do sistema quinina do plasma estão associados com a imunopatogênese da dengue. A observação cinética do número de plaquetas em pacientes DENV+ mostrou que ocorre diminuição significativa no 4º dia da doença. Estudos anteriores, de fato, mostraram uma diminuição leve a moderada no 3º dia até 7º dia de evolução da doença, atingindo níveis normais no 8º ou 9º dia (Mitrakul, 1987; Srichaikul e Nimmannitya, 2000).

Foi demonstrado que a contagem de plaquetas menor ou igual a $50.000/\text{mm}^3$ e hematócrito menor que 50% estão significativamente associados com a presença de manifestações hemorrágicas. No entanto, um estudo que incluiu 245 pacientes com dengue não mostrou relação entre a ocorrência de sangramentos e contagem de plaquetas, enquanto que 81 pacientes não-hemorrágicos apresentaram contagem menor que $20.000/\text{mm}^3$ (Chaudhary et al., 2006). Em contraste, outro estudo que incluiu 225 pacientes com dengue sugeriu que o sangramento ocorreu mais frequentemente em pacientes com contagem de plaquetas abaixo de $20.000/\text{mm}^3$ (Makroo et al., 2007).

A maioria das diretrizes clínicas recomenda que sejam feitas transfusões de plaquetas em pacientes que desenvolvem manifestações hemorrágicas graves ou com contagem de plaquetas muito baixas - a contagem de plaquetas alcançam valores abaixo de $10-20.000/\text{mm}^3$ sem hemorragia ou $50.000/\text{mm}^3$ com sangramento ou hemorragia. Contudo, estudos mais recentes confirmam que a transfusão de plaquetas não impede o desenvolvimento de hemorragia grave nem encurta o tempo de

coagulação, além de apresentar associação com efeitos colaterais significativos (Kahn & Leissinger, 2013).

3.1 Principais mecanismos envolvidos na plaquetopenia

O DENV pode ser detectado em vários tipos celulares como leucócitos polimorfonucleares, monócitos/macrófagos, DC, dentre outros. Além disso, estudos vêm destacando os megacariócitos e as plaquetas como importantes células-alvo do DENV. A detecção de antígenos virais na superfície das plaquetas (Boonpucknavig et al., 1979), imunocomplexos contendo plaquetas em biópsias de pele de pacientes infectados pelo DENV (Saito et al., 2004), associação entre DENV e plaquetas *in vitro* (Oishi et al., 2007) e detecção do RNA viral de DENV em plaquetas de pacientes infectados e em megacariócitos de macacos rhesus infectados experimentalmente pelo DENV (Noisakran et al, 2009b; Noisakran et al, 2012) sugerem fortemente que o DENV pode induzir trombocitopenia via interação direta com os megacariócitos e com as plaquetas. O DENV também demonstrou reduzir o número de plaquetas circulantes independente de fixação ou entrada do vírus em plaquetas ou seus precursores. Assim, a supressão da medula óssea e a destruição periférica de plaquetas podem ser consideradas como dois dos principais mecanismos envolvidos na trombocitopenia na dengue (Hottz et al, 2011).

Na hipótese envolvendo a medula óssea, trabalhos anteriores demonstraram que nas fases iniciais da doença a medula óssea apresenta hipocelularidade e inibição da maturação dos megacariócitos (Kho et al., 1972; Srichaikul & Nimmannitya, 2000). Três principais mecanismos parecem estar envolvidos, embora sejam parcialmente esclarecidos, como lesão direta das células progenitoras pelo DENV-2, células estromais infectadas e modificação da regulação da medula óssea (Srichaikul, 1987).

Com relação à destruição periférica de plaquetas, estas poderiam ser destruídas tanto pela interação direta e replicação do DENV, quanto pela interação indireta, com a infecção levando à formação de agregados celulares entre plaquetas-células

endoteliais e plaquetas-leucócitos, produção de autoanticorpos anti-plaquetários e produção de fatores solúveis prejudiciais para plaquetas (Hottz, 2011) (figura 13).

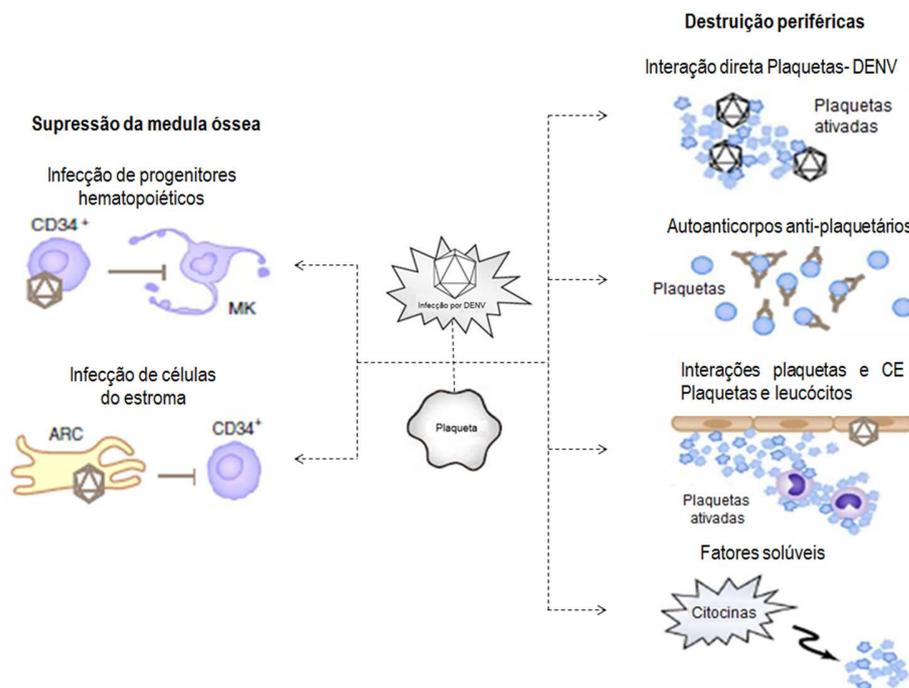


Figura 13. Esquema de supressão da medula óssea e destruição de plaquetas periféricas observadas na dengue. Representação esquemática de dois principais mecanismos envolvidos na trombocitopenia associada a dengue: supressão da medula óssea e destruição de plaquetas periféricas. Legenda: ARC, Células reticulares adventícias; MK, megacariócitos e CE, células endoteliais. Modificado de Hottz et al., 2011.

3.1.1 Supressão da medula óssea

O DENV tem como um dos principais sintomas as fortes dores articulares e ósseas. Estas características remetem ao papel fundamental direto ou indireto da medula óssea na patogênese da dengue (Noisakran, 2012). Uma investigação sobre a celularidade da medula óssea em pacientes infectados pelo DENV demonstrou que a supressão medular é um fenômeno comum nestes pacientes (Bierman & Nelson, 1965). Cinco anos mais tarde, realizou-se o isolamento de DENV por inoculação intracerebral em camundongos a partir de autópsias de pacientes que foram ao óbito por SCD e punções medulares de pacientes que sobreviveram à FHD (Nisalak et al., 1970). Estudos *in vitro* utilizando linhagens de células reticulares adventícias (ARC), células

que compõem o estroma da medula óssea, incubadas com o DENV, detectaram por imunofluorescência que antígenos de DENV são encontrados em seu interior, especificamente na região perinuclear (Figura 14) (La Russa e Innis, 1995).

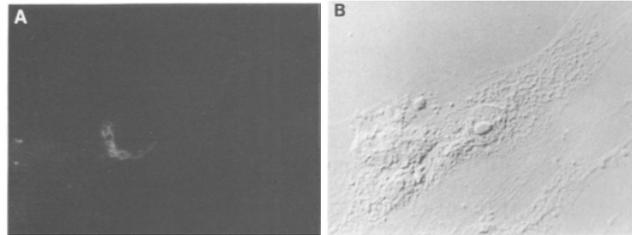


Figura 14. Células reticulares adventícias (ARC) em uma cultura de células do estroma inoculadas com DENV. Em (A) células marcadas por imunofluorescência para revelar antígenos de DENV, mostrando a presença de DENV em região perinuclear. Em (B), o mesmo campo ótico da figura A, visualizado em contraste de fase. Barra de 14 μm . Modificada de La Russa e Innis (1995).

Estas interações podem mudar o perfil de citocinas na medula óssea, levando à inibição do processo de diferenciação celular. Estudos *in vitro* demonstram que TGF- β inibe a diferenciação de células-tronco multipotentes em células precursoras de megacariócitos; TGF- β , TNF- α/β e IFN- γ inibem a diferenciação de células precursoras de megacariócitos para megacariócitos maduros e formação de pró-plaquetas (Klinger & Jelkmann, 2002; Badalucco, 2013) (figura 15).

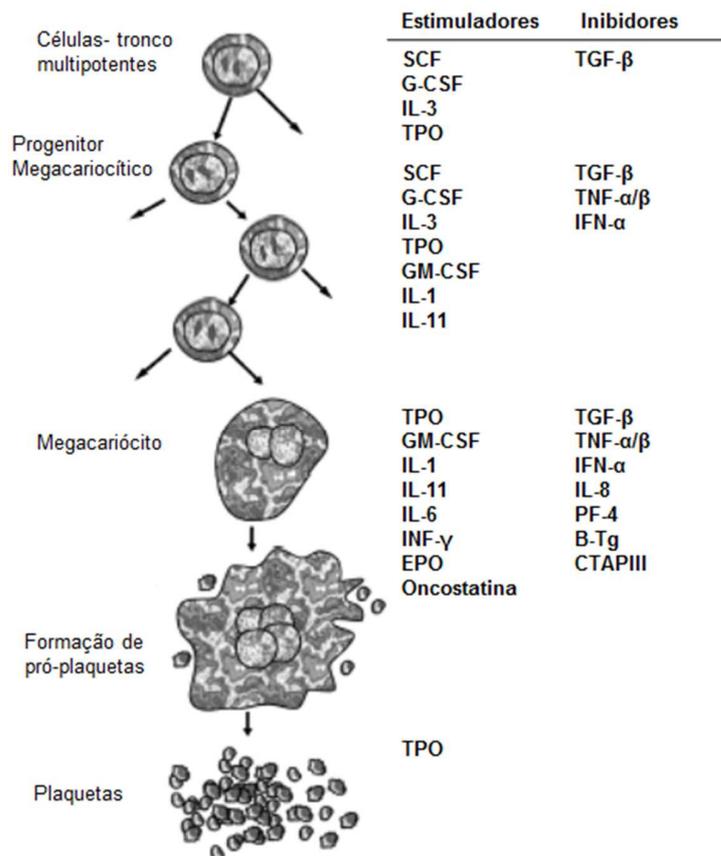


Figura 15. Inibidores e estimuladores das etapas da formação de plaquetas. Processos de diferenciação de células-tronco hematopoiéticas multipotentes (células que podem se diferenciar em muitos tipos celulares, mas não todos) para progenitores megacariocíticos; progenitores megacariocíticos para megacariócitos, megacariócitos para pró-plaquetas e pró-plaquetas para plaquetas e seus respectivos inibidores e estimuladores. Abreviaturas: SCF, fator de células estaminais (células multipotentes da medula óssea de adultos); IL, interleucinas; G-CSF, fator estimulante de colônias de granulócitos; TPO, trombopoietina; GM-CSF, fator estimulante de colônias granulócito-monócitos; EPO, eritropoietina; TNF- α , fator de necrose tumoral- α ; LIF, fator inibidor de leucemia; TGF, fator de crescimento transformador; PF-4, fator plaquetário 4; Tg, tromboglobulina; CTAP, peptídeo de ativação do tecido conectivo. Modificado Klinger & Jelkmann, 2002.

Corroborando os dados obtidos em humanos, a detecção de quantidade expressiva de RNA do DENV em megacariócitos (Figura 16) de primatas não-humanos infectados pelo DENV-2 por Noisakran e colaboradores, sugere que a infecção da medula óssea pode ser um fator que contribui para a plaquetopenia (Noisakran, 2012).

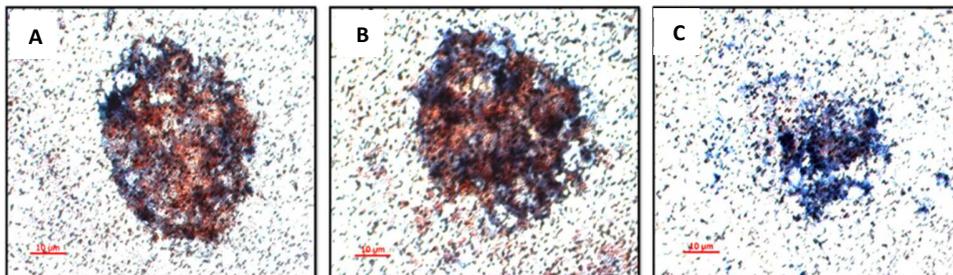


Figura 16. Células de aspirado de medula óssea coletadas de macacos rhesus submetidas à imuno-histoquímica com dupla marcação. Em (A) e (B) marcação com anticorpos anti-E de DENV (vermelho) e anticorpos anti-CD41a, marcador para linhagem megacariocítica (azul). Em (C) temos a marcação controle com isotipo controle IgG2a. Modificada de Noisakran e colaboradores (2012).

A Trombopoetina (TPO) é uma citocina que regula a megacariocitopoiese e a produção de plaquetas especificamente através da ativação de c-MPL (oncogene do vírus da leucemia mieloproliferativa), o receptor de TPO (de Sauvage et al., 1994; Gurney et al., 1994). Os níveis de TPO aumentam quando há queda na contagem de plaquetas, por isso os níveis séricos de TPO podem ser um indicador útil da megacariocitopoiese na dengue (Putintseva et al., 1985). De fato, Matondang e Colls, em 2004, mostraram que os níveis de TPO foram significativamente aumentados em pacientes adultos trombocitopênicos infectados pelo DENV, além de apresentar correlação inversa com as contagens de plaquetas (Matondang e Colls, 2004).

3.1.2 Destruição periférica de plaquetas

3.1.2.1 Replicação do DENV em plaquetas?

Na infecção pelo DENV, a detecção de antígenos virais na superfície das plaquetas bem como em plaquetas contendo imunocomplexos a partir de amostras de biópsia da pele têm sido bem documentada (Boonpucknavig et al, 1979; Oishi et al, 2007;. Saito et al, 2004).

As plaquetas contém receptores relacionados à entrada do DENV, como DC-SIGN na sua superfície (Michelson, 2007). Estudos já demonstram in vitro que a infecção

por DENV induz à ativação, disfunção mitocondrial e apoptose plaquetária através de mecanismos dependentes do receptor DC-SIGN (Hottz et al., 2013b).

Noisakran e colaboradores (2009) detectaram RNA do DENV por RT-PCR convencional, tanto fita positiva como negativa, e partículas semelhantes ao DENV por microscopia eletrônica em plaquetas de pacientes (Noisakran, 2009A). No mesmo ano, utilizando população de plaquetas purificadas de pacientes, Noisakran e colaboradores (2009) confirmaram a presença de antígeno viral em plaquetas por imunofluorescência e microscopia confocal (Noisakran, 2009 B). Neste mesmo estudo, por microscopia eletrônica, os autores demonstraram que em plaquetas de pacientes DENV+, partículas semelhantes ao vírus estavam agrupadas, ou ocasionalmente como uma única partícula circundada por uma vesícula (figura 17).

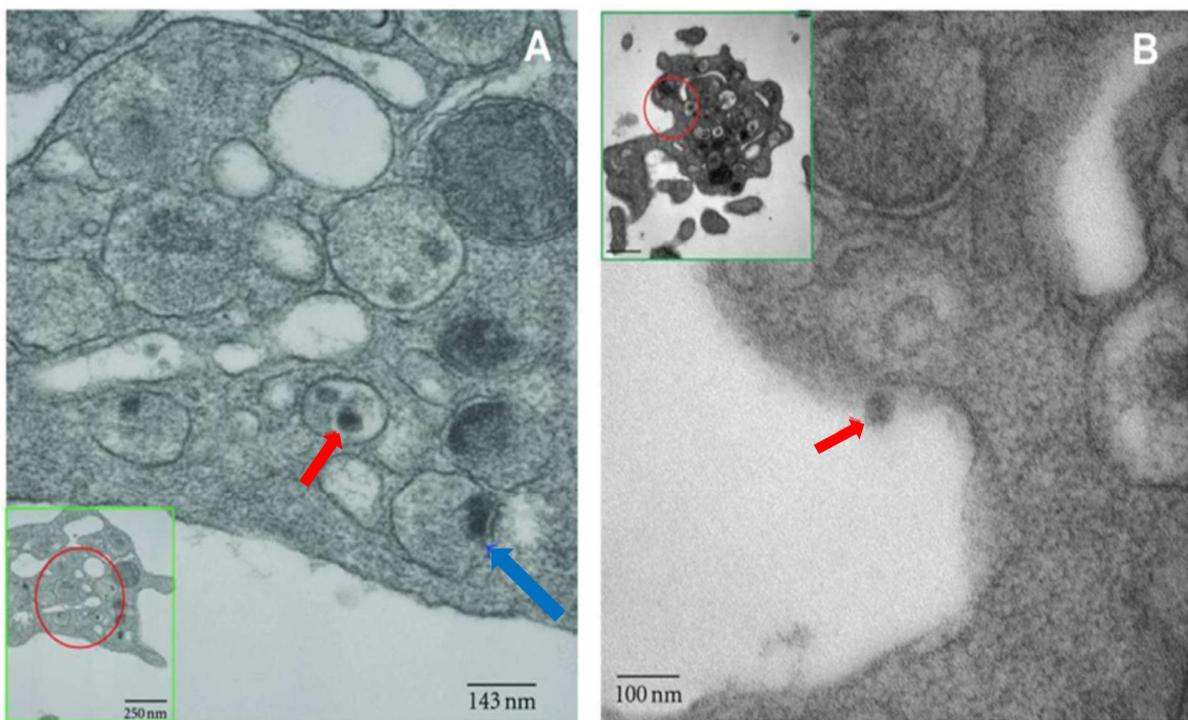


Figura 17. Partículas semelhantes ao DENV em plaquetas isoladas de paciente infectados pelo DENV. Microscopia eletrônica de transmissão de plaquetas isoladas de pacientes na fase aguda da infecção pelo DENV. (A) Partículas DENV-like no interior de vesículas (seta vermelha) e partícula aparentemente brotando de outra vesícula (seta azul). (B) Partícula DENV-like sendo secretada de uma plaqueta (seta vermelha). Figura extraída de Noisakran e colaboradores (2009b).

Ainda não está claro o envolvimento das plaquetas na disseminação da infecção viral. Dados recentes do nosso grupo do Laboratório e Imunologia Viral do IOC/FIOCRUZ confirmaram a capacidade de interação *in vitro* do DENV com plaquetas, com subseqüentes modificações morfológicas que são evidências de ativação plaquetária, tais como: presença de prolongamentos de membrana (filopódios), perda de conteúdo citoplasmático e dilatação do sistema de membranas (figura 18) (de Oliveira, 2012).

Diante da comprovada interação e muito provável replicação viral de DENV em plaquetas, estes dados reunidos indicam que a interação direta com o DENV possa constituir um dos principais mecanismos de trombocitopenia na dengue.

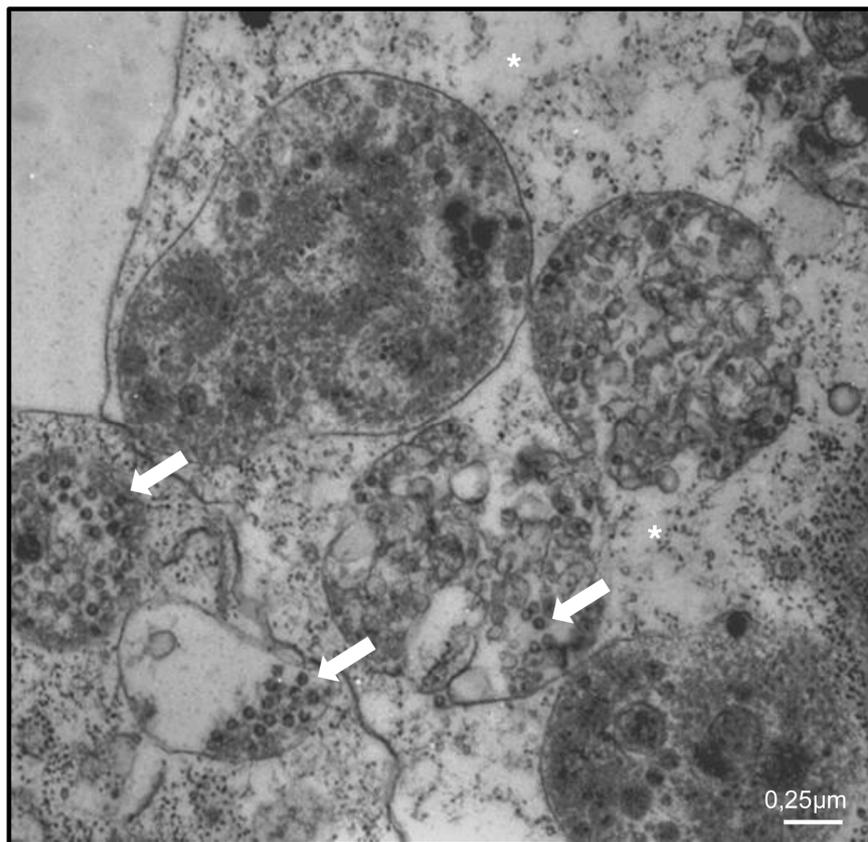


Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão de cultura de plaquetas em contato com DENV-2. Presença de partículas virais em vesículas citoplasmáticas (setas) e Perda de conteúdo citoplasmático (*). Barra= 0,25µm. Retirado de Oliveira, 2012.

Estudos utilizando células sanguíneas de pacientes DENV e de macacos do gênero *rhesus* experimentalmente infectados com DENV, revelaram que antígenos de DENV foram encontrados em pequenas vesículas de tamanhos variados, e mais frequentemente em células anucleadas associadas morfológicamente às plaquetas em pacientes com dengue. Foi detectado o RNA de DENV em uma população altamente enriquecida de células CD61(+) de *rhesus* durante a fase aguda da infecção. Estes resultados indicam que os vírus contidos em uma população rica em células CD61 (+) podem ser diretamente ligados à disfunção plaquetária e baixa contagem de plaquetas características de pacientes com dengue (Noisakran et al., 2012).

3.1.2.2 Mecanismos de destruição plaquetária induzidos pela infecção

Na infecção por DENV são produzidos autoanticorpos de reatividade cruzada aos antígenos próprios, incluindo anticorpos antiplaquetários. Neste contexto, anticorpos anti-NS1 de reação cruzada com plaquetas induzem tanto à lise quanto à inibição da agregação plaquetária (Wan et al., 2013). Estes anticorpos pertencem à classe IgM e tem potencial para a ativação da cascata do sistema complemento, levando à indução de lise celular (Lin et al., 2001).

Notavelmente, títulos séricos de IgM anti-plaquetários foram maiores em pacientes com FHD / SCD que naqueles com DF. Em conformidade com os títulos elevados de IgM, o soro de pacientes DHF / DSS causam níveis mais elevados de lise plaquetária do que soros de pacientes com DF. Têm sido também descritos auto-anticorpos contra as células endoteliais e moléculas relacionadas com a coagulação sanguínea (Lin et al., 2003). Na verdade, um mimetismo molecular entre as plaquetas, células endoteliais ou moléculas da coagulação sanguínea e NS1, prM e E pode explicar a reatividade cruzada de anti-NS1, anti-prM ou anticorpos anti-E entre proteínas do hospedeiro e proteínas que desempenham um papel na patogênese da doença. Anticorpos com reatividade cruzada podem causar disfunção plaquetária, danos às células endoteliais, deficiências de coagulação e ativação de macrófagos. Estes mecanismos juntos podem contribuir para algumas das características clínicas de DHF (Lin et al., 2011). Além

disso, reconheceu-se que as PDIs da superfície plaquetária são responsáveis por ativar integrinas e mediar a adesão, agregação e secreção de mediadores proteicos (Chen & Geng, 2006).

Diversos trabalhos vêm indicando que a infecção pelo DENV leva à ativação de células endoteliais, que aumentam a expressão em sua superfície da molécula E-selectina (CD62E). As CD62E, assim como a CD62P, são moléculas de adesão responsáveis pela adesão de plaquetas às células endoteliais (Dalrymple & Mackow, 2011; Soothiku et al., 2007; Krishnamurti et al., 2002; Ghosh et al., 2008). Além do endotélio, a CD62P é expressa na superfície de plaquetas ativadas, promovendo sua interação com leucócitos e formação de agregados entre plaquetas e monócitos e/ou neutrófilos em modelos primatas (Onlamoon et al., 2010). Agregados de plaquetas-monócitos também são observados em pacientes infectados pelo DENV, levando à síntese de IL-1 β , CXCL8/IL-8, CCL4/MCP-1 e IL-10 por parte dos monócitos (Hottz et al., 2014). A formação de agregados celulares resulta em aumento da resposta inflamatória na dengue, além de contribuir para a geração de trombocitopenia tanto pela retenção física das células, baixando o número de células circulantes, quanto pela indução de morte celular (Andrews, Arthur & Gardiner 2014).

Dentre os fatores solúveis que tem papel na destruição periférica de plaquetas estão o PAF (Souza et al, 2009), vWF (Basuki, 2003), TNF- α , IL-1 β (Bozza et al, 2008) e IL-10 (Azeredo et al, 2001).

