

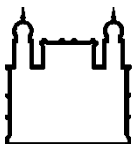
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Celular e Molecular**

**MECANISMOS DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NA DENGUE:
CONTRIBUIÇÕES PARA A PATOGÊNESE**

EUGENIO DAMACENO HOTTZ

Rio de Janeiro

Março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

EUGENIO DAMACENO HOTTZ

Mecanismos de Ativação Plaquetária na Dengue: Contribuições para a Patogênese

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular na área de concentração em Imunologia e Farmacologia

Orientadores: Profa. Dra. Patrícia Torres Bozza

Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

RIO DE JANEIRO

2014

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

H834 Hottz, Eugenio Damaceno

Mecanismos de ativação plaquetária na dengue: contribuições para a patogênese / Eugenio Damaceno Hottz. – Rio de Janeiro, 2014.

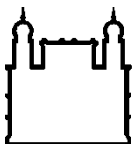
xvii, 178 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 101-125

1. Dengue. 2. Ativação plaquetária. 3. Inflamassoma. 4. Apoptose. 5. Trombocitopenia. 6. Permeabilidade endotelial. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Eugenio Damaceno Hottz

**MECANISMOS DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NA DENGUE:
CONTRIBUIÇÕES PARA A PATOGÊNESE**

ORIENTADORES: Profa. Dra. Patrícia Torres Bozza

Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Aprovada em 13/03/2014

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Ada Maria de Barcelos Alves – Presidente

Prof. Dr. João Trindade Marques

Prof. Dr. Dario Zamboni

Profa. Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto – Revisora e Suplente

Prof. Dr. Robson Monteiro – Suplente

Rio de Janeiro, 13 de março de 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a equipe do Laboratório de Imunofarmacologia pelo aprendizado e principalmente pela amizade. Neste seleto grupo de amigos devo especial agradecimento aos meus orientadores Patrícia T. Bozza e Fernando A. Bozza pelo entusiasmo ao lidar com questões científicas, e pela oportunidade de conhecer um pouco do que é fazer ciência em família. Agradeço aos demais membros do laboratório, principalmente aqueles que estiveram diretamente envolvidos na realização deste trabalho como Gisele B. Lima, Isabel M. Medeiros-de-Moraes, Juliana Lopes, Alan B. Carneiro, Carla Freitas e Edson F. de Assis. Agradeço a nossa amiga Rose B. Rodrigues, conhecedora de todos os processos envolvidos na rotina administrativa do laboratório e que muito nos ajuda ao compartilhar conosco este conhecimento, facilitando assim processos indispensáveis ao nosso trabalho. Agradeço, enfim, aos amigos Jaime R. Filho, Livia Teixeira, Nathalia Roque e Narayana F. Bastos não tão envolvidos com este projeto, mas cuja presença e convívio se fizeram indispensáveis no dia-a-dia.

Dedico agradecimentos especiais aos amigos da Universidade de Utah Guy A. Zimmerman, Andrew S. Weyrich, Jasse Rowley, Neal Toley, Adriana Vieira-de-Abreu, Robert Campbell, Sebastian Schubert e Elizabeth Middleton. Primeiramente aos professores Andrew Weyrich e Guy Zimmerman por abrirem as portas do laboratório no qual fui tão bem recebido. Agradeço ao professor Guy Zimmerman pela atenção dada sempre que possível e por me mostrar o quão valorosas podem ser conversas curtas entre experimentos, entre palestras, em trajetos rápidos pelos corredores da universidade (...). Muito obrigado a Adriana Vieira-de-Abreu e Robert Campbell pela amizade e pela boa vontade e entusiasmo em discutir resultados, protocolos e desenhos experimentais, ideias valiosas surgiram de nossas *brainstorms*.

Agradeço aos colaboradores e amigos da UFRJ. Muito obrigado ao professor Marcus Fernandes de Oliveira e ao Luiz Felipe G. Souza, do Laboratório de Bioquímica de Resposta ao Estresse, entusiastas no estudo da bioquímica redox e das funções mitocondriais em plaquetas. Agradeço também a professora Andréa T. Da Poian, do laboratório de Bioquímica de Vírus e ao professor Marcelo T. Bozza do Instituto de Microbiologia, pela contribuição valiosa na discussão do projeto em diversos momentos deste doutoramento.

Aos colaboradores do IPEC Rogério Valls-de-Souza, André M. Japiassú, Emerson C. Mesquita e Rodrigo Amâncio pela amizade e ajuda na análise dos dados clínicos de pacientes. Às médicas do ambulatório de Doenças Febris Agudas (DFA) Patrícia Brasil, Otilia Lupi, Elizabeth Machado e Carolina Romero pela ajuda na inclusão de pacientes com

dengue, indispensáveis para a realização deste estudo. Agradeço também aos colaboradores do INCA Matheus Rajão, Mirian Werneck e João Viola.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular, especialmente aos coordenadores Milton Ozório Moraes e Leila Mendonça Lima. Agradeço à Daniele Lobato pela ajuda indispensável nos processos administrativos da pós-graduação.

Finalizo este agradecimento com o mais sincero “Muito Obrigado” que me permito dizer, este eu dedico aos meus pais pelo incentivo e pela fé nas minhas escolhas. Não importa o quão longe eu caminhe, sei que sempre acreditarão nos quilômetros adiante. Agradeço aos meus irmãos Angelo D. Hottz e Isaias D. Hottz pelo apoio e pela mão estendida, obrigado.

Agradeço o suporte financeiro do CNPq, CAPES e da FAPERJ.