Estudos têm demonstrado a ativação de plaquetas em pacientes infectados com dengue apresentando diferentes mecanismos de apoptose. Deste modo, foi visto que a apoptose e fagocitose plaquetárias, junto com os níveis séricos de TPO estavam significativamente aumentados em pacientes infectados pelo DENV durante as fases iniciais de convalescença aguda, quando comparados com os níveis observados em pacientes durante a fase de convalescença tardia e em voluntários saudáveis. Estes resultados sugerem que a queda acelerada no número de plaquetas no início da infecção pelo DENV é superada pela trombopoese induzida por TPO, cuja produção é reforçada nestes pacientes (Alonzo et al., 2012). Um outro estudo confirmou que as plaquetas de doentes infectados com DENV exibiram sinais clássicos da via intrínseca da apoptose que incluem o aumento da superfície de exposição de fosfatidilserina,

despolarização mitocondrial e ativação de caspase-9 e -3, o que pode contribuir para o desenvolvimento de trombocitopenia em pacientes com dengue (Hottz et al., 2013b).

3.2 Disfunção plaquetária na dengue

Um estudo documentou a presença de disfunção plaquetária em infecções pelo DENV. Neste contexto, foi demonstrado que a supressão da agregação plaquetária ocorre junto com o aumento da liberação de beta tromboglobulina (β TG) e PF4 durante a fase aguda da FHD (Srichaikul et al. , 1989). Trabalhos utilizando leucócitos mononucleares (MNLs) de doadores saudáveis expostos a DENV-1 e 2 mostraram, tanto em exposições primárias quanto em secundárias heterólogas para DENV-2, que os MNLs liberam quantidades significativamente maiores de PAF, TxB2 e PGD2 do que os que não são expostos aos vírus (Yang *et al.*, 1995). Com relação ao perfil morfológico e fisiológico das plaquetas expostas ao DENV-2, observou-se que há ativação das plaquetas com aumento da expressão de CD62P e de ligação ao fibrinogênio e alterações morfológicas relacionadas à ativação: alterações da arquitetura membranar, degranulação, presença de filopódios e dilatação do sistema canalicular aberto em plaquetas expostas ao DENV-2 (Ghosh et al., 2008). O óxido nítrico (NO) é um importante regulador da função das plaquetas, inibindo a agregação, recrutamento e aderência ao endotélio vascular. Nesta linha, um estudo mostrou que taxas elevadas de transportadores da L-arginina em pacientes infectados com o DENV foram associados com a atividade da NO sintetase e aumento dos níveis de fibrinogênio plasmático, sugerindo que a dengue está associada ao aumento nos níveis do transporte de L-arginina, geração de NO e redução de agregação plaquetária (Mendes-Ribeiro et al., 2008).

Além de seu papel efetor direto, a influência das plaquetas sobre a produção de citocinas por células mononucleares humanas normais também é alvo de investigações. Estudos sugerem que as plaquetas ativadas têm propriedades anti-inflamatórias relacionadas à interação entre CD40 e CD40L, aumentando a produção de IL-10 e inibindo a produção de TNF- α por monócitos (Gudbrandsdottir, Hasselbalch

& Nielsen 2013). Os autores também verificaram que a interação dos monócitos com plaquetas apoptóticas medeia a secreção de IL-10 através do reconhecimento da fosfatidilserina plaquetária exposta em agregados de plaquetas e monócitos. Além disso, a secreção IL-10 necessita do contato plaquetas-monócitos mas não de fagocitose, demonstrando que plaquetas ativadas e apoptóticas se agregam aos monócitos durante a infecção e sinalizam respostas de citocinas específicas que podem contribuir para a patogênese da dengue (Hottz et al., 2014). Corroborando estas hipóteses, estudos em pacientes brasileiros infectados pelo DENV demonstraram que o aumento dos níveis séricos de TNF- α tem relação com as manifestações hemorrágicas, enquanto o aumento dos níveis séricos de IL-10 correlaciona-se com baixa contagem de plaquetas (Azeredo et al., 2001).

É interessante observar que muitos investigadores confirmaram a expressão de TLR1-9 tanto em plaquetas humanas quanto murinas. Os TLRs são uma família de receptores de reconhecimento de padrões que é expressa pelos fagócitos profissionais, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, e promovem a ativação imune em resposta a motivos moleculares conservados expressos por patógenos (Janeway & Medzhitov, 2002). Alguns TLRs expressos em plaquetas são funcionais e podem modular a produção de TNF e trombocitopenia induzida por septicemia *in vivo* (Andonegui et al, 2005; Aslam et al, 2006; Cognasse et al, 2005; Patrignani et al, 2006; Semple et al., 2007). Recentemente, foi descrita também a presença do inflamossomo NLRP3 associada com a ativação de caspase-1 e a síntese de IL-1 β em plaquetas ativadas após infecção pelo DENV, com aumento do acúmulo de IL-1 β em plaquetas e micropartículas derivadas de plaquetas de pacientes com dengue (Hottz et al., 2013).

As plaquetas constituem a maior fonte de TGF- β 1 no corpo humano (Assoian et al., 1983). Um estudo demonstrou que os níveis circulante de TGF- β 1 são significativamente menores nos pacientes com FHD do que nos controles (Djamiatun et al., 2011). Os pacientes com trombocitopenia imune têm baixos níveis de TGF- β 1 em circulação. Contudo, após terapia para restaurar a contagem normal de plaquetas, seus níveis de TGF- β 1 voltam aos níveis encontrados nos controles saudáveis (Andersson, Olsson & Wadenvik. 2002).

3.3 Desregulação entre mecanismos pró- versus anti-coagulantes na dengue

Durante a infecção aguda pelo DENV a coagulação e a fibrinólise são ativadas, conduzindo à alterações de coagulação e de parâmetros fibrinolíticos que podem levar à coagulação intravascular disseminada (DIC) (Rothman & Ennis, 1999; Huang et al, 2001; Sosothikul et al., 2007; Wills et al., 2002; Wills et al., 2009a). DIC é uma desregulação grave aguda, subaguda ou crônica dos processos hemostáticos e fibrinolíticos que ocorrem como uma complicação em uma série de doenças, incluindo câncer, sepse e dengue (Rothman & Ennis, 1999).

Funahara e colaboradores descreveram que pacientes infectados com DENV e com DIC apresentam decréscimos de contagem de plaquetas, prolongamentos transitórios do tempo de tromboplastina parcial (TTP) e tempo de protrombina (PT) e decréscimo dos níveis de fibrinogênio, atividade de protrombina, factor VIII, antitrombina III e plasminogênio (Funahara et al., 1987). A iniciação de DIC leva, portanto, à ativação plaquetária, formação de fibrina e deposição de pequenos coágulos na microcirculação, podendo, eventualmente, contribuir para a falência orgânica. Notavelmente, o consumo de fatores de coagulação geralmente leva à distúrbios hemorrágicos paradoxais devido ao consumo desses fatores hemostáticos (Bick, 2002; Petäjä., 2011). Posteriormente, foi demonstrado que a DIC aguda que ocorre em pacientes com FHD está associada ao aumento da permeabilidade vascular (Funahara et al., 1987). Assim, parâmetros como contagem de plaquetas, TTP e PT apresentam valor preditivo no diagnóstico de dengue grave (Liu et al., 2013).

Uma vez que a hemostasia depende de um equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise, Huang e colaboradores realizaram a avaliação de alguns parâmetros de coagulação (contagem de plaquetas e TTP), bem como parâmetros fibrinolíticos (tPA e PAI-1) em pacientes com FHD e FD. Pacientes com FD mostram trombocitopenia, prolongamento de TTP e aumento nos níveis de tPA, indicando a ativação da coagulação e fibrinólise. Contudo, os parâmetros utilizados indicaram ativação muito mais grave de coagulação e fibrinólise em pacientes com FHD. Na fase de

convalescença, ocorre então um aumento dos níveis de PAI-1 e da contagem de plaquetas com concomitante declínio do nível de tPA e normalização do TTP tanto em pacientes com FHD quanto com DF. Desta forma, segundo estes autores, a ativação da coagulação e fibrinólise durante a fase aguda da infecção pelo DENV é compensada pelo aumento de plaquetas e PAI-1 durante a fase de convalescença. Estes resultados sugerem que o grau de ativação da coagulação e fibrinólise induzida durante a infecção pelo DENV está associado com a gravidade da doença (Huang et al., 2001).

Os mecanismos que desencadeiam a DIC estão relacionados, principalmente, com lesões endoteliais e aumento dos níveis de TF circulantes (Mammen, 2000). Vários estudos sugerem que o aumento da expressão de TF tem um papel importante na patogênese da Dengue. Huerta-Zepeda e colaboradores mostraram que DENV regula os níveis de Receptor Ativado por Protease do tipo 1 (PAR-1) e TF no endotélio ativado (Huerta-Zepeda et al., 2008). Estes dados são reforçados por evidências de aumento dos níveis de TF em plasma de pacientes DENV e a expressão de TF em monócitos inversamente correlacionada com a contagem de plaquetas (Wills et al., 2002; de Azeredo et al., 2001). Ativação de PAR é acompanhada por regulação positiva de moléculas de adesão e produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α , IL-1 β e IL-6) (Levi, van der Poll, & Büller, 2004). As enzimas de coagulação geradas na infecção pelo DENV podem ativar os receptores PAR, amplificando assim o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a migração de leucócitos. Estas citocinas, em conjunto com as enzimas de coagulação (e vice-versa), perpetuam a resposta inflamatória, que promove o aumento da interação entre monócitos ativados, células endoteliais e plaquetas ativadas. O resultado é uma convergência de sinais que conduzem à expressão exacerbada de TF. Portanto, os processos de coagulação e inflamação estão intimamente relacionados e estabelecem uma relação bidirecional mediada pela ativação de PARs (Francischetti, 2008; Levi et al., 2004; Ramachandran & Hollenberg, 2008; Ruf, 2004)

3.5 Influência das plaquetas na alteração da permeabilidade endotelial

No ano de 1992, Butthep e colaboradores mostraram que plaquetas, assim como neutrófilos e linfócitos, se ligam preferencialmente às células endoteliais expostas ao DENV, em comparação com células de controle não expostas ao DENV. Foi sugerido que o aumento da ligação de plaquetas a células endoteliais pode contribuir para a trombocitopenia nos pacientes DENV (Butthep, Bunyaratvej & Bhamarapavati, 1992). A PDI, uma proteína do retículo endoplasmático, está localizada na superfície das plaquetas (Chen, Detwiler, & Essex, 1995) e está envolvida na regulação da agregação de plaquetas mediada por integrina, uma vez que anticorpos anti-PDI bloqueiam a adesão e agregação de plaquetas (Essex & Li, 1999). Estudos anteriores demonstraram que o PDI na superfície das plaquetas pode ser reconhecido pelos anticorpos anti- NS1 e, recentemente, Rachman e colaboradores observaram um perfil cinético semelhante entre anticorpos anti- NS1 e PDI (Rachman, Harahap & Widhyasih 2013). A atividade enzimática PDI e a agregação de plaquetas foram reduzidas com a ação do anti-NS1. Os resíduos de aminoácidos 311-330 (P311-330) de NS1 representam um epítipo que compartilha homologia de sequência com o domínio tiorredoxina de PDI (Cheng et al., 2009). Em contraste, apesar do soro de pacientes DENV inibir a agregação plaquetária, não existe uma correlação entre os anti- NS1 e PDI com a disfunção de agregação de plaquetas, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidas na inibição da agregação das plaquetas (Rachman, Harahap & Widhyasih 2013).

As plaquetas são responsáveis pela manutenção da integridade vascular devido à liberação constitutiva de citocinas pró-angiogênicas e fatores de crescimento. Moléculas derivadas dos grânulos- α , como angiopoetina-1, α e β -cateninas e PAF ligam-se aos receptores específicos na superfície das células endoteliais, provocando sinalizações intracelulares que estabilizam as junções aderentes intercelulares (Nachman e Rafii, 2008).

Angiopoetinas, reguladores-chave da integridade vascular, também são armazenadas nas plaquetas. A trombocitopenia associada à dengue e ativação endotelial está associada com um desequilíbrio na relação angiopoetina-2: angiopoetina-1 no plasma. Estudos demonstraram que há uma correlação inversa entre angiopoetina-1 e marcadores de extravasamento de plasma e uma correlação direta entre angiopoetina-2 e marcadores de extravasamento de plasma em pacientes com FHD/SCD (Michels et al., 2012). Hotzz e colaboradores demonstraram que pacientes infectados pelo DENV que apresentaram sinais de aumento da permeabilidade vascular demonstram uma maior percentagem de plaquetas e micropartículas derivadas de plaquetas (MPs) expressando IL-1 β e ativador de caspase-1, em comparação aos pacientes que não tinham evidência de alteração da permeabilidade vascular. Estes resultados foram confirmados em experimentos nos quais MPs derivadas de plaquetas expostas ao DENV causaram um aumento da permeabilidade das células endoteliais que foi bloqueado por IL-1Ra (Hotzz et al., 2013).

4. Justificativa

Plaquetas são fragmentos celulares derivados de precursores hematopoéticos megacariócitos, primariamente associadas à coagulação e à hemostasia, contudo, vem-se atribuindo as plaquetas outros efeitos biológicos, incluindo: participação na inflamação, resposta imune, angiogênese e síntese de matriz extracelular (Shi & Morrel, 2011). Por serem os primeiros componentes celulares a se acumularem em sítios onde há dano da parede vascular, as plaquetas iniciam rapidamente eventos como agregação, exocitose de constituintes dos grânulos, expressão de proteínas de adesão, secreção de citocinas e mediadores e interação direta com as células endoteliais e do sistema imunológico (Weyrich & Zimmerman, 2004). Ainda, são células capazes de realizar síntese protéica *de novo*, através de seu repertório pós-transcricional complexo para a tradução pós-ativação, corroborando a existência de funções biológicas potenciais dessas células (Weyrich et al., 2009). Na dengue, plaquetas constituem uma das principais populações celulares afetadas por mecanismos diretos e/ou indiretos da infecção (Boonpucknavig et al., 1979; Oishi et al., 2007) . De fato, plaquetopenia e disfunção plaquetária são manifestações comuns, tanto em casos brandos como nos graves de infecção pelo DENV, e estão fortemente relacionadas ao desfecho clínico do paciente. A presença de altas concentrações sanguíneas de mediadores inflamatórios em pacientes infectados pelo DENV, além do potencial de produção de outros mediadores pelas próprias plaquetas, nos impulsiona a entender qual seria a implicação destes na plaquetopenia e, de forma bastante importante, na funcionalidade das plaquetas durante o curso da infecção, constituindo, portanto, objeto principal deste estudo.

5. Objetivos

5.1. Objetivo geral

Investigar o perfil de citocinas, quimiocina e fatores de crescimento séricos e de proteínas intraplaquetárias relacionadas à angiogênese, coagulação, regulação da matriz extracelular e inflamação na plaquetopenia de pacientes infectados pelo DENV.

5.2. Objetivos específicos

A) Quantificar níveis séricos das citocinas IL-10, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , da quimiocina CXCL8/IL-8 e fatores de crescimento PDGF e VEGF em pacientes infectados pelo DENV e compará-los aos dos controles;

B) Correlacionar os níveis séricos dos mediadores circulantes às contagens de plaquetas e células mononucleares do sangue e relacionar ao quadro clínico de pacientes infectados pelo DENV;

C) Quantificar proteínas intraplaquetárias relacionadas à angiogênese, coagulação, regulação da matriz extracelular e inflamação de pacientes infectados pelo DENV e controles;

D) Correlacionar níveis de proteínas intraplaquetárias às contagens de plaquetas e relacionar ao quadro clínico de pacientes infectados pelo DENV.

6. Materiais em Métodos

6.1 Amostragem populacional

Entre fevereiro de 2013 e abril de 2013 foram coletadas 66 amostras de sangue total de pacientes clinicamente suspeitos de infecção pelo DENV atendidos na emergência do Hospital Rio-Laranjeiras, Rio de Janeiro, tendo como único critério de exclusão a não aceitação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nenhum dos casos precisou de internação. Todos os pacientes foram atendidos pelos médicos Mauro Sérgio Barbosa e Paulo Vieira Damasco. Após confirmação do diagnóstico, os pacientes foram classificados quanto à gravidade clínica de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis (TDR) da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2009).

Dez indivíduos controles sadios para a dengue da mesma faixa etária, moradores da cidade do Rio de Janeiro, foram inseridos no estudo. O critério de inclusão dos controles foi mediante confirmação de ausência de episódios febris ou histórico de outras doenças há pelo menos de 3 meses da data de coleta do sangue.

Pacientes e controles concordaram em participar do projeto mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo A). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sendo cadastrado no Sistema Plataforma Brasil sob o número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 13318113.7.3001.0021 (anexo B).

6.2 Confirmação do diagnóstico laboratorial dos casos suspeitos de dengue

A infecção pelo DENV foi confirmada através da pesquisa qualitativa de anticorpos anti-DENV IgM por ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* ou ELISA) de captura (PANBIO, Columbia, EUA), detecção do antígeno viral NS1 por ELISA (PlateliaTM Dengue NS1 Ag Kit – Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) e/ou detecção do RNA viral por RT-PCR. Todos os testes foram realizados no Laboratório

de Flavivírus (IOC/FIOCRUZ). É importante ressaltar que o diagnóstico por detecção de NS1 foi realizado de três formas: a primeira seguindo o protocolo do fabricante, e a segunda e terceira seguindo as modificações metodológicas estabelecidas no Laboratório de Flavivírus. Em busca de um aumento da sensibilidade do método, amostras séricas foram pré-aquecidas a 100°C por 5 minutos ou incubadas com glicina/ácido hidroclicórico 1.5 M, pH 2.8 a 37 °C por 1 hora, seguido de neutralização por tris/ácido hidroclicórico 1.5 M, pH 9.7. Estas reações promovem a dissociação de possíveis complexos imunes formados entre a proteína NS1 e anticorpos heterólogos provenientes de infecções anteriores pelo DENV. Essa metodologia, em alguns casos, aumenta a sensibilidade de detecção da NS1 (Lima, 2014). No caso dessa coorte de pacientes, o percentual de detecção do NS1 foi igual comparando-se os três protocolos.

Os exames hematológicos hemograma completo e contagem de plaquetas foram realizados pelo laboratório do Hospital Rio-Laranjeiras na mesma data de consulta e coleta das amostras de sangue total dos pacientes com suspeita de dengue. No caso do grupo controle, os voluntários cederam os seus resultados dos exames hematológicos que foram obtidos nas datas mais próximas à coleta de sangue.

6.3 Isolamento de plaquetas em barreira de iodixanol Optiprep e separação de soro/plasma a partir do sangue periférico

Um volume de aproximadamente 5 mL de sangue total foi coletado de todos os pacientes com suspeita de dengue e de controles sadios em tubos contendo anticoagulante ACD (citrato de sódio 22 g/L, ácido cítrico 8 g/L e dextrose 24,5 g/L) (cat. # 364606, BD Vacutainer®, Nova Jérсия, EUA). Todo o volume de sangue coletado foi colocado sobre igual volume do gradiente de densidade OptiPrep™ (Axis-Shield, Dundee, Escócia). O anel de plaquetas foi visualizado após centrifugação a 350 g por 15 minutos a 20°C sem desaceleração determinada de parada, e a camada de plasma foi coletada, alíquotada e armazenada rapidamente a -70°C. O anel de plaquetas recuperado foi, em seguida, lavado e ressuspensado em Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline ou PBS) contendo 300 µM de Prostaglandina E1 (cat. CAS 745-65-3, Cayman, Michigan, EUA) com centrifugação a 1000 g por 10 minutos à

temperatura ambiente. Plaquetas isoladas foram ressuspensas em 10 mL de PBS e a contagem realizada através de método direto em câmara de Neubauer, utilizando-se o líquido de Rees & Ecker (3,8 g de citrato de sódio, 0,2 mL de solução de formol a 0,38% e 0,1 g de azul de cresil brilhante em quantidade suficiente para 120 mL de água destilada) sob microscópio óptico. Neste método, 10 µL de plaquetas ressuspensas são diluídas em 190 µL do líquido Rees & Ecker. Contamos as células viáveis com tamanho visualmente compatível com o das plaquetas, aproximadamente 4 µm, dentro dos cinco quadrantes internos da câmara de Neubauer e multiplicamos a soma das contagens por 1.000, chegando à concentração de plaquetas/mm³. Esse processo foi realizado em até 4 horas após coleta do sangue dos pacientes.

6.4 Lise de plaquetas e quantificação de proteínas totais dos lisados de plaquetas por ensaio de ácido bicinchrônico (BCA)

Plaquetas isoladas foram submetidas imediatamente ao protocolo de lise. Após a contagem, as plaquetas foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos à temperatura ambiente e o precipitado (*pellet*) de plaquetas isoladas foi ressuspendido com 10 µL do coquetel de inibidores de proteases (cat. P8340; Sigma- Aldrich, Sant Louis, EUA) mais 300 µL de tampão de lise contendo Igepal CA-630 1%, Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 137 mM, glicerol 10%, EDTA 2 mM, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL e pepstatina 10 µg/mL (fornecidos no conjunto *Human Apoptosis Array Kit*, R&D Systems, Minneapolis, EUA), seguido de incubação com agitação entre 4 a 8 °C por 30 minutos. Após incubação, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 g e o volume total de 300 uL do sobrenadante dividido em dois microtubos, um com 285 µL e outro com 25 µL. Este último volume foi utilizado para quantificação das proteínas totais. Os 285 µL de lisados de proteínas extraídas das plaquetas isoladas de pacientes e controles permaneceram a -70°C até sua utilização nos ensaios posteriores.

A quantificação de proteínas totais dos lisados de plaquetas foi realizada utilizando o conjunto Bicinchrônico Acid Protein Assay (cat. B9643; Sigma-Aldrich, Sant Louis, EUA). Primeiramente, foi preparada a solução de trabalho utilizando 50 partes

de reagente A (Carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinônico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio) e 1 parte de reagente B (sulfato de cobre a 4%). A solução estoque de proteína padrão (Bovine Serum Albumin - BSA) a 2 mg/mL é fornecida no conjunto de reagentes, permitindo a preparação da curva padrão de BSA com valores entre 200- 1000 µg/mL em um fator de diluição de 1:5. Em uma microplaca de 96 poços, adicionou-se por poço o volume de 25 µL dos lisados de proteínas e de cada diluição da curva padrão que foram incubados com 200 µL da solução de trabalho a 37°C por 30 minutos. A absorbância foi medida a 562 nm na leitora de microplacas Spectramax Paradigm (Molecular Devices, Orleans Drive Sunnyvale, CA, EUA). A concentração de proteínas totais de cada lisado foi obtida em pg/mL, por interpolação da curva-padrão de BSA, utilizando-se o programa estatístico Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA. EUA).

6.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas séricas por ensaio multiplex de microarranjo líquido

A quantificação das citocinas IL-10, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ e da quimiocina CXCL8/IL-8 foi realizada utilizando soro de controles saudáveis (n=10), pacientes DENV (n=34) e ODF (n=3). Para esta análise, foram utilizados o conjunto base de ensaio Luminex, *Human High Sensitivity Cytokine Base Kit A* e os conjuntos específicos para cada analito: *Human IL-10*, *TNF- α* , *IL-1 β /IL-1F2*, *IFN- γ* e *CXCL8/IL-8 High Sensitivity Kit* (R&D Systems, Minneapolis, EUA).

Inicialmente, foi preparado um coquetel de micropartículas diluindo 50 µL de cada microesfera concentrada 50X em 2,5 mL de solução diluente de micropartículas fornecida no conjunto de reagentes. Realizou-se também a diluição 1:10 das amostras de soro de pacientes e controles em solução diluente calibradora. Para a confecção da curva padrão foram realizadas diluições do padrão de referência, conforme quadro 3.

Quadro 3: Referência dos conjuntos de reagentes de Luminex e diluições das curvas padrão

Analito	Curva Padrão (pg/mL)	Catálogo*
Kit base		LHSC000
IL-10	0,51 - 2100	LHSC217
TNF-α	0,82 - 3350	LHSC210
IL-1β	0,37 - 1500	LHSC201
IFN-γ	0,33 - 1350	LHSC285
CXCL8/IL-8	0,78 - 3200	LHSC208

* R&D Systems, Minneapolis, EUA.

Seguindo as instruções do fabricante, placas de 96 poços fornecidas no conjunto de reagentes foram lavadas com 100 μ L de tampão de lavagem por poço. A seguir, foram pipetados 25 μ L do coquetel de micropartículas por poço em toda placa, seguido de 100 μ L de cada um dos pontos da curva padrão diluída ou dos soros de interesse previamente diluídos seguido, de incubação por 3 horas a 25 °C em agitador de microplacas. Após esta etapa, foram realizadas 3 lavagens com 100 μ L de tampão de lavagem por poço. Em seguida foram adicionados 50 μ L do coquetel de anticorpos anti-IgG humanos biotinizados e realizada a incubação por 1 hora a 25 °C em agitador de microplacas. As placas foram novamente lavadas com 100 μ L de tampão de lavagem por poço e incubadas com 50 μ L de estreptavidina-PE por 30 minutos a 25°C em agitador de microplacas. Por fim, as micropartículas foram ressuspensas com 100 μ L de tampão de lavagem para aquisição no Sistema Luminex 200™ (Luminex Corp, Austin, Texas, EUA) da Plataforma PDTIS Luminex da FIOCRUZ.

Os níveis de cada citocina em intensidade média de fluorescência (mean fluorescence intensity ou MFI) foram determinados no leitor. A concentração de cada analito foi calculada frente à respectiva curva-padrão em pg/ml utilizando-se o software do fabricante (xPONENT® v3.1 software).

6.6 Ensaio para determinação do perfil de expressão de proteínas intraplaquetárias relacionadas à angiogênese pelo *Human Angiogenesis Array Kit*

Foi utilizado o *Human Angiogenesis Array Kit* (cat. ARY007, R&D Systems, Minneapolis, EUA) para avaliação de 55 proteínas relacionadas à angiogênese em pacientes DENV+ ($n=8$), sendo 4 pacientes DENV com contagem total de plaquetas acima de $150.000/\text{mm}^3$ e 4 com contagem total de plaquetas abaixo de $150.000/\text{mm}^3$, pacientes com ODF e contagem de plaquetas superior a $150.000 \text{ plaq}/\text{mm}^3$ ($n=2$) e controles sadios ($n=2$). Estas proteínas foram agrupadas didaticamente em funções relacionadas à angiogênese, coagulação, regulação da matriz extracelular e inflamação, como listado no quadro 4.

Quadro 4: Proteínas avaliadas pelo *Human Angiogenesis Array Kit* e agrupadas segundo suas funções biológicas

Pró-angiogênicas	MMP-9*, HGF, PD-ECGF, endogлина, angiogenina, angiopoetina-1, PDGF-AA*, PDGF-AB/BB*, CXCL8/IL-8*, EGF, EG-VEGF, Endotelina, FGF ácido, FGF básico, FGF-7/KGF, HB-EGF, Leptina, VEGF, VEGF-C
Anti-angiogênicas	Serpina F1, angiostatina*, trombospondina-2, trombospondina-1
Pró-coagulantes	TF, uPA, angiostatina*, PF4*, Serpina B5/Maspina
Anti-coagulantes	Serpina-E1
Manutenção da matriz extracelular	PDGF-AA*, PDGF-AB/BB*, TIMP-1, TIMP-4
Degradação da matriz extracelular	MMP-9*, MMP-8, ADAMTS-1
Pró-inflamatórios	PDGF-AA*, PDGF-AB/BB*, PF4*, MIP-1 α , IL-1 β , angiopoetina-2, CCL2/MCP-1, CXCL16, CXCL8/IL-8, GM-CSF
Reguladores da inflamação	TGF- β 1, trombospondina-1, activina-A, prolactina, artemina

* Compartilham mais de uma função biológica. Abreviaturas: Metaloproteinase 9/8 de Matriz (MMP-9/8); Hormônio de Crescimento do Hepatócito (HGF); Mitógeno de Célula Endotelial Derivado de Plaquetas (PD-ECGF); Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta-AA/AB-BB (PDGF-AA/AB-BB); Interleucina-8/1 β (IL-8/1 β); Fator de Crescimento Epidérmico (EGF); Fator de Crescimento Vascular Endotelial Derivado de Glândula Endócrina (EG-VEGF); Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF); Fator de Crescimento do Queratinócito (KGF); Fator de Crescimento tipo EGF Ligante de Heparina (HB-EGF); Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF); Fator Tecidual (TF); Ativador de Plasminogênio tipo Uroquinase (uPA); Fator Plaquetário-4 (PF-4); Inibidor Tecidual de Metaloproteinase -1/4 (TIMP-1/4); A Desintegrina e Metaloproteinase com Motivo da Trombospondina-1 (ADAMTS-1); Proteína Inflamatória de Macrófago-1 α (MIP-1 α), Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1); Fator Estimulador de Colônia Granulócito-Macrófago (GM-CSF); Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β).

O conjunto de reagentes fornece, dentre outros itens, câmara de “multilavagens” e quatro membranas de nitrocelulose revestidas por anticorpos específicos de captura dispostos em forma de *spots*, em duplicata (figura 19), além de três duplicatas controles positivo e uma duplicata controle negativo da reação. Cada membrana de nitrocelulose foi utilizada para análise de um paciente ou controle. Cada *spot* contém um anticorpo de captura específico para a detecção de uma das 55 proteínas específicas.



Figura 19: Membrana de nitrocelulose e câmara multilavagem do *Human Angiogenesis Array Kit*.

Primeiramente, seguindo as instruções do fabricante, as membranas de nitrocelulose foram imersas em 2 mL de uma solução de bloqueio (tampão de ensaio 7) fornecida pelo fabricante por 1 hora a 25 °C com agitação.

Durante o bloqueio, as amostras de lisado de proteínas de plaquetas oriundas de pacientes e controles tiveram sua concentração ajustada para 300 µg de proteína total em 1 mL de tampão 4 fornecido pelo conjunto de reagentes. Neste volume, foram adicionados 500 µL do tampão de ensaio 4 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para um volume final de 1,5 mL. A seguir, foram adicionados 15 µL do coquetel de anticorpos de detecção (R&D Systems) ao lisado de plaquetas, seguido de homogeneização e incubação por 1 hora a 25 °C.

Ao final do bloqueio, cada membrana foi incubada por 12-18 horas a 2-4°C em agitador com a mistura de amostra e anticorpo de detecção pré-incubada.

No dia seguinte, as membranas foram retiradas da câmara de multilavagem, acomodadas em placas de petri e lavadas 3 vezes com 20 mL de tampão de lavagem (R&D Systems) sob agitação por 10 minutos para cada lavagem.

Após as lavagens, as membranas foram recolocadas na câmara de multilavagem onde cada membrana foi incubada com 2,0 mL de Streptavidin-HRP diluída 1:1000 em tampão de ensaio 5 (R&D Systems) por 30 minutos a 25°C com agitação. Posteriormente, foi realizada lavagem por 3 vezes conforme descrito acima e as

membranas, ainda úmidas, foram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus do IOC/ FIOCRUZ para aquisição dos dados.

Em uma sala escura, as membranas foram envolvidas com plástico protetor e incubadas com 1mL de reagente de quimioluminescência (R&D Systems) por 1 minuto. Ao término, o excesso de reagente de quimioluminescência foi retirado gentilmente com o auxílio de papel altamente absorvente. As membranas foram posicionadas em um cassete de autorradiografia e expostas a filme de Raio-X por 5 minutos. A quantificação dos *spots* foi feita por escaneamento do filme e análise dos spots utilizando-se o software Quantity One (Bio-rad Version 4.6.3), gerando valores semiquantitativos para cada proteína analisada em densidade média de pixels (MDP). As proteínas que tiveram algum sinal revelado foram identificadas sobrepondo o filme de cada membrana a um modelo fornecido pelo conjunto de reagentes em forma de transparência para sobreposição dos spots (figura 20).

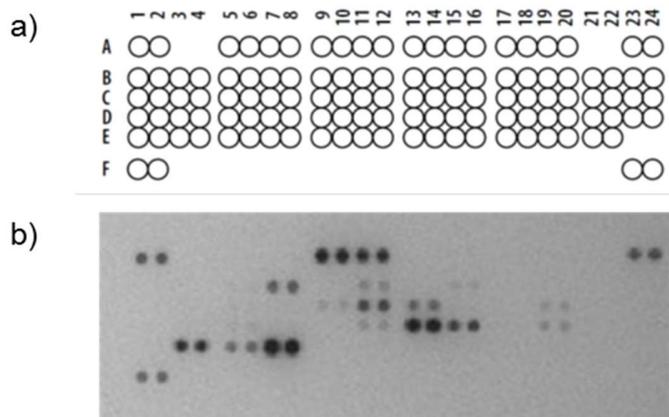


Figura 20: Identificação dos spots reagentes. Transparência fornecida pelo conjunto de reagentes para sobreposição dos spots (a). Spots reagentes de uma paciente DENV+, identificados a partir das coordenadas da transparência (b).

6.7 Quantificação de PDGF-BB e VEGF séricos por ensaio de microarranjo líquido em pacientes utilizados no ensaio de determinação do perfil de expressão de proteínas intraplaquetárias

A quantificação de PDGF e VEGF foi realizada utilizando soro dos controles sadios (n=6) pacientes DENV+ (n=4) e ODF (n=3). Para esta análise, foi utilizado o conjunto base de ensaio Bio-plex Pro Human Cytokine Standard 27-plex Group-1 (Cat. #M50-0KCAF0Y; Bio-Rad Hercules, EUA).

Inicialmente, 575 µL do coquetel de micropartículas concentradas 10X foram diluídos em 5.175 µL de tampão de ensaio fornecido no conjunto de reagentes. Realizou-se também a diluição 1:4 das amostras de soro de pacientes e controles em solução diluente de amostras. Para a confecção da curva-padrão foram realizadas diluições do padrão de referência, conforme quadro 5 em tampão de diluição de padrão fornecido no conjunto.

Seguindo as instruções do fabricante, placas de 96 poços fornecidas no conjunto foram lavadas com 100 µL de tampão de lavagem por poço. A seguir foram pipetados 50 µL do coquetel de micropartículas diluído por poço em toda placa, seguido de 50 µL de cada um dos pontos da curva padrão diluída ou dos soros de interesse previamente diluídos, seguido de incubação por 30 minutos 25 °C em agitador de microplacas. Após esta etapa, foram realizadas 3 lavagens com 100 µL de tampão de lavagem por poço e então foram adicionados 25 µL do coquetel de anticorpos anti-IgG humanos biotinilados e incubação por 30 minutos a 25 °C em agitador de microplacas. As placas foram novamente lavadas e incubadas com 50 µL de estreptavidina-PE por 30 minutos a 25°C em agitador de microplacas. Por fim, as micropartículas foram ressuspensas com 100 µL de tampão de lavagem para aquisição no Sistema MAGPIX™ (Luminex Corp).

Os níveis de cada citocina em intensidade média de fluorescência (MFI) foram determinados no leitor. A concentração de cada analito foi calculada frente à respectiva curva-padrão em pg/ml utilizando-se o software do fabricante (xPONENT® v3.1 software, Austin, Texas, EUA).

Quadro 5: Diluições das curvas-padrão de PDGF e VEGF

Analito	Curva Padrão (pg/mL)
VEGF	35863- 2,19
PDGF-BB	17589- 10,07

PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial.

6.8 Análise estatística

Para variáveis quantitativas com distribuição normal, como dados demográficos, foram utilizados valores de média \pm desvio-padrão e para variáveis quantitativas com distribuição não normal, como dados laboratoriais, foram utilizados valores de mediana \pm intervalos interquartis.

As análises estatísticas entre os grupos controle, DENV e ODF foram feitas através do teste não-paramétrico U de Mann-Whitney.

Análises de correlação entre quantificação de proteínas totais, quantificação de citocinas e quimiocinas séricas e nível de proteínas intraplaquetárias com contagem de plaquetas foram realizadas utilizando o teste de Spearman.

Todos os testes foram realizados no programa The Prism 5 statistics (GraphPad Software, San Diego, CA. EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

7. Resultados

7.1 Caracterização demográfica, clínica e laboratorial de pacientes e controles envolvidos no estudo

Entre fevereiro a abril de 2013, 65 indivíduos com suspeita clínica de infecção pelo DENV foram incluídos neste estudo por apresentarem sintomas como febre, adinamia, mialgia, artralgia, dor retroocular e náuseas. Quarenta e três dos 65 pacientes (66,2%) confirmaram o diagnóstico de dengue (pacientes DENV+), baseado na positividade em pelo menos um dos testes laboratoriais utilizados. Os demais pacientes, 22 dos 65 pacientes (33,8%), formaram o grupo com outras doenças febris (pacientes ODF), pois não confirmaram diagnóstico laboratorial para dengue em algum dos testes realizados. Contudo, à princípio, esses últimos apresentaram sintomas semelhantes aos pacientes DENV+. Os pacientes foram alocados no grupo DENV+ ($n=43$) e no grupo ODF ($n=22$) como demonstrado na tabela 6. Ainda, utilizamos o grupo controle composto por 10 indivíduos controle assintomáticos para a dengue e por isso considerados saudáveis. Baseado na classificação clínica estabelecida pelo Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009), a maioria dos pacientes DENV+ apresentou febre, adinamia, mialgia, artralgia, dor retroocular e náuseas e foram classificados no grupo Febre da Dengue (FD) (33 dos 43, 76,7%). Um segundo grupo de pacientes (10 dos 43, 23,3%) apresentou, além dos sinais/sintomas característicos da FD, sangramento de mucosas, dores abdominais ou vômitos, sendo classificados como grupo Febre do Dengue com Sinais de Alarme (FDSA) (Tabela 6).

Análises demográficas dos grupos Controle, pacientes DENV+ ou pacientes ODF não indicaram diferença significativa entre sexo e idade. Quando comparados os grupos DENV e ODF, não foi observada diferença significativa entre dias de doença (Tabela 6).

Quanto ao diagnóstico laboratorial, podemos observar que a detecção sorológica de anti-DENV IgM nos pacientes confirmou 62,8% dos casos (27 dos 43 casos confirmados). O ensaio de RT-PCR confirmou 46,5% dos casos (20 dos 43 casos confirmados), indicando sorotipos DENV-4 ($n=18$) e DENV-1 ($n=2$). Já o ensaio de

detecção sorológica do antígeno NS1 circulante confirmou 20,9% (9 dos 43 casos confirmados) dos casos. A sobreposição da positividade entre os testes de confirmação do diagnóstico são demonstrados na Figura 21.

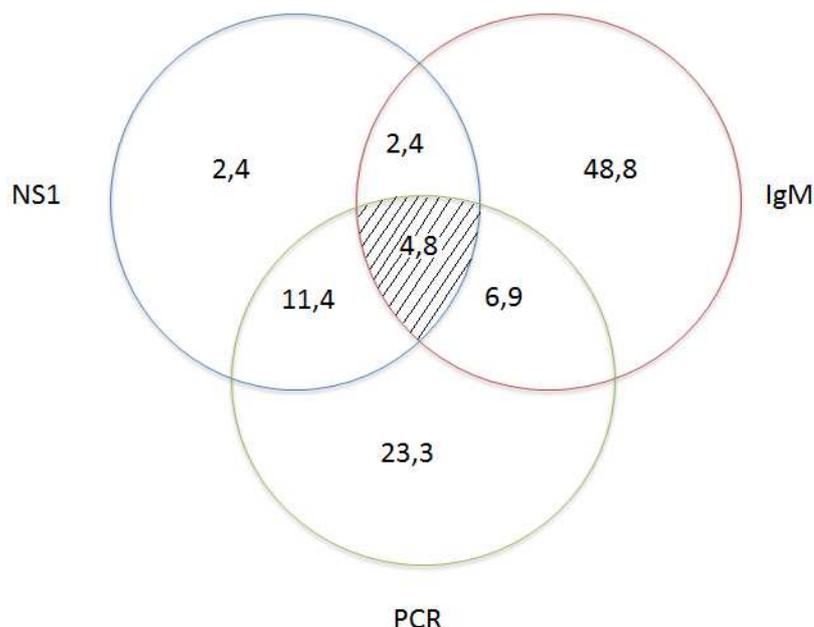


Figura 21: Sobreposição do percentual de positividade dos testes de diagnóstico laboratorial realizados para confirmação da infecção por DENV. Dados relativos ao percentual de pacientes positivos ($n=43$) para os testes de detecção sorológica de IgM anti-DENV, NS1 e ensaio de RT-PCR.

Em relação aos dados laboratoriais, a tabela 6 mostra diferenças estatisticamente significativas com relação à contagem de plaquetas e leucócitos totais entre os grupos controle *versus* DENV. Entre pacientes DENV+ com ODF detectamos diferenças estatisticamente significativas na contagem de plaquetas e leucócitos totais. Já a comparação entre os grupos Controle e ODF demonstraram diferenças estatisticamente significativas apenas na contagem de plaquetas. Os pacientes DENV+, FD e FDSA não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros testados. Os valores de média e desvio padrão de cada parâmetro laboratorial nos grupos destacados e suas diferenças estatísticas estão organizados na tabela 1.

Tabela 1: Características demográficas e clínico-laboratoriais de controles e pacientes

	Controles (n=10)	ODF (n=22)	DENV+ (n = 43)		
			Total (n = 43)	FD (n = 33)	FDSA (n=10)
Sexo, n (%):					
Fem	7 (70,0)	14 (63,6)	24 (55,8)	22 (66,7)	4 (40,0)
Masc	3 (30,0)	8 (36,4)	19 (44,2)	11 (33,3)	6 (60,0)
Idade (anos), média ± DP:	30 ± 6*	44 ± 16	45 ± 16	46 ± 17	43 ± 14
Duração da doença (dias), média ± DP:	NA	4 ± 2	4 ± 3	4 ± 3	5 ± 2
Anti-DENV IgM positivo, n (%):	NA	0 (0)	27 (62,8)	19 (57,6)	7 (70)
NS1 positivo, n (%):	NA	0 (0)	9 (20,9)	8 (24,2)	1 (10)
RT-PCR positivo, n (%):	NA	0 (0)	20 (46,5)	17 (51,6)	3 (30)
Sorotipo viral, n (%):					
1		0 (0)	2 (4,6)	1 (3,0)	1 (10,0)
4	NA	0 (0)	18 (41,9)	16 (48,0)	2 (20,0)
NI		0 (0)	23 (53,5)	16 (48,0)	7 (70,0)
Hematócrito (%), média ± DP:	39,9 ± 3,0	41,9 ± 2,7	42 ± 3,9	42 ± 3,9	42,1 ± 4,4
Plaquetas (x10³/mm³), média ± DP:	296,8 ± 34,8 [†]	202,7 ± 60,1 [§]	157,9 ± 5	157,9 ± 5	152,6 ± 49,8
Leucócitos (x10³/mm³), média ± DP:	6.073,3 ± 635,2 [‡]	7.231,0 ± 3.642,0	4.662,0 ± 2.669,0	4.662,2 ± 2.268,9	4.466,7 ± 1.882,3
Linfócitos (x10³/mm³), média ± DP:	1.845,3 ± 349,3	1.554,3 ± 5.27,6	1.504,7 ± 662,6	1.265,3± 823,1	1.199,2 ± 874,9
Monócitos (x10³/mm³), média ± DP:	432,7 ± 99,8	501,5 ± 257,3	381,9 ± 188,2	321,2 ± 222,8	277,6 ± 206,5

*Controles versus ODF, $p = 0,0096$; Controles versus DENV+, $p = 0,0084$.

[†] Amostras não amplificadas por RT-PCR.

[‡] Controles versus ODF, $p = 0,0022$; Controles versus DENV+, $p = 0,0003$.

[§]Controles versus DENV+, $p = 0,0074$.

^{||}ODF versus DENV+, $p = 0,0053$.

[¶] ODF versus DENV+, $p = 0,0037$.

DP, desvio-padrão; NA, não se aplica; NS, não-estrutural; NI, não informado; RT-PCR, transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase; ODF, outras doenças febris; FD, febre do dengue; FDSA, febre do dengue com sinais de alarme.

7.2- Quantificação dos níveis séricos de citocinas em pacientes e controles

Duas considerações importantes nos motivaram a quantificar níveis séricos das citocinas IL-10, TNF- α , IL-1 β , CXCL8/IL-8 e IFN- γ em controles sadios ($n=10$), pacientes DENV+ ($n=34$) com ODF ($n=03$). A primeira delas foi que a dengue, independentemente de suas diferentes manifestações clínicas, é uma doença relacionada à desregulação da resposta imunológica e já foi mostrado que estas citocinas estão relacionadas à gravidade da doença (Rothman, 2011). A segunda é que estas moléculas estão intimamente relacionadas às plaquetas. Como vimos TNF- α , CXCL8/IL-8 e IFN- γ tem papel no desenvolvimento de megacariócitos (Klinger et al., 2002); já foi demonstrada correlação inversa entre os níveis circulantes de IL-10 e contagem de plaquetas em pacientes DENV+ (Azeredo et al., 2001) e, por fim, IL-1 β tem uma maior produção por parte das plaquetas oriundas de pacientes DENV+ quando comparado àquela de plaquetas de controles (Hottz et al., 2013b).

Nossos achados demonstraram que pacientes DENV+ apresentaram níveis séricos significativamente mais elevados quando comparados aos controles sadios em relação aos seguintes parâmetros biológicos: (i) IL-10 (4,665 pg/ml [1,851- 7,479] para o grupo DENV+ (sendo mediana [interquartis 25 – 75%] e 0,532 pg/ml [0,372- 0,693] para o grupo controle); (ii) TNF- α (9,077 pg/ml [7,355- 10,80] para o grupo DENV+ e 3,904 pg/ml [2,911- 4,898] para o grupo controle); (iii) CXCL8/IL-8 (7,063 pg/ml [5,729- 8,396] para o grupo DENV+ e 3,320 pg/ml [1,836- 4,805] para o grupo controle); e (iv) IFN- γ (2,783 pg/ml [0,002- 5,570] para o grupo DENV+ e 0,537 pg/ml [0,378-0,695] para o grupo controle) (Figuras 22 A - E, respectivamente). Com relação à dosagem de IL-1 β , não foi encontrada diferença significativa entre os grupos DENV e controle (figura 22C). Dentro do grupo de pacientes DENV+, não foram observadas diferenças significativas entre FD e FDSA com relação aos níveis séricos de todas as citocinas analisadas.

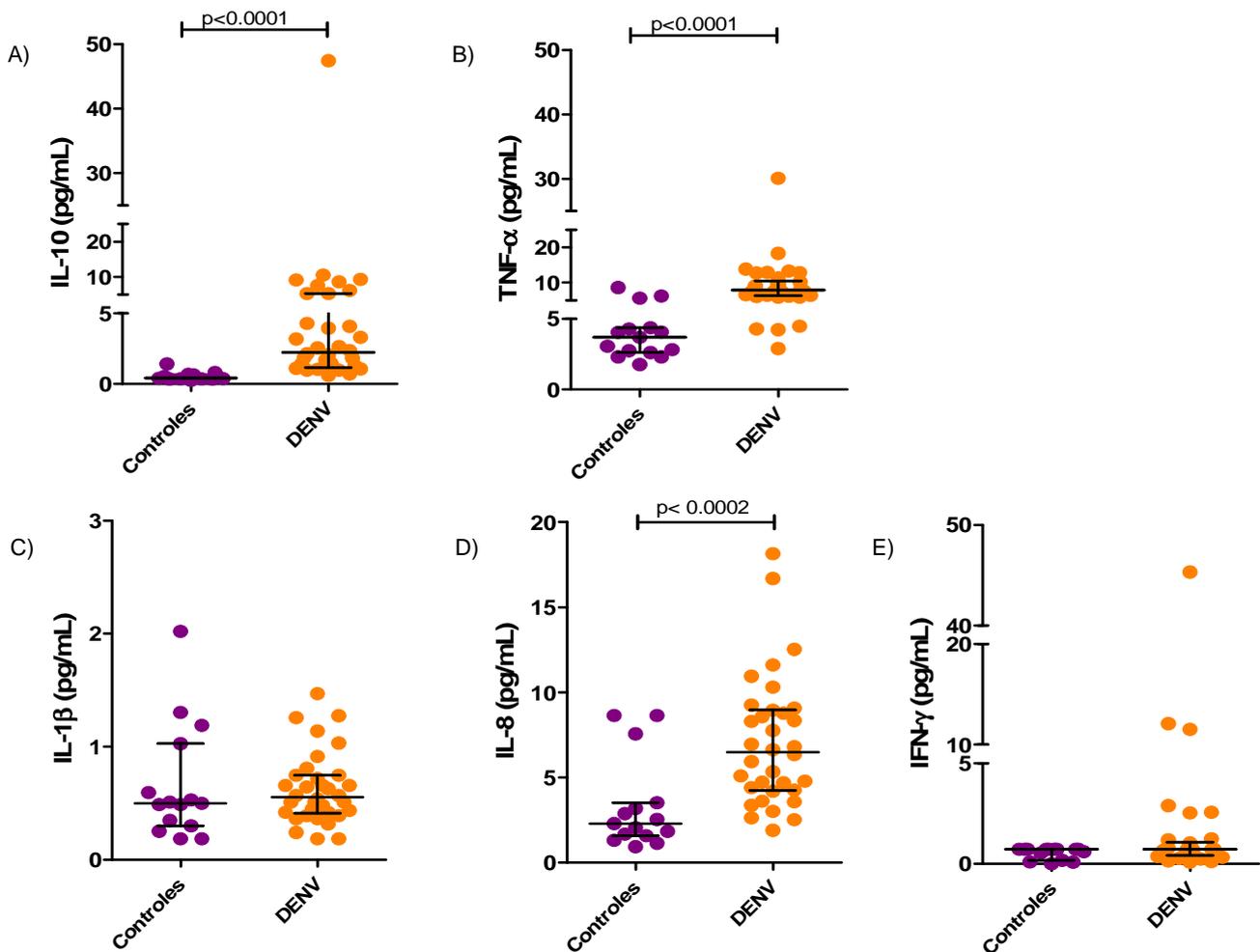


Figura 22. Dosagem dos níveis séricos de citocinas em pacientes DENV+ e Controles. As figuras representam mediana \pm interquartil 25 – 75% dos níveis séricos (pg/mL) de IL-10 (A), TNF- α (B), IL1- β (C), CXCL8/IL-8 (D) e IFN- γ (E) em pacientes DENV+ ($n=34$) e controles ($n=10$). Valores de $p < 0,05$ estão discriminados nas figuras e foram considerados estatisticamente significativos quando comparados pacientes DENV+ versus controles.

7.3 Análise da associação de níveis séricos de citocinas com dados laboratoriais de pacientes infectados pelo DENV

A análise da correlação entre as citocinas e a contagem de células sanguíneas se deu dentro do grupo de pacientes DENV+ através do teste de Spearman. Dentre os 34 pacientes testados para as citocinas citadas, apenas 26 tinham dados completos do hemograma e contagem de plaquetas totais. Encontramos que os níveis de IL-10 foram correlacionados inversamente com a contagem de plaquetas ($r = -0,483$; $p = 0,019$) e diretamente com a contagem de leucócitos ($r = 0,656$; $p = 0,001$) e linfócitos ($r = 0,483$;

$p=0,011$). Em relação ao TNF- α , observamos correlação direta com a contagem de linfócitos ($r=0,393$; $p=0,047$) e correlação direta entre IFN- γ e contagem de plaquetas ($r=0,477$; $p=0,014$) (tabela 2).

Tabela 2: Correlações entre os níveis séricos de citocinas e contagem de células do sangue em pacientes infectados pelo DENV

Parâmetros hematológicos	IL-10	TNF- α	IL-1 β	CXCL8/IL-8	IFN- γ
Plaquetas totais	R=-0,483 $p=0,019$	ns	ns	ns	R=0,477 $p=0,021$
Leucócitos totais	R=0,656 $p=0,001$	ns	ns	ns	ns
Linfócitos totais	R=0,483 $p=0,011$	R=0,393 $p=0,047$	ns	ns	ns
Monócitos totais	ns	ns	ns	ns	ns

*Valores de p e r discriminados quando $p < 0,05$. Ns, não significativo.

Níveis séricos de CXCL8/IL-8 e IFN- γ apresentaram correlação inversa com os dias de doença ($r = -0,700$; $p=0,001$ e $r = -0,450$; $p=0,028$, respectivamente).

Os 26 pacientes testados para as citocinas, dos quais dispúnhamos de resultados de parâmetros hematológicos, foram estratificados naqueles sem trombocitopenia (acima de 150.000 plaq/mm³) e com trombocitopenia (abaixo de 150.000 plaq/mm³). Os níveis de IFN- γ demonstraram diferença estatística entre os grupos DENV acima ($n=12$) e abaixo ($n=14$) de 150.000 plaq/mm³ (0,728 [0,420 – 0,728] pg/ml *versus* 0,894 [0,728 – 2,563] pg/ml, respectivamente) (Figura 23).

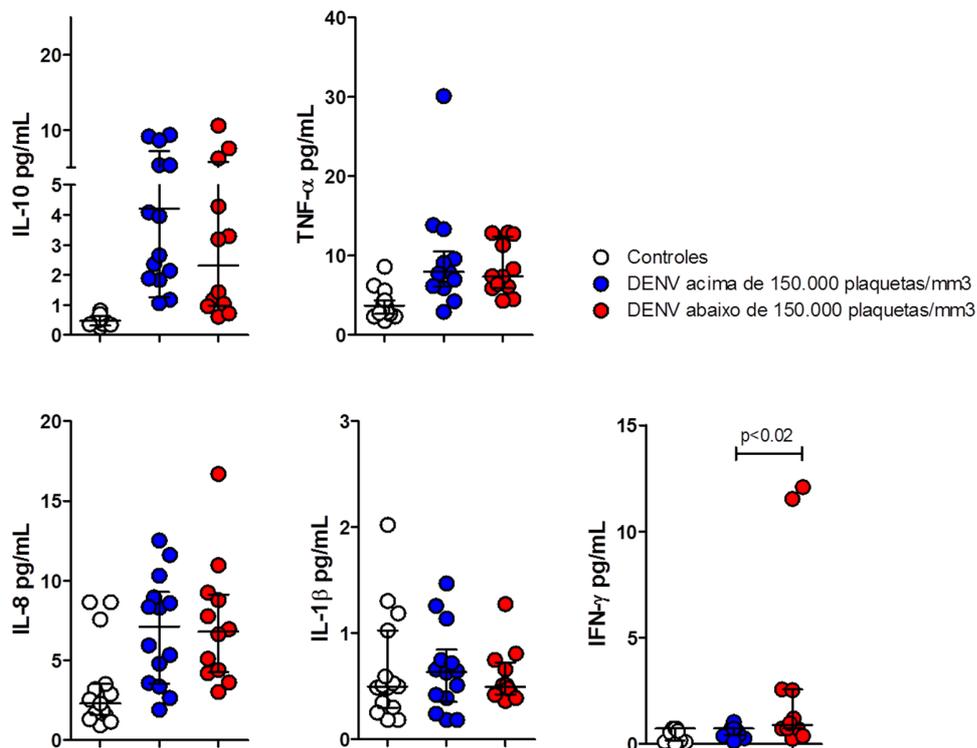


Figura 23: Quantificação de citocinas de acordo com a contagem de plaquetas acima e abaixo de 150.000/mm³. IL-10 (A), TNF- α (B), IL-1 β (C), IL-8 (D) e IFN- γ (E) expresso pela mediana \pm interquartis 25 – 75% em 12 pacientes DENV+ com contagem de plaquetas acima de 150.000/mm³, 14 DENV+ abaixo de 150.000/mm³ e 10 controles. * $p < 0,05$ quando comparada a contagem de plaquetas de pacientes DENV+ acima *versus* abaixo 150.000 plaq/mm³.

7.4 Avaliação de proteínas intraplaquetárias em pacientes e controles e análise da associação de proteínas intraplaquetárias, níveis séricos de citocinas e dados clínico-laboratoriais de pacientes infectados pelo DENV

Foi realizada a determinação dos níveis de 55 proteínas relacionadas à angiogênese, coagulação, regulação da matriz extracelular e inflamação em lisados de plaquetas isoladas de pacientes DENV+, ODF e controles. Os pacientes DENV+ ($n=8$) foram estratificados naqueles com contagem de plaquetas acima ($n=4$) e abaixo de 150.000 plaq/mm³ ($n=4$). Como grupos controles foram incluídos pacientes com ODF e

contagem de plaquetas acima de 150.000 plaq/mm³ ($n=2$) e doadores sadios ($n=2$) (tabela 3). Os dados são representados em densidade média de pixels (MDP).

Tabela 3: Características clínicas e laboratoriais e análise do perfil de expressão de proteínas intraplaquetárias expresso em pg/mL de pacientes e controles do estudo

Grupo	ID	Clínica	Dias de doença	Plaquetas mil/mm ³	IL-10	TNF- α	IL-1 β	IL-8	IFN- γ	PDGF	VEGF
Controle	C1	--	--	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	C2	--	--	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
ODF	ODF1	--	2	239	NO	NO	NO	NO	NO	1106,45	182,96
	ODF2	--	2	242	NO	NO	NO	NO	NO	1031,90	62,01
DENV acima de 150.000 plaq/mm ³	DENV1	FD	3	237	2,04	4,08	0,51	1,02	2,53	1137,69	295,88
	DENV2	FD	1	224	NO	NO	NO	NO	NO	770,41	93,73
	DENV3	FD	3	192	3,23	6,46	0,81	1,61	11,53	784,13	118,90
	DENV4	FDSA	9	319	1,80	3,60	0,45	0,90	0,73	1397,23	134,61
DENV Abaixo de 150.000 plaq/mm ³	DENV5	FD	NO	89	2,63	5,26	0,66	1,32	0,73	380,02	0,00
	DENV6	FD	7	111	2,51	5,02	0,63	1,26	0,38	268,19	0,00
	DENV7	FDSA	5	124	2,58	5,15	0,64	1,29	0,12	656,89	41,41
	DENV8	FDSA	7	106	0,97	1,94	0,24	0,48	0,73	623,55	116,93

Em: --, dados não pertinentes ao paciente / controle. NO, dados não obtidos sobre o paciente / controle.

Trinta das 55 proteínas analisadas não apresentaram *spots*, dentre as quais: activina A, ADAMTS-1, anfirregulina, artemina, CCL2/MCP-1, CXCL16, CXCL8/IL-8, EGF, EG-VEGF, endostatina/colágeno XVIII, endotelina-1, FGF ácido, FGF básico, FGF-4, FGF-7/KGF, GDNF, GM-CSF, HB-EGF, leptina, MMP-8, NRG1- β 1, pentraxina 3, persefina, PIGF, prolactina, serpina B5/maspina, TIMP-4, vasoinibina, VEGF e VEGF-C. Dentro deste conjunto de proteínas que não apresentaram *spots*, para muitas delas como anfiregulina, artemina, CXCL8/IL-8 e PIGF não há relatos na literatura de que sejam estocadas ou produzidas nas plaquetas. Em relação à angiopoetina-2 (Fiedler et al., 2004) e ao TF (Bouchard, Mann & Butenas, 2010), a quantificação dos spots foi muito inferior quando comparada àquela das demais proteínas, confirmando dados da literatura em relação ao estoque irrelevante dessas proteínas nas plaquetas.

Tabela 4: Vinte e cinco proteínas intraplaquetárias detectadas em lisados de plaquetas de pacientes e controles

Função	Proteína (MDP)	acima de 150.000 plaq/mm ³	abaixo de 150.000 plaq/mm ³	acima de 150.000 plaq/mm ³	acima de 150.000 plaq/mm ³
Pró-angiogênicos	HGF	414 ± 127	294 ± 250	107;99	320;49
	PD-ECGF	83 ± 93	73 ± 44	184;53	114;18
	Endoglina	211 ± 106	140 ± 154	99;59	155;23
	Angiogenina	1008 ± 140	806 ± 748	290;172	189;152
	Angiopoetina-1	895 ± 221	535 ± 343	803;188	942;205
	PDGF-AA*	854 ± 582	857 ± 268	1017;246	1401;715
	PDGF-AB;BB*	583 ± 207	389 ± 258	58;187	472;416
Anti-angiogênicos	MMP-9*	89 ± 33	109 ± 50	84;17	61;10
	Serpina-F1	137 ± 82	211 ± 108	114; 14	70; 8
	Trombospondina-1	12 ± 18	23 ± 34	34;21	9; 0
	Trombospondina-2	59 ± 36	70 ± 49	66;41	114; 53
Pró-coagulantes	Angiostatina	2 ± 4	9 ± 11	16;44	0;0
	PF4*	192 ± 128	198 ± 143	106;60	11;79
	TF	24 ± 23	23 ± 13	0;21	50;16
Anti-coagulantes	uPA	67 ± 29	77 ± 51	3;77	38;62
	Serpina-E1	738 ± 320	966 ± 390	487;86	548;36
Manutenção da matriz extracelular	IGFBP-2	206 ± 349	52 ± 26	15;29	99;3
	IGFBP-1	89 ± 39	39 ± 12	127;7	301;19
	IGFBP-3	294 ± 243	232 ± 265	104;38	352;68
	TIMP-1	1484 ± 248	1522 ± 251	1572;496	650;669
Degradação da matriz extracelular	MMP-9*	89 ± 33	109 ± 50	84;17	61;10
Pró-inflamatórios	CD26	39 ± 20	53 ± 49	12;32	21;3
	MIP-1α	18 ± 10	36 ± 16	28;14	69; 9
	IL-1β	53 ± 29	57 ± 28	19;72	92;33
	Angiopoetina-2	9 ± 10	2 ± 4	38;19	22;1
	PF4*	192 ± 128	198 ± 143	106;60	11;79
	PDGF-AA*	854 ± 582	857 ± 268	1017;246	1401;715
	PDGF-AB;BB*	583 ± 207	389 ± 258	58;187	472;416
Regulador da inflamação	TGF- β1	139 ± 27	87 ± 26	73;54	17;81

* compartilham mais de uma função biológica. Comparação das médias ± desvio padrão dos pacientes DENV+ com contagem de plaquetas acima *versus* abaixo de 150.000 /mm³ e valores absolutos dos ODF1 ;ODF2 e C1;C2 para as 25 proteínas detectadas nos lisados de plaquetas.

Dentre as 25 proteínas nas quais foram detectados *spots* (tabela 4), indicando a presença destas nas plaquetas, cinco delas tiveram seus níveis em MDP correlacionados diretamente de forma significativa ou com uma forte tendência, com a contagem de plaquetas, tais como: PDGF-AA, TGF- β 1, HGF, IGFBP-1 e angiopoetina-1 (Figura 24).

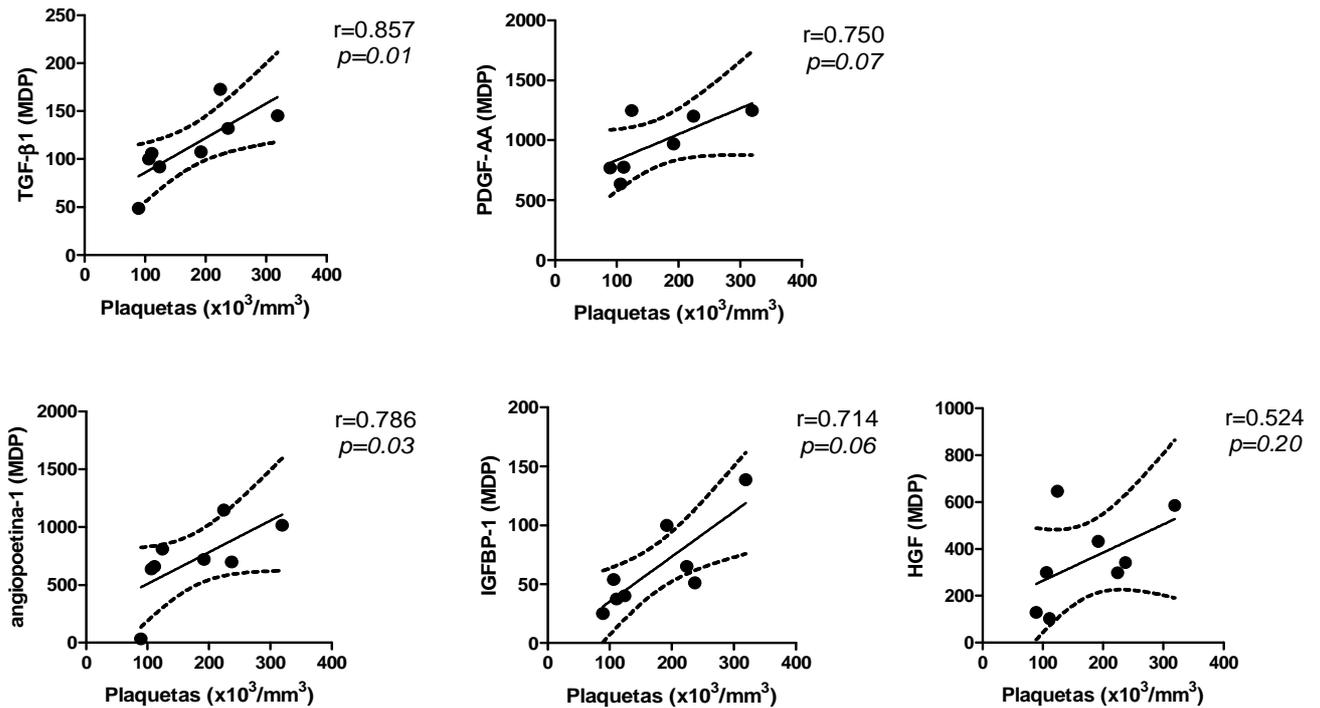


Figura 24: Correlação entre proteínas do lisado de plaquetas e o número de plaquetas no sangue de pacientes infectados pelo DENV. A contagem de plaquetas/mm³ de 8 pacientes DENV+ foi correlacionada aos níveis de PDGF-AA (A), TGF- β 1 (B), HGF (C), IGFBP-1 (D) e Angiopoetina-1 (E) expressos em densidade média de pixels (MDP). Valores do coeficiente de correlação de Spearman (r) estão discriminados nas figuras. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os pacientes DENV+ foram agrupados segundo contagem de plaquetas acima ou abaixo de 150.000 plaquetas/mm³, e observamos uma diminuição dos níveis de TGF- β 1 ($p=0,028$) e IGFBP-1 ($p=0,057$) no grupo DENV+ trombocitopênico. As análises estatísticas das demais proteínas em relação à contagem de plaquetas não apresentaram diferença (Figura 25).

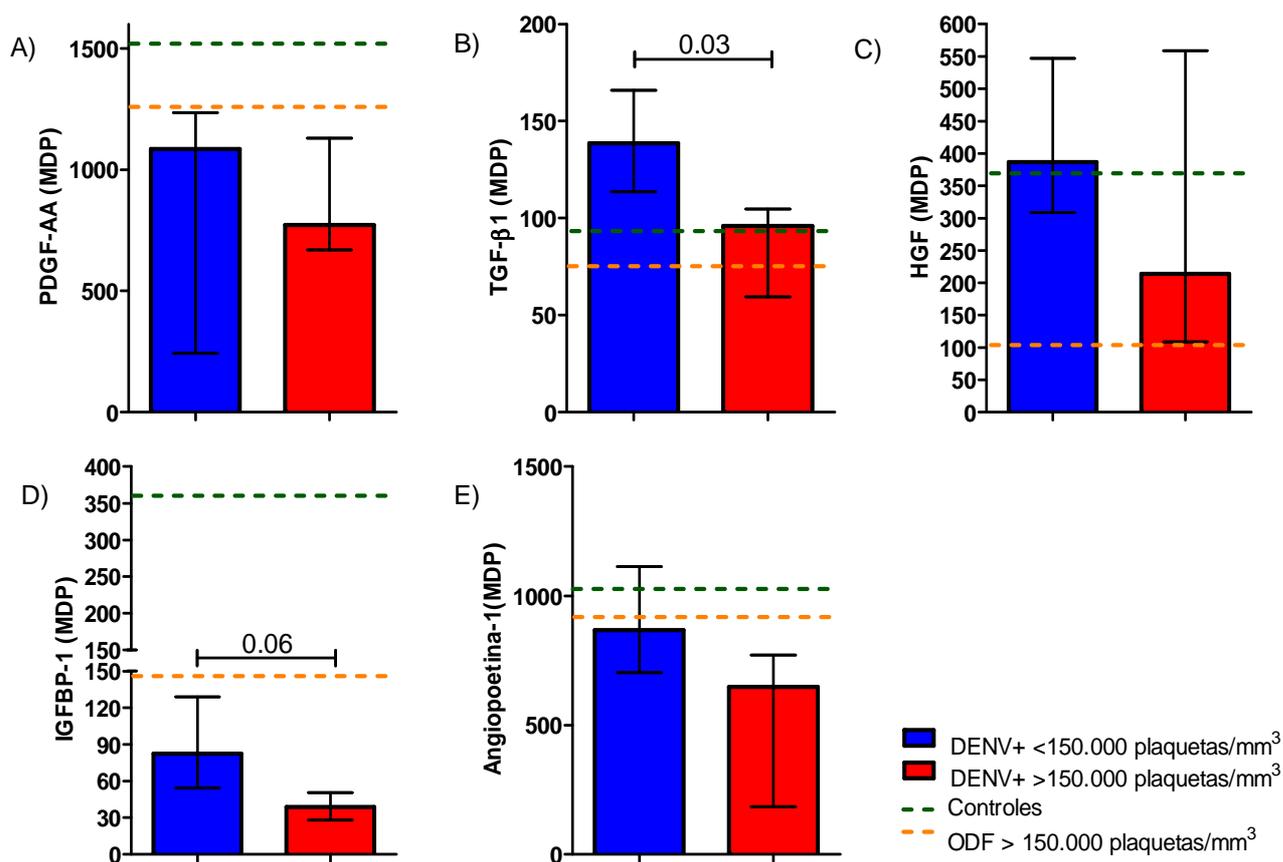


Figura 25: Análise comparativa de proteínas intraplaquetárias de acordo com os grupos de pacientes DENV+ com valores de contagem de plaquetas acima versus abaixo de 150.000/mm³. Quantificação de PDGF-AA (A), TGF-β1 (B), HGF(C), IGFBP-1 (D) e angiopoetina-1 (E) em MDP expresso pela mediana ± interquartis 25 – 75%. Linhas tracejadas representam a média de Controles ($n=2$) e pacientes-ODF ($n=2$). Valores de $p < 0,05$ estão discriminados nas figuras e foram considerados estatisticamente significativos quando comparado pacientes DENV+ com contagem de plaquetas acima versus abaixo 150.000/mm³.

Avaliou-se, em seguida, a relação destas 25 proteínas intraplaquetárias nos pacientes DENV+ agrupados em FD ($n=5$) e FDSA ($n=3$). Apenas a proteína pró-angiogênica angiogenina, apresentou níveis significativamente mais aumentados no grupo FDSA quando comparada aos dos pacientes com FD. Detectamos valores aumentados, não significativamente, da proteína pró-angiogênica e indutora de degradação da matriz extracelular MMP-9 no grupo FDSA. De forma interessante, o grupo FDSA também apresentou níveis mais elevados, não significativos, da proteína que mantém a integridade da matriz extracelular TIMP-1 quando comparado àqueles dos pacientes com FD (tabela5). Uma correlação direta estatisticamente significativa ($r= 0,833$; $p=0,015$) entre os níveis de MMP-9 e TIMP-1 foi observada (Figura 26), indicando uma forte regulação entre proteínas que

induzem degradação, mas também da manutenção da integridade da matriz extracelular.

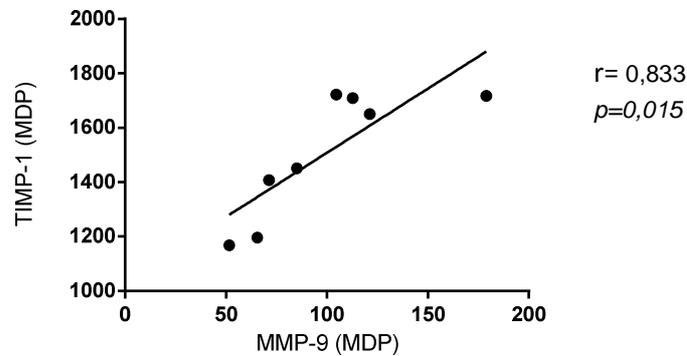


Figura 26: Correlação entre os níveis de TIMP-1 e MMP-9. Valores de p e r estão discriminados na figura e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 5: Comparação das proteínas intraplaquetárias relacionadas à gravidade da dengue

	FD (n = 5)	FDSA (n = 3)	p
Angiogenina	649,66 ± 441,04	1336,75 ± 278,92	0,03
MMP-9	77,23 ± 23,19	134,91 ± 39,04	0,07
TIMP-1	1386,51 ± 219,51	1696,38 ± 39,92	0,07

Quantificação de proteínas intraplaquetárias expressas em MDP e representadas pela média ± desvio-padrão de pacientes DENV+ FD ou FDSA. Valores de p comparando pacientes DENV+ com FD e FDSA estão discriminados.

A análise das 25 proteínas em relação aos dias de doença demonstrou uma única correlação positiva entre os níveis intraplaquetários da proteína pró-angiogênica PD-ECGF com os dias de doença ($r=0,841$; $p= 0,044$) (Figura 27).

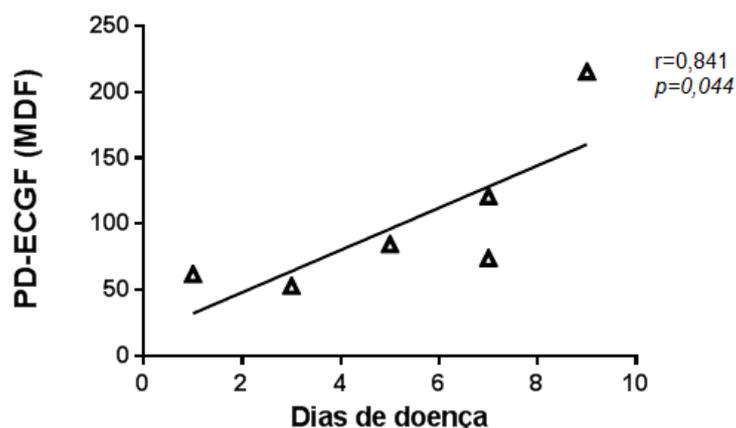


Figura 27: Correlação entre os níveis de PD-ECGF e dias de doença em pacientes DENV+. Valores de p e r estão discriminados na figura. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Também realizamos análises de correlação entre os níveis das 25 proteínas intraplaquetárias com a quantificação sérica de IL-10, TNF- α , IL-1 β , CXCL8/IL-8 e IFN- γ . Somente as correlações que apresentaram valores de r e p estatisticamente significativos estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Correlações estatisticamente significativas encontradas entre os níveis de proteínas intraplaquetárias e séricas em pacientes DENV+.

Proteínas séricas	Proteínas intraplaquetárias	r	p
TNF- α	IGFBP-2	0,780	0,010
TNF- α	IL-1 β	-0,890	0,010
IL-1 β	CD26	0,820	0,030
IL-8	MMP-9	-0,820	0,030
IL-8	PF4	-0,890	0,010
IL-8	MIP-1 α	-0,890	0,010
IL-10	PD-ECGF	-0,940	0,010
IL-10	IL-1 β	-0,820	0,030

Resultados dos testes de correlação de Spearman, cujos valores em negrito de p são inferiores a 0,05.

7.5- Níveis séricos de PDGF-BB e VEGF em pacientes utilizados no ensaio de expressão de proteínas intraplaquetárias

Os resultados encontrados no ensaio de perfil de expressão de proteínas intraplaquetárias nos motivaram a quantificar níveis séricos de PDGF-BB e VEGF em amostras de soros dos mesmos pacientes ODF e DENV, além de 6 amostras de controles sadios.

Os achados revelam que pacientes DENV+ apresentam níveis séricos medianos significativamente mais baixos ($p = 0,0047$) quando comparados aos controles em relação ao PDGF-BB (713,65 pg/ml [268,18- 1397,23] *versus* 1620,373 pg/ml [1085,20- 1903,39], respectivamente), enquanto detectamos valores medianos mais altos de VEGF no grupo controle em relação ao grupo DENV+ (72,09 pg/ml [22,10- 105,33] *versus* 713,65 pg/ml [0,00- 295,88] respectivamente) (Figura 28).

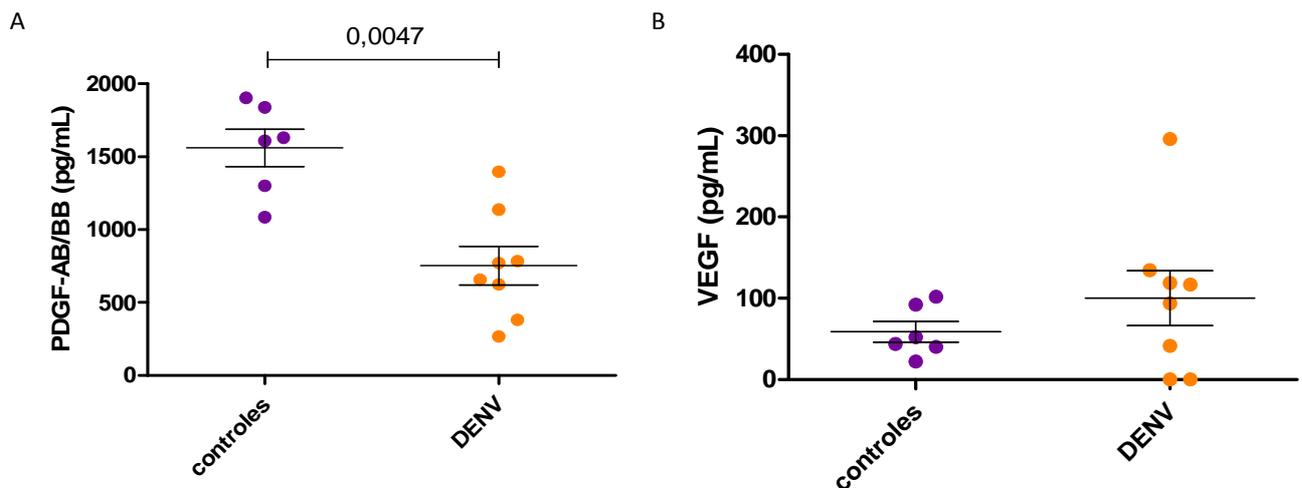


Figura 28. Quantificação de PDGF-AB/BB e VEGF em pacientes DENV+ e controles. PDGF-AB/BB (A) e VEGF (B) expresso pela mediana \pm interquartil 25 – 75%, de 8 pacientes DENV+ e 6 controles. Valores de $p < 0,05$ estão discriminados nas figuras e foram considerados estatisticamente significativos quando comparados pacientes DENV+ *versus* controles.

Dentro do grupo de pacientes DENV+, as análises de correlação entre os valores de PDGF-AB/BB e VEGF séricos e contagem de células do sangue destes pacientes mostraram que apenas os níveis séricos de PDGF-AB/BB tiveram correlação direta com a contagem de plaquetas (Figura 29). Não observamos

correlações significativas entre as duas moléculas e contagens absolutas de leucócitos, linfócitos e monócitos totais.

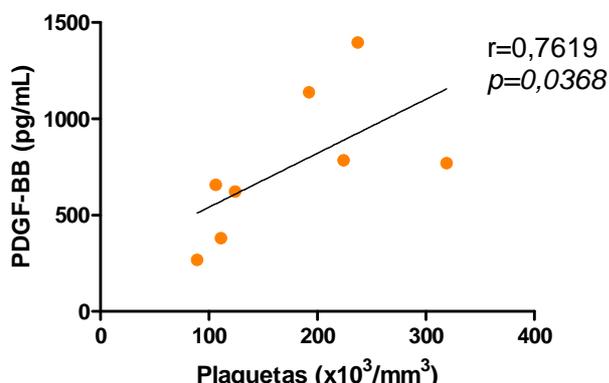


Figura 29. Correlação entre níveis séricos de PDGF-AB/BB e a contagem de plaquetas em 8 pacientes DENV+. Valores de p e r são discriminados quando $p < 0,05$.

Após estratificação dos pacientes DENV+ em relação à contagem de plaquetas (acima e abaixo de 150.000 plaquetas/ mm^3), os níveis de PDGF-AB/BB e VEGF foram mais baixos no grupo DENV+ trombocitopênico, porém apenas em relação aos níveis de PDGF-BB as diferenças foram estatisticamente significativas ($p=0,0286$) (Figura 30).

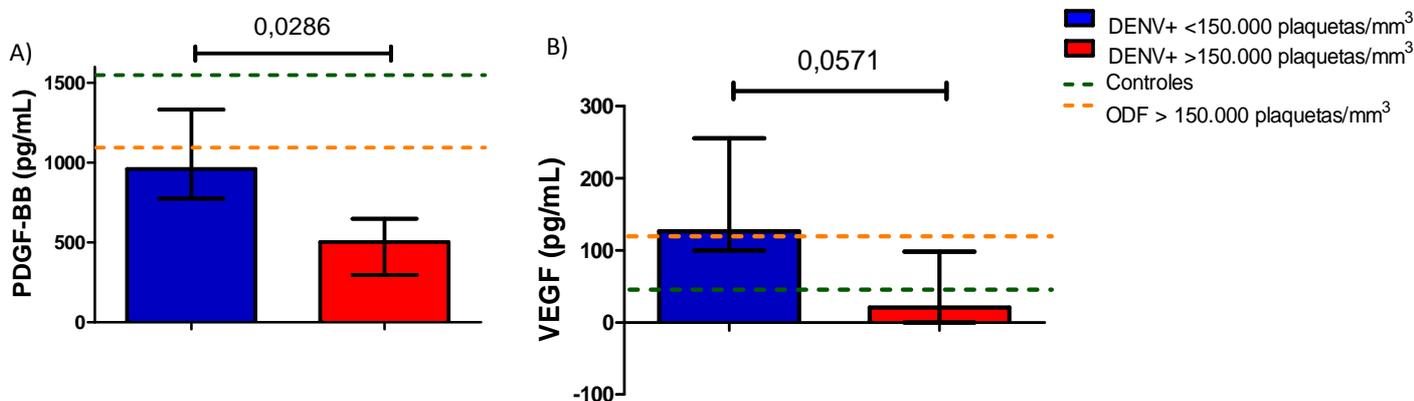


Figura 30: Análise comparativa de PDGF-AB/BB e VEGF de acordo com os grupos de pacientes DENV+ definidos com base na contagem de plaquetas acima versus abaixo de $150.000/\text{mm}^3$. Quantificação de PDGF-AB/BB (A) e VEGF (B) expresso pela mediana \pm interquartis 25 – 75%. Linhas tracejadas representam a média de Controles ($n=6$) (em verde) e pacientes-ODF ($n=2$) (em amarelo). Valores de $p < 0,05$ estão discriminados nas figuras e foram considerados estatisticamente significativos quando comparado pacientes DENV+ contagem de plaquetas acima versus abaixo $150.000/\text{mm}^3$.

Foram realizados testes de correlação da quantificação sérica de PDGF-AB/BB e VEGF com os níveis das 25 proteínas intraplaquetárias. Vimos apenas que os níveis de PDGF-AB/BB sérico tinham correlação direta com os níveis intraplaquetários de TGF- β 1 ($r=0,730$; $p=0,040$).

7.6 - Análise da regulação funcional entre proteínas intraplaquetárias em pacientes infectados pelo DENV

Na análise das 25 proteínas que apresentaram spots, vemos que cada uma delas cumpre diferentes funções biológicas. A fim de investigar possíveis mecanismos de autorregulação entre as funções das proteínas intraplaquetárias foram calculadas as razões entre os níveis para cada uma delas, utilizando-se como parâmetros funções biologicamente antagônicas (por exemplo, anti- *versus* pró-angiogênica, anti- *versus* pró-coagulante, anti- *versus* pró-inflamatória, reguladora da integridade da matriz extracelular *versus* indutora de degradação da matriz extracelular e outras). Dentre as diversas tentativas, a razão TGF- β 1/MIP-1 α foi diminuída em pacientes DENV+ com contagem de plaquetas abaixo de 150.000/mm³, indicando que esses pacientes apresentam um déficit da regulação de processos reguladores da inflamação. Em contrapartida, as razões anti - *versus* pró-angiogênica serpina F1/angiopoetina-1 e serpina F1/ PDGF-AB/BB apresentaram níveis estatisticamente aumentados em pacientes DENV+ com contagem de plaquetas abaixo de 150.000/mm³, indicando que esses pacientes diminuem a regulação de processos anti-angiogênicos (Figura 31).

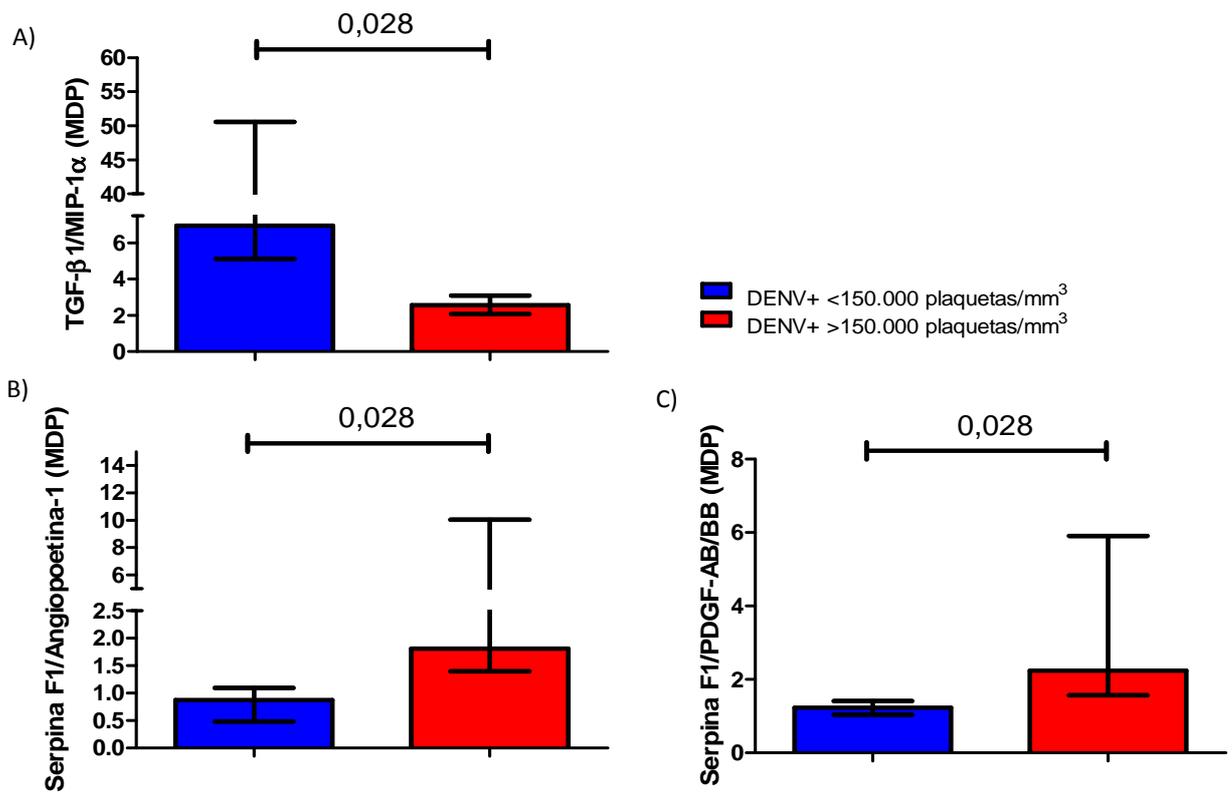


Figura 31: Regulação das funções de proteínas intraplaquetárias. Razões entre de TGF- β1/ MIP-1α (A), Serpina-F1/ Angiopoetina-1 (B) e Serpina-F1/PDGF-AB/BB (C) em MDP expresso pela mediana ± interquartis 25 – 75% de pacientes DENV+ com contagem de plaquetas acima *versus* abaixo de 150.000/mm³. Valores de p <0,05 estão discriminados nas figuras e foram considerados estatisticamente significativos.

8. Discussão

8.1 Análise comparativa dos parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes infectados pelo DENV-4 durante a epidemia de 2013

Neste estudo realizado em 2013 participaram da coorte 43 pacientes com diagnóstico confirmado de infecção pelo DENV, sendo que 90% (18/ 20) das amostras que tiveram confirmação pelo RT-PCR foram positivas para o sorotipo DENV-4. Esse dado indica uma característica particular deste grupo, uma vez que estamos num quadro de reintrodução do DENV-4 no país, desde 2010, com uma população susceptível a esse vírus e que já convive com a transmissão dos outros três sorotipos. Em princípio, esse quadro aumentaria o risco de ocorrência de casos mais graves da doença na população não imunizada. No entanto, nossos dados indicaram que a prevalência de DENV-4 em 2013 resultou em 76,7% de casos FD e 23,3% de FDSA, sem qualquer caso grave, segundo a classificação de gravidade clínica da OMS (2009). Comparando esses dados com os da epidemia anterior, realizado pela nossa equipe no Hospital Rio-Laranjeiras, em 2011, tivemos prevalência dos sorotipos DENV-1 em 69% e DENV-2 em 12,5% dos pacientes. Nesta coorte, nenhum dos casos confirmados apresentou manifestações hemorrágicas leves ou graves, sintomas/sinais de extravasamento vascular ou qualquer outra manifestação clínica associada à gravidade, sendo todos considerados como FD. Contudo, 44% deles relataram vômitos ou dor abdominal persistentes. Um dos pacientes apresentou contagem de plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$ e dois pacientes foram internados: um apresentou vômitos e dor abdominal persistentes, aumento das transaminases e contagem de plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ no dia da internação. O segundo paciente internado apresentou perda de consciência (manifestação neurológica) (de Oliveira, 2012). O conjunto desses dados indica que, de forma surpreendente, a reintrodução do sorotipo DENV-4 não resultou numa maior ocorrência de casos graves.

Thomas e colaboradores realizaram estudo retrospectivo de 2005 a 2010 comparando sinais e sintomas de 715 pacientes (entre 14-91 anos) infectados por diferentes sorotipos virais. Pacientes infectados pelo sorotipo DENV-2 foram em sua maioria infecções secundárias, admitidos na fase crítica da doença, com sinais

de extravasamento plasmático. As infecções pelo sorotipo DENV-1 levaram a uma gravidade intermediária, sem extravasamento plasmático evidente. Nesta série, infecções pelo sorotipo DENV-4 foram mais frequentes e, similar aos nossos achados, os pacientes tiveram uma apresentação clínica mais branda. De forma consistente, esses dados confirmam a existência de diferenças em relação à virulência entre os sorotipos (Thomas et al., 2014).

O próximo passo foi verificar o impacto da infecção pelo DENV-4 nas alterações hematológicas dos pacientes, relacionando-o aos achados anteriores de nossa equipe. De forma similar, se compararmos a contagem de plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$ em todos os casos DENV, independente da forma clínica, veremos que em 2013 com DENV-4 foi de $157,9 \pm 55$, em 2011 com DENV-1 e DENV-2 foi de $157,0 \pm 51,0$. Embora não tenhamos realizado uma análise estatística entre as duas epidemias, fica claro que, independente do quadro clínico, o sorotipo DENV-4 não induziu trombocitopenia mais acentuada se comparada aos outros sorotipos virais.

Alguns estudos mostram que no início da doença, tanto por infecções primárias quanto secundárias, ocorre uma queda na contagem de leucócitos concomitantemente a queda de linfócitos T e ao aumento de linfócitos atípicos, que podem estar relacionados ao processo de supressão da medula óssea durante a fase aguda da doença (Jameel et al. 2012). Na epidemia de 2011 com sorotipos distintos, observamos tanto leucopenia como linfopenia nos pacientes DENV+ se comparado aos controles. De forma interessante, considerando todos os casos DENV, a contagem de leucócitos, linfócitos e monócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$ durante a epidemia de 2013 com DENV-4 foi de 4.662 ± 2.669 , $1.210,0 \pm 845,9$ e $307,2 \pm 227,6$, respectivamente, se comparado à epidemia de 2011 com DENV-1 e DENV-2 que foi de $4.250,0 \pm 1.750,0$, $1.330,0 \pm 670,0$ e $160,0 \pm 100,0$, respectivamente, indicando que, mesmo sem uma análise estatística desses dados, a infecção pelo DENV-4 não alterou fortemente as contagens das subpopulações celulares periféricas se comparadas à epidemia de DENV-1 e DENV-2, embora possamos observar uma contagem de monócitos menos acentuada na infecção pelo DENV-4 ($307,2 \pm 227,6$) comparado aos DENV-1 e -2 ($160,0 \pm 100,0$).

O diagnóstico laboratorial destes pacientes foi confirmado majoritariamente pela detecção sorológica de anti-DENV IgM, seguido do ensaio de RT-PCR, sendo a detecção sorológica do antígeno NS1 circulante o teste que menos gerou

resultados positivos para pacientes DENV+. Segundo Guzman e colaboradores, grupos de pacientes DENV+ com infecções secundárias, apresentam menores taxas de detecção do antígeno NS1 quando comparados aos pacientes com infecções primárias. Uma hipótese que explica este fato é que respostas de IgG geradas contra essa glicoproteína durante a infecção primária pelo DENV geram a formação de complexos imunes circulantes nas infecções secundárias, reduzindo assim a quantidade de NS1 livre circulante nestas últimas (Guzman et al., 2010). Logo, nossos resultado de NS1 indicam que os pacientes devem ter apresentado, em sua maioria, infecções secundárias.

8.2 Aumento dos níveis séricos dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α e CXCL8/IL-8 e regulação da inflamação pelo aumento de IL-10 em pacientes infectados pelo DENV. Possíveis impactos na plaquetopenia?

Dengue, nas suas diferentes manifestações clínicas, é uma doença em parte relacionada à desregulação da resposta imunológica que inclui uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como uma resposta cruzada de células imunes levando à diminuição do *clearance* viral e, até mesmo, a um aumento da infecção por mecanismo dependente de anticorpos heterólogos. Parte da desregulação da resposta imunológica estaria implicada com aparecimento de manifestações clínicas brandas, mas por outro lado, também estaria diretamente envolvida com a patogênese da doença (Rathakrishnan et al., 2012; Vervaeke, Vermeire, & Liekens, 2014).

Neste estudo, demos ênfase a rede de citocinas/quimiocinas e suas múltiplas vias regulatórias que são moduladas na dengue por um processo altamente complexo, mas ainda não elucidado. Estudos mostram que estes mediadores apresentam uma produção distinta nas diferentes fases da doença e, ainda, de acordo com a gravidade clínica. Neste contexto, pacientes FD e FDSA foram comparados nas fases febril, defervescência e convalescência em estudo de Rathakrishnan e colaboradores (2012). Em relação aos níveis de IL-1 β e TNF- α , houve uma tendência a baixos níveis na fase febril nos grupos FD e FDSA, com um pico na fase de defervescência. Quanto à secreção da citocina anti-inflamatória IL-

10, os autores observaram nos FD níveis aumentados nas fases febril e de defervescência, com queda brusca na fase de convalescência. Nos FDSA, os níveis de IL-10 mantiveram-se altos nas três fases na doença. As quantificações das quimiocinas demonstraram que a CXCL8/IL-8 teve um pico de produção na fase de defervescência no grupo FDSA, CCL2/MCP-1 na fase febril nos dois grupos, CXCL10/IP-10 manteve-se alta nas três fases nos dois grupos e CCL5/RANTES mostrou-se alta na fase febril nos dois grupos, com queda na fase de defervescência. Esses dados indicam a complexidade do sistema, o perfil diferencial de regulação dessas moléculas segundo uma cinética e o estágio da doença (Rathakrishnan et al., 2012).

Nós realizamos a quantificação de citocinas e quimiocinas, na maioria dos casos na fase febril, e, com exceção da IL-1 β e IFN- γ , IL-10, TNF- α e CXCL8/IL-8 tiveram níveis aumentados nos pacientes em relação aos controles. Através de análises de correlação, parece que CXCL8/IL-8 e IFN- γ são produzidas nos dias iniciais da infecção. Existe toda uma discussão ao redor do papel dessas moléculas na dengue, mas o fato é de que estas estão presentes e são autoreguladas positiva- ou negativamente umas pelas outras em algum(s) momento(s) da infecção. A grande questão é o porquê e com que finalidade se tem essas moléculas na infecção natural pelo DENV.

Existe uma carência de trabalhos científicos que comparam a produção de citocinas e quimiocinas em resposta aos diferentes sorotipos DENV ou ainda durante a segunda, terceira ou quarta reinfecção heterotípica. Nosso grupo vem há algum tempo avaliando a produção de citocinas circulantes em pacientes brasileiros infectados por diferentes sorotipos virais. Neste contexto, em uma coorte de pacientes predominantemente infectados pelos sorotipos DENV-1 e -3 e majoritariamente com infecção primária, observamos que os níveis de TNF- α , CXCL8/IL-8 e IFN- γ se mostraram aumentados nos pacientes em relação aos controles. Neste mesmo trabalho, foi observada correlação inversa entre os níveis de CXCL8/IL-8 e contagem de plaquetas (Bozza et al., 2008). Em um estudo de outra epidemia de DENV-1 e -2, com a maioria dos casos sendo de casos primários, demonstramos aumento dos níveis de IL-10, TNF- α e IFN- γ em pacientes DENV+ se comparados aos controles. Neste mesmo trabalho, níveis de IL-10 mostraram correlação inversa com a contagem de plaquetas (Azeredo et al., 2001).

Aproveitando-se da situação epidemiológica da dengue em Cuba, em 1977-2001, Sierra e colaboradores (2012) abordaram a resposta de células T de memória de reatividade cruzada, medindo a expressão do RNA mensageiro de dois mediadores pró-inflamatórios, TNF- α e IFN- γ e dois mediadores da resposta imunorregulatória, TGF- β e IL-10. Para isso, foram avaliadas células mononucleares do sangue periférico de pessoas com diferentes perfis de infecção prévia pelo DENV (não-ímmunes, ímmunes para um único sorotipo, dois ou três sorotipos) após estimulação *in vitro* com o DENV-1, DENV-2 ou DENV-3 (Sierra et al 2012). Resumidamente, o mRNA das citocinas da resposta pró-inflamatória foi maior nos indivíduos que tiveram infecção primária para DENV-1 e DENV-3, mas muito maior para DENV-2 comparado aqueles não-ímmunes. Já nas infecções secundárias, as PBMCs apresentaram maior expressão de mediadores pró-inflamatórios em resposta a um sorotipo heterólogo. De forma surpreendente, PBMCs oriundas de pessoas que já tiveram infecção prévia por três sorotipos distintos demonstraram uma resposta Th1 mais branda para o sorotipo heterólogo. Esse achado é consistente com a observação de que há um aumento da imunidade protetora e desenvolvimento de uma forma clínica mais branda após reinfecções sequenciais (Alvarez et al., 2006; Gibbons et al., 2007). A expressão de IL-10 nos indivíduos previamente infectados por três sorotipos também é mais baixa, isso porque como há uma diminuição da resposta pró-inflamatória, não há necessidade de uma forte resposta regulatória mediada pela IL-10 (Sierra et al., 2014).

A citocina IL-10, produzida majoritariamente por monócitos, macrófagos e células B ativadas, foi originalmente chamada de fator inibidor de síntese de citocinas. Trata-se de uma citocina de perfil Th2 que exibe propriedades antiinflamatórias, incluindo inibição da secreção de mediadores imunológicos, diminuição da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e de moléculas de coestimulação na superfície de linfócitos T (Opal et al., 1998). De fato, viu-se que o tratamento *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico de pacientes DENV+ com anticorpos bloqueadores anti-IL-10 levou ao aumento dos níveis das citocinas anti-virais TNF- α e IFN- γ (Malavigne et al., 2013). Outro estudo utilizando linhagens de macrófagos humanos demonstrou que a exposição destas células à IL-10 levava à inibição da produção de citocinas como IL-1 α , IL-6 e TNF- α por macrófagos ativados (Fiorentino, Bond, & Mosmann, 1989).

Em pacientes DENV+, os níveis séricos de IL-10 foram correlacionados positivamente com a frequência de linfócitos T CD4+ expressando o marcador de apoptose anexina V, mas não com T CD8+, sugerindo que níveis elevados de IL-10 estão relacionados à apoptose de linfócitos T CD4+ e, portanto a uma deficiência na capacidade imunológica e, conseqüentemente, persistência da infecção. Contudo, após incubação das PBMCs de três doadores saudáveis, com histórico anterior de dengue, com diferentes concentrações de IL-10 recombinante humana não foi encontrada diferença na expressão de anexina V. Portanto, a relação causal entre o aumento de IL-10 circulante e apoptose de células T ainda precisa ser mais bem explorada (Malavigne et al., 2013).

Um dado bastante interessante sobre o impacto da IL-10 na dengue é a sua participação na ADE. Assim, estudos sobre as vias bioquímicas deste fenômeno biológico foram realizados em linhagens monocíticas que demonstraram que a facilitação da entrada viral via receptores Fcγ levaria à ativação de proteínas quinase PKA/PI3K/PKB que ativam o elemento de resposta à ligação de adenosina monofosfato cíclico (CREB). A ativação de CREB, por sua vez, controla a produção de IL-10, fazendo com que a ADE seja responsável pelo aumento de IL-10 (Tsai et al., 2013; Tsai et al., 2014).

Ainda em pacientes DENV+, um estudo a partir das características clínicas e laboratoriais de pacientes venezuelanos na forma mais grave da dengue, a FHD, realizou avaliação por métodos estatísticos de seleção para identificar variáveis importantes que gerem modelos estáveis com previsões precisas e viés mínimo para previsão das formas graves da dengue. Assim, os resultados do grupo sugeriam que a contagem de plaquetas e linfócitos e os níveis circulantes de IL-10 são as principais características para a previsão de dengue FHD com base na análise química do sangue e medidas de citocinas (Ju & Brasier, 2013).

A citocina TNF- α , produzida por fagócitos mononucleares, neutrófilos, linfócitos e células NK, interage com células endoteliais e promove a indução de moléculas de adesão, como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (Commins et al., 2010). Na dengue, esta citocina parece estar envolvida no dano vascular, como demonstrado por Dewi e colaboradores que observaram aumento na permeabilidade e alterações morfológicas em células endoteliais tratadas *in vitro* com TNF- α . Isto ocorre, pois TNF- α leva à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aumento da expressão de moléculas de adesão e apoptose

de células endoteliais (Dewi, et al., 2004; Vervaeke, Vermeire, & Liekens, 2014). Ainda, os níveis de TNF- α se relacionam às manifestações hemorrágicas. Estudos de polimorfismo no alelo 308 do gene TNF- α em pacientes DENV+ levaram à conclusão de que pacientes portadores do genótipo GG tem significativamente mais manifestações hemorrágicas do que pacientes com genótipo GA, confirmando TNF- α como um fator de predição para o desenvolvimento das formas graves da dengue (Chuansumrit et al., 2013).

CXCL8/IL-8 é uma quimiocina produzida por macrófagos/monócitos, células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais e neutrófilos. Na dengue, níveis plasmáticos de CXCL8/IL-8 se correlacionam com a degranulação de neutrófilos, levando ao aumento dos níveis de elastase. Esta enzima, por sua vez, pode induzir dano endotelial e ativação do sistema complemento e do sistema fibrinolítico (Juffrie et al., 2000; Matsushima & Oppenheim, 1989; Detmers et al., 1990). Nesse sentido, a literatura vem apontando forte correlação entre os níveis circulantes de CXCL8/IL-8, juntamente com o TNF- α , como potentes indicadores de gravidade. De fato, estudos em pacientes DENV+ demonstraram relação entre os níveis circulantes de CXCL8/IL-8 com trombocitopenia, infecções secundárias, aumento da permeabilidade vascular, aumento do hematócrito, presença de derrame pleural ou ascite, aumento das transaminases (Vervaeke, Vermeire, & Liekens 2014, Priyadarshini et al., 2010). Ainda, a produção de CXCL8/IL-8 parece ser dependente da infecção pelo DENV, IL-1 β , TNF- α e de toda uma rede de citocinas (Talavera et al., 2004; Butthep et al., 2012). Também foi demonstrado que os pacientes que apresentavam níveis aumentados de TNF- α , passado o período da viremia, apresentaram aumento nos níveis de CXCL8/IL-8, corroborando a hipótese de que tanto o DENV quanto TNF- α podem induzir a produção de CXCL8/IL-8 (Raghupathy et al., 1998).

IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que tem reconhecida ação antiviral durante as infecções (Chisari, 1997). Estudos utilizando PBMCs de pacientes DENV+ levantaram a hipótese de que a indução da produção de IFN- γ pode ocorrer em células NK ou outros tipos celulares por vias dependentes ou independentes de IL-12. Por sua vez, o IFN- γ induz macrófagos e células endoteliais a produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1, resultando em disfunção dos processos hemodinâmicos como a alteração da permeabilidade vascular (Azeredo, 2001).

Com base em dados da literatura duas hipóteses principais, a supressão medular e a destruição periférica de plaquetas, explicariam a plaquetopenia na dengue. Nas duas hipóteses, citocinas/quimiocinas produzidas por diversos tipos celulares estariam potencialmente envolvidas no desenvolvimento da plaquetopenia (Hottz et al., 2011) e na regulação de outras subpopulações celulares.

Nossos dados demonstraram correlação inversa entre os níveis plasmáticos de IL-10 e a contagem de plaquetas, leucócitos, linfócitos e monócitos nos pacientes DENV+ estudados, independente dos dias de infecção ou do quadro clínico. Esses dados corroboram estudos anteriores de nosso grupo sobre a correlação inversa entre os níveis plasmáticos de IL-10 e a contagem de plaquetas, aumento nos níveis de IL-10 na plaquetopenia, e diminuição de IL-10 no reestabelecimento da contagem de plaquetas (Azeredo et al., 2001).

A influência de IL-10 sobre a terapia de diversas doenças, inclusive as autoimunes, vem sendo avaliada, contudo, a queda na contagem de plaquetas é um efeito adverso constantemente observado, o que limita seu uso clínico. Sosman e colaboradores (2000) realizaram ensaio clínico administrando IL-10 recombinante (rIL-10) em voluntários sadios e observaram uma queda na contagem de plaquetas. Um fato interessante é que, com a interrupção da administração de rIL-10, a contagem de plaquetas foi reestabelecida. Neste modelo, a hipótese de destruição periférica de plaquetas foi descartada, uma vez que a sobrevida e o sequestro de plaquetas no baço dos voluntários tratados ou não com rIL-10 foram os mesmos. Assim, uma vez que IL-10 regula negativamente a produção de fatores, como GM-CSF e IL-3, que regulam o desenvolvimento das células progenitoras hematopoéticas, a causa principal neste modelo foi a deficiência na formação de plaquetas (Sosman et al., 2000). Em um estudo prévio, nosso grupo demonstrou que pacientes brasileiros infectados pelo DENV apresentavam níveis significativamente maiores de GM-CSF comparados aos controles. Níveis de GM-CSF foram maiores em pacientes com a forma grave quando comparado àqueles com FD. Portanto, é possível que IL-10 regule a produção de GM-CSF e, conseqüentemente, o desenvolvimento das células progenitoras hematopoiética (Bozza et al., 2008).

Ainda, nossos dados demonstraram que os níveis de IFN- γ , mesmo sem diferença estatística entre os grupos controles e pacientes DENV+, foram correlacionados positivamente com a contagem de plaquetas. Um estudo *in vitro* revelou a expressão do receptor IFN- γ em linhagens de células CD34+ precursoras dos megacariócitos e que a adição de IFN- γ induz maturação dessas células (Muraoka et al., 1997). Portanto, em relação à plaquetopenia da nossa coorte de pacientes DENV-4, é possível que baixos níveis de IFN- γ interfiram na maturação de megacariócitos, levando a uma queda na produção de novas plaquetas.

Diferente da IL-10 e IFN- γ , não observamos correlação entre os níveis de TNF- α e a contagem de plaquetas, mas encontramos correlação inversa com a contagem de linfócitos totais. De forma similar, estudos em megacariócitos e plaquetas humanas mostraram que TNFR1, TNFR2, ambos receptores para TNF- α , estão presentes em megacariócitos, mas não em plaquetas. Foi demonstrado também que TNF- α age como inibidor do crescimento de células progenitoras, já que células progenitoras CD34+ incubadas com trombopoetina, o principal mediador da produção de megacariócitos e plaquetas, tem seu crescimento inibido na presença de TNF- α (Tacchini-Cottier et al., 1998; Ramsfjell et al., 1997).

Dado bastante interessante sobre o envolvimento de citocinas nas plaquetas vem do estudo de pacientes com trombocitopenia imune, na qual há queda na contagem de plaquetas por etiologia autoimune e na qual foram demonstrados níveis elevados de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) nestes pacientes quando comparados aos controles sadios. Por outro lado, níveis de citocinas de perfis Th1 (IFN- γ , IL-2), Th17 (IL-17) e T reguladoras (TGF- β 1) foram diminuídas nestes pacientes (Ma et al., 2014). Assim, esses dados vão de encontro aos nossos resultados encontrados em pacientes DENV+, com aumento de IL-10 e diminuição de IFN- γ em pacientes com contagem de plaquetas menor que 150.000/mm³.

Assim, nossa coorte de pacientes infectados predominantemente pelo DENV-4 durante a epidemia de 2013, no Rio de Janeiro, teve um perfil de produção de citocinas semelhante às demais epidemias brasileiras, em relação ao aumento dos níveis séricos de TNF- α e CXCL8/IL-8 e da IL-10. Contudo, o perfil de IFN- γ se mostrou diferente. Juntos, esses dados poderiam indicar, em nível de perfil de produção de citocinas, uma infecção com características clínicas mais brandas. De alguma forma, todas as citocinas estudadas estariam envolvidas de maneira direta

ou indireta na contagem de plaquetas e/ou de outras subpopulações celulares, seja pela supressão da medula óssea levando à inibição da geração de novas plaquetas e/ou novas células ou ainda, pela destruição periférica de plaquetas e demais células de origem hematopoiéticas em resposta à infecção pelo DENV.

8.3 Envolvimento das proteínas intraplaquetárias na plaquetopenia de pacientes infectados pelo DENV

Em nossa coorte de pacientes, proteínas intraplaquetárias como TGF- β 1, PDGF-AA, angiopoetina-1, IGFBP-1 e HGF tiveram correlação direta com a contagem de plaquetas circulantes. Ainda, no grupo de pacientes DENV+ com plaquetopenia, com exceção do PDGF-AA, as demais proteínas intraplaquetárias apresentaram níveis diminuídos quando comparado com os níveis dos pacientes sem plaquetopenia. Diante desses dados, nossa hipótese é de que estas proteínas teriam um forte papel na contagem e funcionalidade de plaquetas em pacientes DENV+.

PDGF é um fator de crescimento que é produzido majoritariamente por plaquetas. Trata-se de um fator de reconhecida importância na hemostasia, que vem ganhando espaço na inflamação (Kaltalioglu & Coskun-Cevher, 2014). Estudos em camundongos com deleção para os genes que expressam PDGF-B e seu receptor PDGF- β (PDGFR β) revelaram que, na ausência de PDGF-B, esses animais apresentavam anormalidades hematológicas, cardiovasculares e renais. Dentro das anormalidades hematológicas encontradas, observou-se que a contagem média de plaquetas nos animais selvagens era de 345.000/mm³ enquanto que nos camundongos nocauteados este número era reduzido para 178.000/mm³ (Levéen, 1994).

TGF- β 1 é um polipeptídeo altamente conservado que pode tanto estimular quanto inibir o recrutamento e crescimento de uma variedade de tipos celulares, incluindo leucócitos (Roberts et al., 1985). Este peptídeo é produzido por vários tipos celulares, incluindo plaquetas, células da medula óssea e linfócitos T e já foi comprovada por imunohistoquímica a sua localização em áreas de hematopoese ativa, como medula óssea e fígado fetal (Ellingsworth et al., 1986). Estudos em

pacientes com anemia aplástica, doença caracterizada pela perda acentuada do tecido hematopoético da medula óssea e pancitopenia no sangue periférico, revelaram que níveis séricos de TGF- β 1 têm correlação direta tanto com a contagem de plaquetas quanto de leucócitos totais destes pacientes (Rizzo et al., 1999). Estudo *in vitro* demonstrou que a adição de TGF- β 1 a uma cultura primária de células-tronco hematopoéticas murinas, de alto potencial proliferativo, resultou na inibição do crescimento dessas células de forma dose-dependente (Keller et al., 1990).

IGFBPs são proteínas de alta afinidade com IGF. De fato, quase todo o IGF circulante está complexado as IGFBP. A clivagem deste complexo resulta na liberação de IGF para que se ligue a seu receptor, que é encontrado em diversos tipos celulares, como células endoteliais, aumentando a absorção de aminoácidos e glicose e realizando a manutenção das junções célula-célula (Bach, 2014). Estudos *in vitro* revelaram expressão alta de IGFBP-1 nas células mesenquimais humanas do estroma da medula óssea e do cordão umbilical quando comparado às células não-mesenquimais (Wagner, 2007). Demonstrou-se por trabalhos *ex vivo* de co-cultura entre células-tronco hematopoéticas e linhagens de células endoteliais de microvasculatura que a adição de IGFBP-3 exógeno levava a um aumento do crescimento de células CD34+ por um mecanismo dose-dependente (Liu et al., 2003). Devido ao seu papel na proliferação de células progenitoras hematopoéticas, as IGFBPs poderiam ter também um papel na formação de megacariócitos, contudo maiores estudos são necessários para esclarecer a real atuação desta molécula na formação de plaquetas.

Angiopoetina-1 é uma molécula produzida, em parte, por plaquetas, mas também por células musculares. Esta proteína mantém o estado de repouso do endotélio e estabiliza as junções aderentes das células endoteliais via ativação de seu receptor tirosina quinase endotelial (Tie-2). Um estudo com pacientes DENV+ demonstrou que ocorre queda nos níveis séricos de angiopoetina-1 em pacientes DENV+ quando comparados aos controles saudáveis. Devido à capacidade de produção e estoque de angiopoetina-1 pelas plaquetas, os autores atribuíram os baixos níveis de angiopoetina-1 à queda da contagem de plaquetas destes pacientes (Michels et al., 2012). Experimentos com células-tronco hematopoéticas (células CD34+) de camundongos que expressam Tie-2 incubadas com

angiopoetina-1 exógeno revelaram que angiopoetina-1 induziu a adesão das células-tronco hematopoiéticas ao osso e a manutenção do seu estado quiescente (Zapf, 1984). Com isso, temos que a correlação direta dos níveis de angiopoetina-1 com a contagem de plaquetas observada nos pacientes DENV+ pode estar contribuindo para a inibição da maturação de megacariócitos.

Estudo *in vitro* utilizando cultura primária de hepatócitos de camundongos demonstrou que o HGF levava ao aumento da expressão de RNA mensageiro da TPO, que é o principal fator de maturação de megacariócitos. De forma interessante, o tratamento de animais cirróticos e trombocitopênicos com HGF recombinante levou ao aumento dos níveis séricos de TPO e também da contagem total de plaquetas (Yamashita, 2000). Contudo, na dengue, estudos com pacientes revelaram que os níveis de TPO e a contagem de plaquetas têm correlação indireta (Matondang et al., 2004; Cardier et al., 2006). Logo, vemos que a hipótese da etiologia da plaquetopenia em pacientes DENV+ não pode ser explicada pela diminuição dos níveis de TPO, mas pode ser devida à diminuição dos níveis intraplaquetários de HGF, sendo necessários maiores estudos que comprovem a participação de HGF independente de TPO na plaquetopenia.

De acordo com os nossos resultados e com base na literatura científica disponível, vemos que as correlações diretas entre a contagem total de plaquetas e os níveis intraplaquetários de PDGF, TGF- β 1, IGFBP-1, angiopoetina e HGF nos levam à hipótese de que a queda nos níveis destes fatores pode prejudicar a formação de novas plaquetas. Contudo, muitos estudos ainda são necessários para afirmar o real papel de cada uma destas moléculas nas várias fases do processo de produção, maturação e/ou funcionalidade plaquetária.

8.4 Diminuição dos níveis intraplaquetário e sérico de mediadores envolvidos na manutenção da integridade endotelial vascular na dengue: impacto da plaquetopenia.

Sabe-se que as plaquetas são potenciais responsáveis pela manutenção da integridade vascular devido, em parte, à liberação constitutiva de citocinas pró-angiogênicas e fatores de crescimento que estabilizam as junções aderentes intercelulares endoteliais (Nachman & Rafii, 2008). Neste contexto, nossas análises

trazem novas discussões sobre a participação das plaquetas na permeabilidade vascular da dengue.

Nossos dados demonstraram níveis séricos diminuídos de PDGF-BB e VEGF em pacientes DENV+ como menos de 150.000 plaquetas/mm³ comparado aqueles com mais de 150.000 plaquetas/mm³. Estes dois fatores de crescimento são produzidos por plaquetas e estão intimamente relacionados à estabilidade endotelial (Andia & Abate, 2012). No caso do VEGF, este precisa se ligar a seu receptor solúvel sVEGFR-1 para, em seguida, se ligar ao seu receptor endotelial VEGFR-2, levando à desestabilização endotelial. Estudos com pacientes DENV+ indicaram aumento dos níveis de VEGFR-1 solúvel, diminuição de VEGFR-2 solúvel e dos níveis de VEGF circulantes quando comparados aos controles sadios (Seet et al., 2009). Quanto ao PDGF-AB/BB, se liga ao receptor PDGF-βR expresso nas células endoteliais, promovendo proliferação endotelial e inibição da apoptose (Battegay et al., 1994). Na dengue, tanto os níveis séricos de VEGF quanto de PDGF apresentam correlação direta com a contagem dos plaquetas de pacientes (Rathakrishnan et al., 2012).

De forma interessante, as proteínas intraplaquetárias PDGF-AA, angiopoetina-1, HGF e IGFBP-1 estão relacionadas à manutenção da integridade endotelial. PDGF-AA tem o mesmo efeito de promoção da proliferação endotelial e inibição de apoptose em células endoteliais que PDGF-BB, porém, em menor magnitude (Risau, 1992). Como já vimos anteriormente, angiopoetina-1 é um ligante ativador de Tie-2, receptor endotelial responsável pela manutenção das junções intercelulares e, conseqüentemente, da integridade endotelial. Já HGF é uma citocina responsável pela proliferação celular, além de ser um dos principais indicadores de injúrias hepáticas (Peitrapiana et al., 2005). Na dengue, seus níveis séricos são aumentados de acordo com o aumento da gravidade da doença (Voraphani et al., 2010). IGFBP-1 é uma molécula que circula conjugada a IGF-1, modulando sua viabilidade e atividade. O seu papel na dengue é desconhecido, contudo, sabe-se que os níveis séricos de IGFBP-3, com função e morfologia semelhantes à IGFBP-1, encontram-se aumentados de acordo com o aumento da gravidade da doença (Wacharasindhu et al., 2010).

Além dos níveis de cada proteína intraplaquetária isoladamente, o balanço entre essas proteínas foi avaliado. No caso daquelas que promovem a formação

de novos vasos, o grupo de pacientes DENV+ com menos de 150.000 plaquetas/mm³ demonstraram aumento das razões entre serpina-F1/PDGF-AB/BB e serpina-F1/angiopoetina, quando comparado ao grupo DENV+ com mais de 150.000 plaquetas/mm³. Estes resultados indicam que em pacientes trombocitopênicos há aumento de moléculas antiangiogênicas quando comparado às pró-angiogênicas. De forma similar, a razão TGF-β/MIP-1α foi menor no grupo de pacientes DENV+ com menos de 150.000 plaquetas/mm³ quando comparado aos pacientes com mais de 150.000 plaquetas/mm³, indicando que pacientes em trombocitopênicos há aumento de moléculas inflamatórias comparado às reguladoras (figura 32).

Com isso, demonstramos que as plaquetas são importantes sítios de produção de moléculas envolvidas na angiogênese, coagulação, integridade do endotélio vascular e mediadores inflamatórios. Na dengue, principalmente com a queda do número de plaquetas, há uma diminuição da regulação de proteínas envolvidas com todas as funções acima descritas, contribuindo desta forma para um desbalanço de diferentes mecanismos de regulação. O impacto dessas proteínas na indução da plaquetopenia será objeto de estudos futuros.

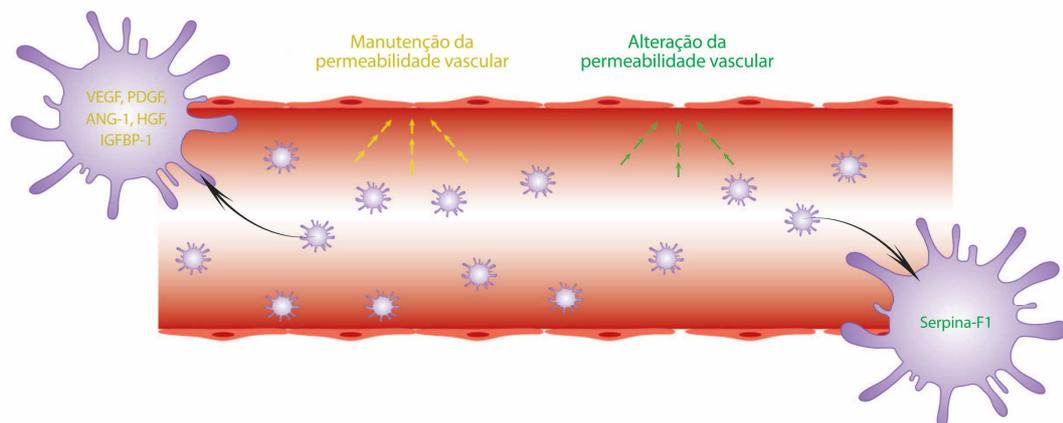


Figura 32: Hipótese de papel das plaquetas na manutenção da integridade ou indução da permeabilidade vascular. Plaquetas são fontes de PDGF, VEGF, angiopoetina-1 (ANG-1), HGF e IGFBP-1, responsáveis pela manutenção da integridade do endotélio vascular e também da serpina-F1, indutora de alteração da permeabilidade vascular. Pacientes DENV+ com contagem de plaquetas maior de 150.000/mm³ apresentam predomínio de moléculas envolvidas na manutenção da permeabilidade vascular e em contagens menores há preponderância de fatores de alteração da permeabilidade.

8.5 Plaquetas como Células Inflamatórias Atuantes na Infecção pelo DENV

Diversos estudos têm demonstrado que altos níveis de citocinas são secretados principalmente pelos linfócitos T, monócitos, macrófagos e células endoteliais no plasma de pacientes infectados pelo DENV, e que estas estariam diretamente envolvidas na patogênese da dengue (Rothman, 2011). De acordo com nossos resultados, as plaquetas ganhariam destaque dentro do contexto da produção exacerbada de citocinas na dengue.

Nossas análises demonstram que os níveis intraplaquetários de TGF- β 1 apresentaram correlação direta com a contagem de plaquetas e que a razão TGF- β 1/MIP-1 α diminuiu significativamente nos pacientes DENV+ trombocitopênicos (abaixo de 150.000 plaquetas/mm³) quando comparado aqueles com contagem de plaquetas acima de 150.000 plaquetas/mm³.

De fato, TGF- β 1 tem como principal sítio de estoque as plaquetas (Assoian et al., 1983) e atuam na modulação da expressão de moléculas de adesão e inibição da atividade de leucócitos (Letterio & Roberts, 1998). Na dengue, níveis séricos de TGF- β 1 estão relacionados à duração e ao aparecimento de sinais de alarme (Agarwal et al., 1999). Já CCL3/MIP-1 α , uma quimiocina pró-inflamatória envolvida em respostas inflamatórias agudas, atua na dengue no recrutamento inicial de leucócitos para o local da inflamação (Sierra et al., 2012).

Estudo que realizou cocultura de plaquetas e células T CD4+ autólogas, oriundas de doadores saudáveis, demonstrou que a incubação com anticorpos neutralizantes para TGF- β foi capaz de induzir uma forte ativação de linfócitos T de perfil Th1, indicando que o bloqueio de TGF- β poderia levar a uma onda de respostas pró-inflamatórias (Zhu & Flavell, 2014). Corroborando esses dados, pacientes com trombocitopenia imune apresentam níveis diminuídos de TGF- β plasmático associado a um aumento de respostas dos tipos Th1/Th17/Th22, que atuam na tentativa de controlar a inflamação neste grupo de pacientes (Andersson et al., 2002). Com isso, sugerimos que uma diminuição dos níveis intraplaquetários de TGF- β 1, acompanhada pelo aumento de CCL3/MIP-1 α em pacientes DENV+ com plaquetas abaixo de 150.000/mm³, contribuiria para o recrutamento, ativação de leucócitos e indução da produção de citocinas por parte das plaquetas.

Consideramos que uma das limitações do nosso estudo é a falta de uma análise longitudinal dos pacientes que seria de grande relevância para o entendimento do potencial efeito das citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteínas intraplaquetárias no desfecho da dengue. Enfatizamos a importância do nosso trabalho quanto ao estabelecimento da análise de proteínas intraplaquetárias, que é uma abordagem metodológica original e única, e da associação destas com a própria funcionalidade desses fragmentos celulares e na avaliação da capacidade de interação das plaquetas com outras células. Contudo, pretendemos aumentar o número de lisados plaquetários oriundos de pacientes a serem analisados para validar nossos dados preliminares.

Assim, nossos dados em conjunto poderiam indicar o papel das plaquetas como células atuantes da resposta imunológica, confirmando que a plaquetopenia associada a uma desregulação funcional dessa célula tem influência-chave na patogênese da dengue.

9. Perspectivas

- Reavaliação das análises comparando-se pacientes DENV classificados de acordo com a gravidade clínica;
- Confirmação dos dados obtidos no ensaio de determinação da expressão de proteínas intraplaquetárias relacionadas à angiogênese pelo *Human Angiogenesis Array Kit*, aumentando o número amostral de pacientes DENV+ e também de indivíduos dos grupos ODF e controles saudáveis;
- Quantificação dos níveis circulantes de proteínas intraplaquetárias com potencial efeito na trombocitopenia, como TGF- β 1, IGFBP-1, angiopoetina, HGF, serpina-F1, MMP-9 e MIP-1 α ;
- Avaliar a influência, especialmente de PDGF e TGF- β 1 intraplaquetários como fatores potenciais à atração e à ativação de monócitos que passariam a ser indutores de IL-10;
- Investigar o papel das plaquetas isoladas de pacientes DENV+ como célula-alvo do vírus através da quantificação das NS1 e NS3 do DENV de plaquetas por ensaio de RT-PCR quantitativo.

10. Conclusões

- A reintrodução recente do sorotipo DENV-4 em 2013 não resultou em uma ocorrência maior de casos graves, nem a indução de uma trombocitopenia mais acentuada, nem alterou fortemente as contagens de leucócitos e linfócitos, mas parece ter induzido uma monocitopenia menos acentuada comparado à epidemia de DENV-1 e DENV-2 em 2011;
- Aumento dos níveis séricos de mediadores pró-inflamatórios TNF- α e CXCL8/IL-8 e da citocina reguladora IL-10 na dengue, sugerem ativação da inflamação associado à tentativa de regulação desta;
- TNF- α , CXCL8/IL-8, IFN- γ e IL-10 estariam envolvidas de maneira direta ou indireta no mecanismo de supressão da medula óssea, levando à diminuição da contagem de plaquetas e/ou de demais células de origem hematopoiéticas em resposta à infecção pelo DENV;
- Não foram encontrados perfis diferentes nos níveis de IL-10, TNF- α , IL-8, IL-1 β e IFN- γ em relação ao quadro clínico dos pacientes infectados pelo DENV;
- A queda nos níveis intraplaquetários de PDGF, TGF- β 1, IGFBP-1, angiopoetina e HGF em pacientes trombocitopênicos, quando comparados aos não trombocitopênicos, poderia interferir nos mecanismos relacionados à angiogênese, coagulação, integridade do endotélio vascular e produção de mediadores inflamatórios;
- Plaquetas poderiam ser consideradas células atuantes tanto na resposta imunológica anti-DENV quanto na imunopatogênese da dengue, atuando de formas distintas de acordo com a sua contagem no sangue.

11. Referências Bibliográficas

- Alonzo, M. T. G., Lacuesta, T. L. V., Dimaano, E. M., Kurosu, T., Lady-anne, C. S., Mapua, C. A., ... & Oishi, K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2012. 205(8), 1321-1329.
- Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Vazquez, S., Morier, L., Gonzalez, D. & Guzman, M. G. Dengue hemorrhagic fever caused by sequential dengue 1–3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001–2002. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006. 75(6), 1113-1117.
- Anderson, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003. 59, 229-274.
- Andersson, P. O., Olsson, A., & Wadenvik, H. Reduced transforming growth factor- β 1 production by mononuclear cells from patients with active chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *British journal of haematology*. 2002.116(4), 862-867.
- Andia, I., & Abate, M. Platelet-rich plasma injections for tendinopathy and osteoarthritis. *International Journal of Clinical Rheumatology*. 2012. 7(4), 397-412.
- Andonegui, G., Kerfoot, S. M., McNagny, K., Ebbert, K. V., Patel, K. D., & Kubes, P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005. 106(7), 2417-2423.
- Andrews, R. K., Arthur, J. F., & Gardiner, E. E. Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection. *Thromb Haemost*. 2014. 112(4), 659-665.
- Agarwal, R., Elbishbishi, E. A., Chaturvedi, U. C., Nagar, R., & Mustafa, A. S. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *International journal of experimental pathology*. 1999. 80(3), 143-150.
- Arias, C. F., Preugschat, F., & Strauss, J. H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*. 1993. 193(2), 888-899.
- Arias, J., Valero, N., Mosquera, J., Montiel, M., Reyes, E., Larreal, Y., & Alvarez-Mon, M. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology*. 2014. 452, 42-51.
- Ashour, J., Laurent-Rolle, M., Shi, P. Y., & García-Sastre, A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *Journal of virology*. 2009. 83(11), 5408-5418.
- Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Crow, A. R., Bang, K. A., Nestel, F. P., ... & Semple, J. W. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- α production in vivo. *Blood*. 2006. 107(2), 637-641.
- Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M., & Sporn, M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 1983. 258(11), 7155-7160.
- Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Santiago, M. A., Gouvea, A. S., Santana, A. A., Neves-Souza, P. C., & Kubelka, C. F. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 2001. 204(4), 494-507.

- Bach, L. A. Endothelial cells and the IGF system. *Journal of molecular endocrinology*. 2014. 54(1), R1-R13.
- Bäck, A. T., & Lundkvist, Å. Dengue viruses—an overview. *Infection ecology & epidemiology*. 2013. 3.
- Badalucco, S., Di Buduo, C. A., Campanelli, R., Pallotta, I., Catarsi, P., Rosti, V., ... & Balduini, A. Involvement of TGFβ1 in autocrine regulation of proplatelet formation in healthy subjects and patients with primary myelofibrosis. *haematologica, haematol*. 2013.
- Barniol, J., Gaczkowski, R., Barbato, E. V., da Cunha, R. V., Salgado, D., Martínez, E. & Jaenisch, T. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC infectious diseases*. 2011. 11(1), 106.
- Basuki, P.S. A glance at the von Willebrand factor in dengue virus. 2003.
- Battegay, E. J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E. H., & Pech, M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *The Journal of cell biology*. 1994. 125(4), 917-928.
- Behnke, O. An electron microscope study of the megacaryocyte of the rat bone marrow: I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *Journal of ultrastructure research*. 1968. 24(5), 412-433.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L. & Hay, S. I. The global distribution and burden of dengue. 2013. *Nature*.
- Bick, R. L. Disseminated intravascular coagulation: a review of etiology, pathophysiology, diagnosis, and management: guidelines for care. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2002. 8(1), 1-31.
- Bierman, H. R., & Nelson, E. R. Hematodepressive virus diseases of Thailand. *Annals of Internal Medicine*. 1965. 62(5), 867-884.
- Blair, P., & Flaumenhaft, R. Platelet α-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews*. 2009. 23(4), 177-189.
- Boonpucknavig, S., Vuttiviroj, O., Bunnag, C., Bhamarapavati, N., & Nimmanitya, S. Demonstration of dengue antibody complexes on the surface of platelets from patients with dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1979. 28(5), 881-884.
- Bouchard, B. A., Mann, K. G., & Butenas, S. No evidence for tissue factor on platelets. *Blood*. 2010. 116(5), 854-855.
- Bozza, F. A., Cruz, O. G., Zagne, S. M., Azeredo, E. L., Nogueira, R. M., Assis, E. F. & Kubelka, C. F. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC infectious diseases*. 2008. 8(1), 86.
- Butthep, P., Bunyaratvej, A., & Bhamarapavati, N. Dengue virus and endothelial cell: a related phenomenon to thrombocytopenia and granulocytopenia in dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1992. 24, 246-249.
- Butthep, P., Chunhakan, S., Yoksan, S., Tangnaratchakit, K., & Chuansumrit, A. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial

cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012. 31(12), e232-e238.

Calvete, J. J., Henschen, A., & Gonzalez-Rodriguez, J. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem. J*. 1991. 274, 63-71.

Casadevall, A., & Pirofski, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*. 1999. 67(8), 3703-3713.

Cardier, J. E., Rivas, B., Romano, E., Rothman, A. L., Perez-Perez, C., Ochoa, M., & Giovannetti, R. Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells. *Endothelium*,. 2006. 13(5), 335-340.

Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Ver. Microbiol*. 1990. 44: 649-688.

Chuansumrit, A., Anantasit, N., Sasanakul, W., Chaiyaratana, W., Tangnararatchakit, K., Butthep, P. & Yoksan, S. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. *Paediatrics and international child health*. 2013. 33(2), 97-101.

Chaturvedi, U. C., Agarwal, R., Elbishbishi, E. A., & Mustafa, A. S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2000. 28(3), 183-188.

Chaudhary, R., Khetan, D., Sinha, S., Sinha, P., Sonker, A., Pandey, P., & Ray, V. Transfusion support to dengue patients in a hospital based blood transfusion service in north India. *Transfusion and apheresis science*. 2006. 35(3), 239-244.

Chen, D., Lemons, P. P., Schraw, T., & Whiteheart, S. W. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000. 96(5), 1782-1788.

Chen, K., Detwiler, T. C., & Essex, D. W. Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *British journal of haematology*. 1995. 90(2), 425-431.

Chen, M., & Geng, J. G. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2006. 54(2), 75-84.

Chen, Y., Maguire, T., & Marks, R. M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *Journal of virology*. 1996. 70(12), 8765-8772.

Cheng, H. J., Lei, H. Y., Lin, C. F., Luo, Y. H., Wan, S. W., Liu, H. S., ... & Lin, Y. S. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Molecular immunology*. 2009. 47(2), 398-406.

Chisari, F. V. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *Journal of Clinical Investigation*. 1997. 99(7), 1472.

Chuang, Y. C., Lei, H. Y., Lin, Y. S., Liu, H. S., Wu, H. L., & Yeh, T. M. Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation. *The Journal of Immunology*. 2011. 187(12), 6483-6490.

Chungue, E., Poli, L., Roche, C., Gestas, P., Glaziou, P., & Markoff, L. J. Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *Journal of Infectious Diseases*. 1994. 170(5), 1304-1307.

Churdboonchart, V., Bhamarapravati, N., Peampramprecha, S., & Sirinavin, S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991. 44(5), 481-493.

Ciferri S, Emiliani C, Guglielmini G, Orlacchio A, Nenci GG, Gresele P. Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thrombosis and haemostasis*. 2000. 83(1):157-64.

Cimmino, G., & Golino, P. Platelet biology and receptor pathways. *Journal of cardiovascular translational research*. 2013. 6(3), 299-309.

Clyde, K., Kyle, J. L., & Harris, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*. 2006. 80(23), 11418-11431.

Cognasse, F., Hamzeh, H., Chavarin, P., Acquart, S., Genin, C., & Garraud, O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and cell biology*. 2005. 83(2), 196-198.

Cologna, R., Armstrong, P. M., & Rico-Hesse, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *Journal of virology*. 2005. 79(2), 853-859.

Commins, S. P., Borish, L., & Steinke, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical immunology*. 2010. 125(2), S53-S72.

Cox, D., Kerrigan, S. W., & Watson, S. P. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011. 9(6), 1097-1107.

Cui, T., Sugrue, R. J., Xu, Q., Lee, A. K., Chan, Y. C., & Fu, J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*. 1998. 246(2), 409-417.

Dalrymple, N., & Mackow, E. R. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *Journal of virology*. 2011. 85(18), 9478-9485.

Davì, G., & Patrono, C. Platelet activation and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*. 2007. 357(24), 2482-2494.

Davì, G., Ciabattini, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S. & Patrono, C. In Vivo Formation of 8-Iso-Prostaglandin F₂α and Platelet Activation in Diabetes Mellitus Effects of Improved Metabolic Control and Vitamin E Supplementation. *Circulation*. 1999. 99(2), 224-229.

De La Cruz Hernández, S. I., Puerta-Guardo, H., Flores-Aguilar, H., González-Mateos, S., López-Martínez, I., Ortiz-Navarrete, V., & Del Angel, R. M. A strong interferon response correlates with a milder dengue clinical condition. *Journal of Clinical Virology*. 2014.

De La Guardia, C., & Leonart, R. Progress in the Identification of dengue virus entry/fusion inhibitors. *BioMed research international*, 2014.

De Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(4):e390.

De Oliveira, D. B. Estudo das alterações morfológicas e funcionais das plaquetas na infecção pelo vírus da dengue. *Pós-Graduação em Biologia Parasitária*. Instituto Oswaldo Cruz. 2012.

De Sauvage, F. J., Hass, P. E., Spencer, S. D., Malloy, B. E., Gurney, A. L., Spencer, S. A., ... & Eaton, D. L. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*. 1994. 369(6481), 533-538.

Detmers, P. A., Lo, S. K., Olsen-Egbert, E. L. I. Z. A. B. E. T. H., Walz, A. L. F. R. E. D., Baggiolini, M. A. R. C. O., & Cohn, Z. A. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *The Journal of experimental medicine*. 1990. 171(4), 1155-1162.

Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W. & Screaton, G. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 2010. 328(5979), 745-748.

Dewi, B. E., Takasaki, T., & Kurane, I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *Journal of virological methods*. 2004. 121(2), 171-180.

Djaldetti, M., Fishman, P., Bessler, H., & Notti, I. SEM observations on the mechanism of platelet release from megakaryocytes. *Thrombosis and haemostasis*. 1979. 42(2), 611-620.

Djamiatun, K., Faradz, S. M., Setiati, T. E., Netea, M. G., van der Ven, A. J., & Dolmans, W. M. Increase of Plasminogen Activator inhibitor-1 and decrease of transforming growth factor-B1 in children with dengue haemorrhagic fever in Indonesia. *Journal of tropical pediatrics*. 2011. fmq122.

Ebbe, S. Biology of megakaryocytes. Progress in hemostasis and thrombosis. 1976. 3, 211.

Ellingsworth, L. R., Brennan, J. E., Fok, K., Rosen, D. M., Bentz, H., Piez, K. A., & Seyedin, S. M. Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and transforming growth factor beta. Immunohistochemical localization and association with differentiating cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1986. 261(26), 12362-12367.

Essex, D. W., & Li, M. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *British journal of haematology*. 1999. 104(3), 448-454.

Falconar, A. K. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007. 14(5), 493-504.

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

- Falgout, B., Chanock, R., & Lai, C. J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *Journal of virology*. 1989. 63(5), 1852-1860.
- Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J. M., ... & Augustin, H. G. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2004. 103(11), 4150-4156.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine*. 1989. 170(6), 2081-2095.
- Fitzgerald, D. J., Roy, L., Catella, F., & FitzGerald, G. A. Platelet activation in unstable coronary disease. *New England Journal of Medicine*. 1986. 315(16), 983-989.
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of virology*. 1999. 73(7), 6104-6110.
- Francischetti, I. Does activation of the blood coagulation cascade have a role in malaria pathogenesis?. *Trends in parasitology*. 2008. 24(6), 258-263.
- Funahara, Y., Shirahata, A., & Setiabudy-Dharma, R. A. H. A. J. U. N. I. N. G. S. I. H. DHF characterized by acute type DIC with increased vascular permeability. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1987. 18(3), 346-350.
- Furie, B., & Furie, B. C. Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*. 2008. 359(9), 938-949.
- Furman, M. I., Benoit, S. E., Barnard, M. R., Valeri, C. R., Borbone, M. L., Becker, R. C. & Michelson, A. D. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998. 31(2), 352-358.
- Gandini, M., Gras, C., Azeredo, E. L., de Oliveira Pinto, L. M., Smith, N., Despres, P. & Herbeuval, J. P. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN- α production by human plasmacytoid dendritic cells *In vitro* and *In vivo*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013. 7(6), e2257.
- Gibbons, R. V., Kalanarooj, S., Jarman, R. G., Nisalak, A., Vaughn, D. W., Endy, T. P. & Srikiatkachorn, A. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007. 77(5), 910-913.
- Ghosh, K., Gangodkar, S., Jain, P., Shetty, S., Ramjee, S., Poddar, P., & Basu, A. Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy. *Journal of electron microscopy*. 2008. 57(3), 113-118.
- Gubler, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in microbiology*. 2002. 10(2), 100-103.
- Gubler, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. In Novartis foundation symposium (Vol. 277, p. 3). *Chichester*, 2006. New York; John Wiley;.

- Gudbrandsdottir, S., Hasselbalch, H. C., & Nielsen, C. H. Activated Platelets Enhance IL-10 Secretion and Reduce TNF- α Secretion by Monocytes. *The Journal of Immunology*. 2013. 191(8), 4059-4067.
- Gurney, A. L., Carver-Moore, K., de Sauvage, F. J., & Moore, M. W. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*. 1994. 265(5177), 1445-1447.
- Guzman, M. G. & Harris, E. Dengue. *Lancet*. 2014. S0140-6736(14)60572-9
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J. & Peeling, R. W. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. 8, S7-S16.
- Guzman, M. G., Kouri, G. P., Bravo, J., Soler, M., Vazquez, S., & Morier, L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1990. 42(2), 179-184.
- Halstead, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *The Yale journal of biology and medicine*. 1970. 42(5), 350.
- Halstead, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988. 239(4839), 476-481.
- Halstead, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv virus res*. 2003. 60, 421-467.
- Heijnen, H. F., Debili, N., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H. J., & Sixma, J. J. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet α -granules. *Blood*. 1998. 91(7), 2313-2325.
- Hoffman, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood reviews*. 2003. 17, S1-S5.
- Hoffman, M., & Monroe, D. 3. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart*. 2001. 85(6), 958-965.
- Holme, P. A., Müller, F., Solum, N. O., Brosstad, F., Frøland, S. S., & Aukrust, P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. *The FASEB Journal*. 1998. 12(1), 79-90.
- Hottz, E., Tolley, N. D., Zimmerman, G. A., Weyrich, A. S., & Bozza, F. A. Platelets in dengue infection. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2011. 8(1), e33-e38.
- Hottz, E. D., Lopes, J. F., Freitas, C., Valls-de-Souza, R., Oliveira, M. F., Bozza, M. T. & Bozza, P. T. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. 2013 A. 122(20), 3405-3414.
- Hottz, E. D., Oliveira, M. F., Nunes, P. C., Nogueira, R. M. R., Valls-de-Souza, R., Da Poian, A. T. & Bozza, F. A. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013 B. 11(5), 951-962.
- Hottz, E. D., Medeiros-de-Moraes, I. M., Vieira-de-Abreu, A., de Assis, E. F., Vals-de-Souza, R., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *The Journal of Immunology*. 2014. 193(4), 1864-1872.

- Houng, A., Polgár, J., & Reed, G. L. Munc18-syntaxin complexes and exocytosis in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. 278(22), 19627-19633.
- Huang, Y. H., Chang, B. I., Lei, H. Y., Liu, H. S., Wu, H. L., & Yeh, T. M. Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. *Clinical & Experimental Immunology*. 1997. 110(1), 35-40.
- Huang, Y. H., Liu, C. C., Wang, S. T., Lei, H. Y., Liu, H. S., Lin, Y. S. & Yeh, T. M. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *Journal of medical virology*. 2001. 63(3), 247-251.
- Huerta-Zepeda, A., Cabello-Gutiérrez, C., Cime-Castillo, J., Monroy-Martínez, V., Manjarrez-Zavala, M. E., Gutiérrez-Rodríguez, M., ... & Ruiz-Ordaz, B. H. Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. *Thrombosis and haemostasis-stuttgart*. 2008. 99(5), 936.
- Italiano, J. E., & Hartwig, J. Megakaryocyte development and platelet formation. *Platelets*. 2007. 2, 23-44.
- Jacobs, M. G., Robinson, P. J., Bletchly, C., Mackenzie, J. M., & Young, P. R. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *The FASEB Journal*. 2000. 14(11), 1603-1610.
- Jameel, T., Mehmood, K., Mujtaba, G., Choudhry, N., Afzal, N., & Paul, R. F. Changing haematological parameters in dengue viral infections. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2012. 24(1).
- Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002. 20(1), 197-216.
- Jayashree, K., Manasa, G. C., Pallavi, P., & Manjunath, G. V. Evaluation of platelets as predictive parameters in dengue fever. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2011. 27(3), 127-130.
- Jennings, L. K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2009. 102(2), 248-257.
- Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., & Wong, K. T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Journal of Infectious Diseases*. 2004. 189(8), 1411-1418.
- Jones, M., Davidson, A., Hibbert, L., Gruenwald, P., Schlaak, J., Ball, S. & Jacobs, M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *Journal of virology*. 2005. 79(9), 5414-5420.
- Ju, H., & Brasier, A. R. Variable selection methods for developing a biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. *BMC research notes*. 2013. 6(1), 1-8.
- Juffrie, M., van Der Meer, G. M., Hack, C. E., Haasnoot, K., Veerman, A. J. P., & Thijs, L. G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infection and immunity*. 2000. 68(2), 702-707.
- Juffrie, M., Meer, G. V., Hack, C. E., Haasnoot, K., Veerman, A. J., & Thijs, L. G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001. 65(1), 70-75.

Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A. & von Andrian, U. H. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007. 317(5845), 1767-1770.

Jurk, K., & Kehrel, B. E. Platelets: Physiology and biochemistry. 2005.

Kahn, M. J., & Leissinger, C. Thrombocytopenia Due to Deficient Platelet Production. *Thrombocytopenia*. 2013. 75.

Kaushansky, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *New England Journal of Medicine*. 2006. 354(19), 2034-2045.

Kaltalioglu, K., & Coskun-Cevher, S. A bioactive molecule in a complex wound healing process: platelet-derived growth factor. *International journal of dermatology*. 2014.

Keller, J. R., Mcniece, I. K., Sill, K. T., Ellingsworth, L. R., Quesenberry, P. J., Sing, G. K., & Ruscetti, F. W. Transforming growth factor beta directly regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation. *Blood*. 1990. 75(3), 596-602.

Kho, L. K., Wulur, H., & Himawan, T. Blood and bone marrow changes in dengue haemorrhagic fever. *Paediatrica Indonesiana*. 1972. 12(1), 31.

Kliks, S. C., Nimmanitya, S., Nisalak, A., & Burke, D. S. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1988. 38(2), 411-419.

Klinger, M. H., & Jelkmann, W. Review: role of blood platelets in infection and inflammation. *Journal of interferon & cytokine research*. 2002. 22(9), 913-922.

Klinger, M. H., & Klüter, H. Immunocytochemical colocalization of adhesive proteins with clathrin in human blood platelets: further evidence for coated vesicle-mediated transport of von Willebrand factor, fibrinogen and fibronectin. *Cell and tissue research*. 1995. 279(3), 453-457.

Kou, Z., Quinn, M., Chen, H., Rodrigo, W. W., Rose, R. C., Schlesinger, J. J., & Jin, X. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of medical virology*. 2008. 80(1), 134-146.

Krishnamurti, C., Peat, R. A., Cutting, M. A., & Rothwell, S. W. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002. 66(4), 435-441.

Kuhn, R. J., Zang, W., Rossman, M. G., Pletnev, S. V., Cover, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhuay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., Stauss, J. H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, mutation and fusion. *Cell*. 2002. 108(5): 717-725.

Kurane, I., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Meager, A., Janus, J., & Ennis, F. A. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *Journal of Clinical Investigation*. 1991. 88(5), 1473.

La Russa, V. F., & Innis, B. L. 11 Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillière's clinical haematology*. 1995. 8(1), 249-270.

- Le Bon, A., & Tough, D. F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current opinion in immunology*. 2002. 14(4), 432-436.
- Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., Ramos, C., & Rico-Hesse, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of virology*. 1999. 73(6), 4738-4747.
- Letterio, J. J., & Roberts, A. B. Regulation of immune responses by TGF- β^* . *Annual review of immunology*. 1998. 16(1), 137-161.
- Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., & Betsholtz, C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes & development*. 1994. 8(16), 1875-1887.
- Levi, M., van der Poll, T., & Büller, H. R. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004. 109(22), 2698-2704.
- Lewis, J. C., & Maldonado, J. E. Phagocytosis in human platelets: localization of acid phosphatase-positive phagosomes following latex uptake. *Blood*. 1976. 47(5), 833-840.
- Libraty, D. H., Acosta, L. P., Tallo, V., Segubre-Mercado, E., Bautista, A., Potts, J. A. & Capeding, R. Z. A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PLoS medicine*. 2009. 6(10), e1000171.
- Libraty, D. H., Endy, T. P., Houg, H. S. H., Green, S., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., & Rothman, A. L. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2002. 185(9), 1213-1221.
- Lima, M. D. R. Q., Nogueira, R. M. R., de Filippis, A. M. B., & dos Santos, F. B. Comparison of two generations of the Panbio dengue NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011. 18(6), 1031-1033.
- Lin, C. F., Lei, H. Y., Lin, Y. S., Liu, C. C., & Anderson, R. Patient and mouse antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 cross-react with platelets and cause their dysfunction or depletion. *American Journal of Infectious Diseases*. 2008. 4(1), 69.
- Lin, C. F., Lei, H. Y., Liu, C. C., Liu, H. S., Yeh, T. M., Wang, S. T., ... & Lin, Y. S. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *Journal of medical virology*. 2001. 63(2), 143-149.
- Lin, C. F., Lei, H. Y., Shiau, A. L., Liu, C. C., Liu, H. S., Yeh, T. M., ... & Lin, Y. S. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *Journal of medical virology*. 2003. 69(1), 82-90.
- Lin, Y. S., Yeh, T. M., Lin, C. F., Wan, S. W., Chuang, Y. C., Hsu, T. K., ... & Lei, H. Y. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Experimental Biology and Medicine*. 2011. 236(5), 515-523.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003. 59, 23-62.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In Knipe, K. M., Howley, P. M. (eds), *Fieds Virology*. 2001. .Lippicott-Wilkins, Philadelphia, PA, pp.991-1041.

- Liu, J. W., Lee, I. K., Wang, L., Chen, R. F., & Yang, K. D. The Usefulness of Clinical-Practice-Based Laboratory Data in Facilitating the Diagnosis of Dengue Illness. *BioMed research international*, 2013.
- Liu, L. Q., Sposato, M., Liu, H. Y., Vaudrain, T., Shi, M. J., Rider, K., & Kraus, M. Functional cloning of IGFBP-3 from human microvascular endothelial cells reveals its novel role in promoting proliferation of primitive CD34+ CD38- hematopoietic cells in vitro. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2003. 13, 6(10), 359-371.
- Ma, L., Liang, Y., Fang, M., Guan, Y., Si, Y., Jiang, F., & Wang, F. The cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17) and Treg cytokine (TGF- β 1) levels in adults with immune thrombocytopenia. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014. 69(9), 694-697.
- Mackenzie, J., La Brooy, S. Indah Ueston, L. Cunningham, A. L. Dengue in Austrália. *J. Med. Microbiol.* 1996. 45, 159-161
- Makroo, R. N., Raina, V., Kumar, P., & Kanth, R. K. Role of platelet transfusion in the management of dengue patients in a tertiary care hospital. *Asian journal of transfusion science*. 2007. 1(1), 4.
- Malavige, G. N., Gomes, L., Alles, L., Chang, T., Salimi, M., Fernando, S. & Ogg, G. S. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC infectious diseases*. 2013. 13(1), 341.
- Malavige, G. N., & Ogg, G. Pathogenesis of severe dengue infection. *Ceylon Medical Journal*. 2012. 57(3), 97-100.
- Markoff, L. J., Innis, B. L., Houghten, R., & Henchal, L. S. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *Journal of Infectious Diseases*. 1991. 164(2), 294-301.
- Mathew, A., & Rothman, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological reviews*. 2008. 225(1), 300-313.
- Matondang, A. V., Widodo, D., Zulkarnain, I., Rengganis, I., Trihandini, I., Inada, K., & Endo, S. The correlation between thrombopoietin and platelet count in adult dengue viral infection patients. *Acta Med Indones*. 2004. 36(2), 62-69.
- Matsushima, K., & Oppenheim, J. J. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*. 1989. 1(1), 2-13.
- Mendes-Ribeiro, A. C., Moss, M. B., Siqueira, M. A., Moraes, T. L., Ellory, J. C., Mann, G. E., & Brunini, T. Dengue fever activates the L-arginine-nitric oxide pathway: an explanation for reduced aggregation of human platelets. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2008. 35(10), 1143-1146.
- Michels, M., van der Ven, A. J., Djamiatun, K., Fijnheer, R., de Groot, P. G., Griffioen, A. W., ... & de Mast, Q. Imbalance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in severe dengue and relationship with thrombocytopenia, endothelial activation, and vascular stability. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012. 87(5), 943-946.
- Michelson, A. D., MacGregor, H., Barnard, M. R., Kestin, A. S., Rohrer, M. J., & Valeri, C. R. Reversible inhibition of human platelet activation by hypothermia in vivo and in vitro. *Thrombosis and haemostasis*. 1994. 71(5), 633-640.

- Michelson, A.D. Platelets. *Academic Press, Elsevier Inc.* 2007. San Diego, CA.
- Miller, J. L., M deWet, B. J., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A., Rudd, P. M., & Gordon, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS pathogens*. 2008. 4(2), e17.
- Miller, S., Sparacio, S., & Bartenschlager, R. Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *Journal of Biological Chemistry*. 2006. 281(13), 8854-8863
- Ministério da Saúde; SINAN. Boletim semanal da dengue. In: *SMSDC/RJ SSSSC*, editor. 2013. p. 8.
- Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; SINAN. *Boletim Epidemiológico*. Ministério da saúde. 2014. Vol 45 n.
- Mitrakul, C. Bleeding problem in dengue haemorrhagic fever: platelets and coagulation changes. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 1987. 18(3), 407-412.
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A. & Screaton, G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine*. 2003. 9(7), 921-927.
- Mongkolsapaya, J., Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Avirutnan, P., Jairungsri, A. & Screaton, G. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal?. *The Journal of Immunology*. 2006. 176(6), 3821-3829.
- Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M., & Modjeski, K. L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014. 123(18), 2759-2767.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. 3 (1): 13-22.
- Muñoz-Jordán, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., & García-Sastre, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *Journal of virology*. 2005. 79(13), 8004-8013.
- Muraoka, K., Tsuji, K., Yoshida, M., Ebihara, Y., Yamada, K., Sui, X. & Nakahata, T. Thrombopoietin-independent effect of interferon- γ on the proliferation of human megakaryocyte progenitors. *British journal of haematology*. 1997. 98(2), 265-273.
- Murthy, H. K., Clum, S., & Padmanabhan, R. Dengue virus NS3 serine protease crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. 274(9), 5573-5580
- Mustafa, A. S., Elbishbishi, E. A., Agarwal, R., & Chaturvedi, U. C. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2001. 30(3), 229-233.
- Muylaert, I. R., Galler, R., & Rice, C. M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *Journal of virology*. 1997. 71(1), 291-298.
- Nachman, R. L., & Rafii, S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *New England Journal of Medicine*. 2008. 359(12), 1261-1270.

- Naveca FG, Souza VC, Silva GA, Maito RM, Granja F, Siqueira T, et al. Complete genome sequence of a Dengue virus serotype 4 strain isolated in Roraima, Brazil. *J Virol*. 2012. 86(3):1897-8.
- Nelson, E. R., & Bierman, H. R. Dengue fever: a thrombocytopenic disease?. *Jama*. 1964. 190(2), 99-103.
- Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, Lin CF, Yeh TM, Do QH, Vu TQ, Chen LC, Huang JH, Lam TM, Liu CC, Halstead SB . Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis*. 2004. 189(2):221-32
- Nisalak, A., Halstead, S. B., Singharaj, P., Udomsakdi, S., Nye, S. W., & Vinijchaikul, K. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. 3. Virologic studies of fatal disease. *The Yale journal of biology and medicine*. 1970. 42(5), 293
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiology and infection*. 1993;111(1):163-70.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(7):925-6. Epub 2001/10/31.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(9):1376-81.
- Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Pan American journal of public health*. 2007;22(5):358-63.
- Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2009 A. 40(2):253-62.
- Noisakran, S., Chokephaibulkit, K., Songprakhon, P., Onlamoon, N., Hsiao, H. M., Villinger, F. & Perng, G. C. A Re-evaluation of the Mechanisms Leading to Dengue Hemorrhagic Fever. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009 B. 1171(s1), E24-E35.
- Noisakran, S., Onlamoon, N., Hsiao, H. M., Clark, K. B., Villinger, F., Ansari, A. A., & Perng, G. C. Infection of bone marrow cells by dengue virus in vivo. *Experimental hematology*. 2012. 40(3), 250-259.
- Nurden, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2011. 105(1), S13.
- Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I., & Anitua, E. Platelets and wound healing. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2007. 13, 3532-3548.
- Nybakken, G. E., Oliphant, T., Johnson, S., Burke, S., Diamond, M. S., & Fremont, D. H. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*. 2005. 437(7059), 764-769.
- Oishi, K., Saito, M., Mapua, C. A., & Natividad, F. F. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *Journal of infection and chemotherapy*. 2007. 13(3), 125-133.

Onlamoon, N., Noisakran, S., Hsiao, H. M., Duncan, A., Villinger, F., Ansari, A. A., & Perng, G. C. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*. 2010. 115(9), 1823-1834.

Opal, S. M., Wherry, J. C., & Grint, P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clinical infectious diseases*. 1998. 27(6), 1497-1507.

Osanai, C. H., Rosa, A. P., Tang, A. T., Amaral, R. S. D., Passos, A. D., & Tauil, P. L. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima Nota previa. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1983. 25(1), 53-4.

Ott, I., Neumann, F. J., Gawaz, M., Schmitt, M., & Scho, A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*. 1996. 94(6), 1239-1246.

Parise, L. V., Smyth, S. S., & Collier, B. S. Platelet morphology, biochemistry, and function. *Williams hematology*. 2001. 7, 1597-1645.

Patrignani, P., Di Febbo, C., Tacconelli, S., Moretta, V., Baccante, G., Sciulli, M. G. & Porreca, E. Reduced thromboxane biosynthesis in carriers of toll-like receptor 4 polymorphisms in vivo. *Blood*. 2006. 107(9), 3572-3574.

Pietrapiana, D., Sala, M., Prat, M., & Sinigaglia, F. Met identification on human platelets: role of hepatocyte growth factor in the modulation of platelet activation. *FEBS letters*. 2005. 579(20), 4550-4554.

Petäjä, J. Inflammation and coagulation. An overview. *Thrombosis research*. 2011. 127, S34-S37.

Peters, M. J., Dixon, G., Kotowicz, K. T., Hatch, D. J., Heyderman, R. S., & Klein, N. J. Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *British journal of haematology*. 1999. 106(2), 391-399.

Pierson, T. C., Xu, Q., Nelson, S., Oliphant, T., Nybakken, G. E., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell host & microbe*. 2007. 1(2), 135-145.

Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. 275(29), 21785-21788.

Priyadarshini, D., Gadia, R. R., Tripathy, A., Gurukumar, K. R., Bhagat, A., Patwardhan, S., & Cecilia, D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One*. 2010. 5(1), e8709.

Pryor, M. J., & Wright, P. J. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology*. 1993. 194(2), 769-780.

Purdue University. www.infection-research.de/.../cb5efb59a8.jpg, acessado em 2013.

Putintseva, E., Vega, G., & Fernandez, L. Alterations in thrombopoiesis in patients with thrombocytopenia produced by dengue hemorrhagic fever. *Nouvelle revue francaise d'hematologie*. 1985. 28(5), 269-273.

Qi, R. F., Zhang, L., & Chi, C. W. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2008., 40(2), 91-101.

- Qu, Z., & Chaikof, E. L. Interface between hemostasis and adaptive immunity. *Current opinion in immunology*. 2010. 22(5), 634-642.
- Rachman, A., Harahap, A. R., & Widhyasih, R. M. The role of anti-dengue virus NS-1 and anti-protein disulfide isomerase antibodies on platelet aggregation in secondary dengue infection. *Acta medica Indonesiana*. 2013. 45(1), 44-48.
- Raghupathy, R., Chaturvedi, U. C., Al-Sayer, H., Elbishbishi, E. A., Agarwal, R., Nagar, R., ... & Mustafa, A. S. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *Journal of medical virology*. 1998. 56(3), 280-285.
- Ramachandran, R., & Hollenberg, M. D. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *British journal of pharmacology*. 2008. 153(S1), S263-S282.
- Ramsfjell, V., Borge, O. J., Cui, L., & Jacobsen, S. E. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+ CD38-) human bone marrow progenitor cells: distinct and key interactions with the ligands for c-kit and flt3, and inhibitory effects of TGF-beta and TNF-alpha. *The Journal of Immunology*. 1997. 158(11), 5169-5177.
- Rathakrishnan, A., Wang, S. M., Hu, Y., Khan, A. M., Ponnampalavanar, S., Lum, L. C. S., & Sekaran, S. D. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PloS one*. 2012. 7(12), e52215.
- Reed GL. Platelet secretion. In: Alan DMMD, editor. Platelets. Second ed. Burlington: Academic Press. 2007. p. 309-18.
- Remy, M. Dengue Fever: Theories of Immunopathogenesis and Challenges for Vaccination. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*. 2014. 13(4), 262-274.
- Rendu, F., & Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001. 12(5), 261-273.
- Restrepo, B. N., Isaza, D. M., Salazar, C. L., Ramírez, R., Ospina, M., & Alvarez, L. G. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama in infants with and without dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008. 41(1), 6-10.
- Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., Smits, A., Siegbahn, A., Funa, K., & Heldin, C. H. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth factors*. 1992. 7(4), 261-266.
- Rizzo, S., Killick, S. B., Patel, S., Ball, S. E., Wadhwa, M., Dilger, P. & Gibson, F. M. Reduced TGF-β1 in patients with aplastic anaemia in vivo and in vitro. *British journal of haematology*. 1999. 107(4), 797-803.
- Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L. M., Roche, N. S., Stern, D. F., & Sporn, M. B. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985. 82(1), 119-123.
- Rodenhuis-Zybert, I. A., van der Schaar, H. M., da Silva Voorham, J. M., van der Ende-Metselaar, H., Lei, H. Y., Wilschut, J., & Smit, J. M. Immature dengue virus: a veiled pathogen?. *PLoS pathogens*. 2010. 6(1), e1000718.
- Rothman, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *Journal of Clinical Investigation*. 2004. 113(7), 946-951.

- Rothman, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Reviews Immunology*. 2011. 11(8), 532-543.
- Rothman, A. L., & Ennis, F. A. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 1999. 257(1), 1-6.
- Ruf, W. Protease-activated receptor signaling in the regulation of inflammation. *Critical care medicine*. 2004. 32(5), S287-S292.
- Rumbaut, R. E., & Thiagarajan, P. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. *Synthesis Lectures on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*. 2010. 2(1), 1-75.
- Saito, M., Oishi, K., Inoue, S., Dimaano, E. M., Alera, M. T. P., Robles, A. M. P., ... & Nagatake, T. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clinical & Experimental Immunology*. 2004. 138(2), 299-303.
- Sampath, A., Xu, T., Chao, A., Luo, D., Lescar, J., & Vasudevan, S. G. Structure-based mutational analysis of the NS3 helicase from dengue virus. *Journal of virology*. 2006. 80(13), 6686-6690.
- Samuel, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews*. 2001. 14(4), 778-809.
- Schraw, T., Lemons, P., Dean, W., & Whiteheart, S. A role for Sec1/Munc18 proteins in platelet exocytosis. *Biochem. J*. 2003. 374, 207-217.
- Semple, J. W., Aslam, R., Kim, M., Speck, E. R., & Freedman, J. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood*. 2007. 109(11), 4803-4805.
- Semple, J. W., Italiano, J. E., & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology*. 2011. 11(4), 264-274.
- Shashkin, P. N., Brown, G. T., Ghosh, A., Marathe, G. K., & McIntyre, T. M. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *The Journal of Immunology*. 2008. 181(5), 3495-3502.
- Shi, G., & Morrell, C. N. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thrombosis research*. 2011. 127(5), 387-390.
- Sierra, B., Pérez, A. B., Alvarez, M., García, G., Vogt, K., Aguirre, E., ... & Guzmán, M. G. Variation in inflammatory/regulatory cytokines in secondary, tertiary, and quaternary challenges with dengue virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012. 87(3), 538-547.
- Sierra, B., Perez, A. B., Garcia, G., Aguirre, E., Alvarez, M., Gonzalez, D., & Guzman, M. G. Role of CC chemokine receptor 1 and two of its ligands in human dengue infection. Three approaches under the Cuban situation. *Microbes and Infection*. 2014. 16(1), 40-50.
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., van Vinh Chau, N., & Wills, B. Dengue. *New England Journal of Medicine*. 2012. 366(15), 1423-1432.
- Siqueira JB, Jr., Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(1):48-53. Epub 2005/02/12.

Sosman, J. A., Verma, A., Moss, S., Sorokin, P., Blend, M., Bradlow, B., & Hoffman, R. Interleukin 10-induced thrombocytopenia in normal healthy adult volunteers: evidence for decreased platelet production. *British journal of haematology*. 2000. 111(1), 104-111.

Sosothikul, D., Seksarn, P., Pongsewalak, S., Thisyakorn, U., & Lusher, J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thrombosis and haemostasis*. 2007. 97(4), 627-634.

Sosothikul, D., Seksarn, P., Pongsewalak, S., Thisyakorn, U., & Lusher, J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thrombosis and haemostasis*. 2007. 97(4), 627-634.

Souza, D. G., Fagundes, C. T., Sousa, L. P., Amaral, F. A., Souza, R. S., Souza, A. L., ... & Teixeira, M. M. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. 106(33), 14138-14143.

SRICHAIKUL, T. Disseminated intravascular coagulation in dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1987. 18(3), 303-311.

Srichaikul, T. A. N. O. M. S. R. I., Nimmannitya, S. U. C. H. I. T. R. A., Sripaisarn, T., Kamolsilpa, M. A. H. A. T. A. N. A., & Pulgate, C. H. A. T. U. P. O. R. N. Platelet function during the acute phase of dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1989. 20(1), 19-25.

Srichaikul, T., & Nimmannitya, S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2000. 13(2), 261-276.

Srikiatkachorn, A., & Green, S. Markers of dengue disease severity. In *Dengue Virus* (pp. 67-82). Springer Berlin Heidelberg. 2010.

Srikiatkachorn, A., & Kelley, J. F. Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever. *Antiviral research*. 2014. 109, 160-170rat.

Stiasny, K., & Heinz, F. X. Flavivirus membrane fusion. *Journal of general virology*. 2006. 87(10), 2755-2766.

Südhof, T. C., & Rothman, J. E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 2009. 323(5913), 474-477.

Suharti, C., Gorp, E., Setiati, T. E., Dolmans, W., Djokomoeljanto, R. J., Hack, C. E., ... & van der Meer, J. W. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost*. 2002. 87, 42-46.

Tacchini-Cottier, F., Vesin, C., Redard, M., Buurman, W., & Piguet, P. F. Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice. *The Journal of Immunology*. 1998. 160(12), 6182-6186.

Talavera, D., Castillo, A. M., Dominguez, M. C., Gutierrez, A. E., & Meza, I. IL8 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*. 2004. 85(7), 1801-1813.

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(5):938-40.

- Teo, K. F., & Wright, P. J. Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *Journal of general virology*. 1997. 78(2), 337-341.
- Thomas, L., Najioullah, F., Besnier, F., Valentino, R., Césaire, J. R. R., & Cabié, A. Clinical Presentation of Dengue by Serotype and Year of Epidemic in Martinique. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014. 13-0595.
- Tolmachova, T., Åbrink, M., Futter, C. E., Authi, K. S., & Seabra, M. C. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. 104(14), 5872-5877.
- Tsai, T. T., Chuang, Y. J., Lin, Y. S., Chang, C. P., Wan, S. W., Lin, S. H., ... & Lin, C. F. Antibody-Dependent Enhancement Infection Facilitates Dengue Virus-Regulated Signaling of IL-10 Production in Monocytes. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014. 8(11), e3320.
- Tsai, T. T., Chuang, Y. J., Lin, Y. S., Wan, S. W., Chen, C. L., & Lin, C. F. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2013. 20, 40.
- Umareddy, I., Chao, A., Sampath, A., Gu, F., & Vasudevan, S. G. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *Journal of general virology*. 2006. 87(9), 2605-2614.
- Valdés, K., Alvarez, M., Pupo, M., Vázquez, S., Rodríguez, R., & Guzmán, M. G. Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2000. 7(5), 856-857.
- Valdés, K., Alvarez, M., Pupo, M., Vázquez, S., Rodríguez, R., & Guzmán, M. G. Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2000. 7(5), 856-857.
- Valle, R. P., & Falgout, B. Mutagenesis of the NS3 protease of dengue virus type 2. *Journal of virology*. 1998. 72(1), 624-632.
- Vasilakis N. The daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in SouthEast Asia. *Third International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever*. Bangkok, Thailand, 2013.
- Vaughn, D. W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., & Nisalak, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *Journal of Infectious Diseases*. 2000. 181(1), 2-9.
- Vervaeke, P., Vermeire, K., & Liekens, S. Endothelial dysfunction in dengue virus pathology. *Reviews in medical virology*. 2014.
- Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R. A., Weyrich, A. S., & Zimmerman, G. A. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. In *Seminars in immunopathology*. 2012. 34, No. 1, pp. 5-30. Springer-Verlag.
- Vogt, M. R., Moesker, B., Goudsmit, J., Jongeneelen, M., Austin, S. K., Oliphant, T., ... & Diamond, M. S. Human monoclonal antibodies against West Nile virus induced by natural infection neutralize at a postattachment step. *Journal of virology*. 2009. 83(13), 6494-6507.
- Voraphani, N., Theamboonlers, A., Khongphatthanayothin, A., Srisai, C., & Poovorawan, Y. Increased level of hepatocyte growth factor in children with dengue virus infection. *Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health*. 2010. 30(3), 213-218.

Wacharasindhu, S., Bunjobpudsa, Y., Tongmeesee, S., Aroonparkmongkol, S., Sahakitrungrueng, T., & Supornsilchai, V. Endocrine changes in children with dengue virus infection. *Asian Biomedicine (Research Reviews and News)*. 2010. 3(5), 557-561.

Wan, S. W., Lin, C. F., Yeh, T. M., Liu, C. C., Liu, H. S., Wang, S., ... & Lin, Y. S. Autoimmunity in dengue pathogenesis. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2013. 112(1), 3-11.

Wagner, W., Roderburg, C., Wein, F., Diehlmann, A., Frankhauser, M., Schubert, R., Liu & Ho, A. D. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2007. 25(10), 2638-2647.

Weyrich, A. S., & Zimmerman, G. A. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends in immunology*. 2004. 25(9), 489-495.

Weyrich, A. S., Schwertz, H., Kraiss, L. W., & Zimmerman, G. A. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009. 7(2), 241-246.

White JG. Platelet structure. In: Alan DMMD, editor. *Platelets*. Second ed. Burlington: Academic Press. 2007. p. 45-73.

WHO. WHO Recommended Surveillance Standards. Second edition. *Global Alert and Respose - Disease Outbreak Reported*. 2002. 116.

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

Wills, B. A., Oragui, E. E., Stephens, A. C., Daramola, O. A., Dung, N. M., Loan, H. T., ... & Levin, M. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with dengue shock syndrome. *Clinical infectious diseases*. 2002. 35(3), 277-285.

Wills, B., Van Ngoc, T., Van, N. T. H., Thuy, T. T. T., Thuy, T. T. N., Dung, N. M., ... & Farrar, J. Hemostatic changes in Vietnamese children with mild dengue correlate with the severity of vascular leakage rather than bleeding. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009. 81(4), 638-644.

Winkler, G., Maxwell, S. E., Ruemmler, C., & Stollar, V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*. 1989. 171(1), 302-305.

Wu, S. J. L., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., ... & Frankel, S. S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*. 2000. 6(7), 816-820.

Xu, T., Sampath, A., Chao, A., Wen, D., Nanao, M., Chene, P. & Lescar, J. Structure of the dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *Journal of virology*. 2005. 79(16), 10278-10288.

Yamashita, K., Matsuoka, H., Ochiai, T., Matsushita, R., Kubuki, Y., Suzuki, M., & Tsubouchi, H. Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the thrombopoietin mRNA expression in rat hepatocytes and cirrhotic rat livers. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2000. 15(1), 83-90.

Yang, K. D., Lee, C. S., Hwang, K. P., Chu, M. L., & Shaio, M. F. A model to study cytokine profiles in primary and heterologously secondary Dengue-2 virus infections. *Acta virologica*. 1995. 39(1), 19-21.

Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C., & Halloran, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of clinical microbiology*. 2000. 38(3), 1053-1057.

Zapf, J., Schmid, C. H., & Froesch, E. R. Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. *Clinics in endocrinology and metabolism*. 1984. 13(1), 3-30.

Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z. & Li, H. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *Journal of virology*. 2007. 81(8), 3891-3903.

Zhu, S., Li, H. B., & Flavell, R. A. Resemble and Inhibit: When RLR Meets TGF- β . *Molecular cell*. 2014. 56(6), 719-720.

Zimmerman, G. A., & Weyrich, A. S. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets new pathways to altered phenotype and function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008. 28(3), s17-s24.

12. Anexos

Anexo 1

Projeto Dengue

Laboratório de Imunologia Viral - FIOCRUZ

Mato Grosso do Sul - 2013

IDENTIFICAÇÃO	
Nome: _____	Prontuário: _____
Endereço: _____	
_____ Telefone: _____ e-mail: _____	
Sexo: () Masc () Fem	Data de Nascimento: ___/___/___
Data Entrevista: ___/___/___	Data Internação: ___/___/___

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	
Gestante: () Sim () Não	Dengue anterior: () Sim () Não
Vacina: () Febre amarela <10 anos () Rubéola/triviral	
Outros: _____	

HISTÓRIA CLÍNICA

Comorbidades:

Diabetes mellitus	DPOC	Asma brônquica	rinite	Hipertensão arterial
Doença cardíaca	Doença falciforme	Doença auto-imune	Tabagismo	Outros
Doença viral crônica? Quais?				

Faz uso de medicamentos contínuos? Especificar:

Sintomas suspeitos de dengue

Febre Data de Início da Febre: ___/___/___	Prostação/Astenia	Calafrios	Cefaléia	Mialgia	Dor lombar	Artralgia
Dor Retro-Ocular ao movimento do globo ocular	Dor de garganta	Tosse	Náuseas	Vômitos	Dor Abdominal	Diarréia
Epigastralgia	Tontura/Vertigem	Exantema	Prurido	Adenomegalias cervicais	Icterícia	Hiperemia conjuntival
Outros						

Atenção para os Sinais de Alarme

Dor Abdominal persistente	Sangramento espontâneo	Sangramento volumoso	Vômitos persistentes	Hepatomegalia	Derrame Pleural	Derrames Pericárdio
Ascite	Hipotensão Postural	Hipotensão Arterial	Desconforto respiratório	Hemoconcentração	Diarréia	
Outros						

Manifestações Hemorrágicas

Prova do laço	Petéquias	Gengivorragia	Epistaxe	Metrorragia
Outras				

LABORATORIAL

1º HT: _____ 1º Plaqueta: _____ data: ___/___/___

2º HT: _____ 2º Plaqueta: _____ data: ___/___/___

último HT: _____ última Plaqueta: _____ data: ___/___/___

Anexar dados do hemograma e bioquímica

Outras informações:

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ fui informado de que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre minha doença, que se chama DENGUE. **MINHA PARTICIPAÇÃO SERÁ APENAS PARA DOAR SANGUE DURANTE OU APÓS MEU ATENDIMENTO MÉDICO.** Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas com esta doença.

O procedimento será o seguinte: **UM VOLUME DE 5 ML OU DE 20 ML SANGUE** será obtido por punção da veia do antebraço, no mesmo momento em que for coletado sangue **PARA DOSAGEM DE PLAQUETAS E HEMATÓCRITO NECESSÁRIOS PARA CONHECER E CONTROLAR A GRAVIDADE DO MEU ESTADO. SEREI SOLICITADO A DOAR 5 OU 20 ML SANGUE UMA VEZ APÓS A RECUPERAÇÃO (ENTRE 1 A 2 MESES) COM A FINALIDADE DE CONFIRMAR A NORMALIDADE DOS EXAMES LABORATORIAIS.**

FOI-ME EXPLICADO QUE ESTA QUANTIDADE DE SANGUE REPRESENTA UMA PEQUENA PORÇÃO DO QUE POSSUO E SUA RETIRADA NÃO VAI ME PREJUDICAR.

A retirada do sangue será feita por um enfermeiro ou técnico do CRD. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local da punção, com duração de 3 a 5 dias. Todos os cuidados serão tomados, como uso de seringa, agulha e gaze descartáveis e álcool para assepsia local, entre outros. Quanto aos exames e procedimentos não foram identificados riscos até o momento.

Os resultados deste estudo serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto não será permitida a minha identificação, o que garante a minha privacidade.

O pesquisador responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contactar os demais pesquisadores envolvidos neste estudo.

MINHA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É INTERAMENTE VOLUNTÁRIA, E SOU LIVRE PARA RECUSAR A PARTICIPAR NO ESTUDO, OU ME RETIRAR EM QUALQUER FASE DA PESQUISA SEM QUE ISSO POSSA AFETAR OU PREJUDICAR O CUIDADO MÉDICO A QUE DEVO RECEBER.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos acima sejam realizados na minha pessoa.

Nome : _____

Eu, Responsável pelo menor acima identificado, autorizo sua participação, como voluntário (a) no presente projeto de pesquisa.

Data: _____

Nome : _____

Assinatura : _____

Pesquisadores: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (021) 8755-7771

Dra.Elzinandes L Azeredo (021) 7183-9093

Anexo 3



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo imunológico e genético durante a febre do dengue

Pesquisador: Claire Fernandes Kubelka

CAAE: 13318113.7.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 495.688

Data da Relatoria: 16/12/2013

Apresentação do Projeto:

Os autores pretendem estudar mecanismos fisiopatológicos da dengue, mais especificadamente, fatores imunológicos e genéticos relevantes à regulação da resposta antiviral e à patogênese da doença. No objetivo primário é descrito que o estudo reúne duas vertentes. Entretanto, são identificáveis três grandes estudos que se complementam.

São apresentados quatro objetivos e treze objetivos secundários.

O primeiro estudo é de caso-controle, considerando casos pacientes com manifestações clínicas indicadoras de gravidade (manifestações neurológicas e/ou co-morbidades) e controles pacientes sem estes sintomas. Os voluntários serão recrutados de bancos de dados dos centros participantes da pesquisa (UFMS e UPE) semelhante ao realizado pelo centro do RJ. Pretende-se determinar o perfil de citocinas e o perfil genético a fim de identificar biomarcadores específicos de gravidade através da correlação entre polimorfismo no gene e regulação da proteína como marcador de gravidade.

O segundo estudo é longitudinal, avaliando voluntários jovens na fase aguda da doença. Amostras de voluntários na fase aguda da doença serão processadas imediatamente ou estocadas nas instituições participantes do estudo, a fim de comparar a resposta imunológica de fase aguda com

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360

UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO

Telefone

: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br