ÍNDICE

1 Introdução	1
1.1 Agente etiológico.....	2
1.2 História natural e classificação da dengue.....	4
1.3 Epidemiologia.....	6
1.4 Patogenia.....	9
1.4.1 Mecanismos de plaquetopenia na dengue.....	16
1.4.2 Plaquetas como efetores imunes e inflamatórios e seu potencial impacto na patogênese da dengue.....	19
1.5 Hipótese e justificativa.....	22
2 Objetivos	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 Material e Métodos	24
3.1 Pacientes e voluntários saudáveis.....	24
3.2 Isolamento de plaquetas.....	26
3.3 Isolamento de monócitos.....	27
3.4 Produção e titulação do DENV-2.....	28
3.5 Ativação in vitro de plaquetas com agonistas ou com o DENV.....	29
3.6 Interação plaqueta-monócito in vitro.....	29
3.7 Citometria de Fluxo.....	30
3.7.1 Análise das micropartículas derivadas de plaquetas.....	31
3.7.2 Avaliação dos agregados plaqueta-monócito.....	32
3.7.3 Avaliação da Função mitocondrial.....	32
3.7.4 Ensaio de fagocitose de plaquetas.....	33
3.8 Western blot.....	33
3.9 Microscopia de fluorescência confocal.....	34
3.10 Ensaio de permeabilidade endotelial em Transwell.....	34
3.11 Adesão de Monócitos a P-selectina e fosfatidilserina imobilizadas.....	35
3.12 Dosagem de citocinas.....	35
3.13 Medida da atividade da citrato-sintase.....	36
3.14 Análise estatística.....	36
4 Resultados	37
4.1 Ativação plaquetária e infecção pelo DENV.....	37
4.1.1 Ativação Plaquetária em pacientes com dengue.....	37
4.1.2 DENV-2 induz ativação plaquetária in vitro.....	39
4.1.3 A ativação plaquetária está associada com a gravidade da dengue.....	41
4.2 Ativação plaquetária e resposta inflamatória na dengue.....	44
4.2.1 DENV-2 induz a secreção de fatores estocados em granulos plaquetários.....	44
4.2.2 Infecção pelo DENV induz síntese e secreção de IL-1 β em plaquetas.....	47

4.2.3 Infecção pelo DENV induz secreção de MPs contendo IL-1 β em plaquetas.....	49
4.2.4 Ativação do inflamassoma NLRP3 em plaquetas de pacientes com dengue.....	50
4.2.5 A secreção de MPs contendo IL-1 β depende da ativação de caspase-1.....	52
4.2.6 Espécies reativas de oxigênio derivadas da mitocôndria ativam o inflamassoma em plaquetas expostas ao DENV.....	53
4.2.7 Quinases da família RIP contribuem para a ativação do inflamassoma em plaquetas expostas ao DENV via mecanismos dependentes de ROS _m	55
4.2.8 A síntese de IL-1 β em plaquetas e a secreção de MPs contendo IL-1 β estão associadas com aumento de permeabilidade vascular na dengue.....	57
4.2.9 Aumento da agregação plaqueta-monócito em pacientes com dengue.....	60
4.2.10 A formação de agregados plaqueta-monócito está associada com plaquetopenia e aumento de permeabilidade vascular em pacientes com dengue.....	61
4.2.11 Expressão aumentada de moléculas co-estimulatórias em agregados plaqueta-monócitos.....	63
4.2.12 Plaquetas de pacientes com dengue agregam com monócitos controle e induzem secreção de citocinas <i>in vitro</i>	65
4.3 Apoptose plaquetária na dengue.....	68
4.3.1 Disfunção mitocondrial em plaquetas de pacientes com dengue.....	68
4.3.2 Dengue induz ativação da via intrínseca de apoptose em plaquetas.....	69
4.3.3 Associação da disfunção mitocondrial e apoptose plaquetária com plaquetopenia em pacientes com dengue.....	73
4.3.4 Plaquetas apoptóticas induzem secreção de IL-10 em monócitos de modo dependente da expressão de P-selectina e da exposição de fosfatidilserina.....	73
4.3.5 O reconhecimento da fosfatidilserina é suficiente para a secreção de IL-10 por monócitos.....	76
4.4 Receptores na ativação plaquetária induzida pelo DENV.....	79
4.4.1 DENV-2 ativa plaquetas por vias que envolvem DC-SIGN.....	79
5. Discussão.....	82
5.1 Ativação plaquetária e secreção de citocinas na dengue.....	83
5.2 A síntese e secreção de IL-1 β e a descrição do inflamassoma NLRP3 em plaquetas.....	86
5.3 Interações plaqueta-monócito na dengue.....	90
5.4 Apoptose plaquetária e plaquetopenia na dengue.....	93
5.5 Ativação plaquetária como alvo para intervenção terapêutica na dengue.....	95
5.6 Perspectivas.....	96
5.7 Considerações finais.....	98
6 Conclusões.....	100
Referências.....	101
ANEXO I: Platelets in dengue infection. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. Vol 8(1-2): e33-e38, 2011.....	126

ANEXO II: Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. <i>Blood</i> . 122(20): 3405-14, 2013.....	132
ANEXO III: Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. <i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i> . 11: 951-62, 2013.....	142
ANEXO IV: Emerging Concepts in Dengue Pathogenesis: Interplay between Plasmablasts, Platelets and Complement in Triggering Vasculopathy. <i>Critical Reviews in Immunology</i> . 34(3): 227-40, 2014	154
ANEXO V: Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. <i>The Journal of Immunology</i> . 15;193(4):1864-72, 2014.....	168
ANEXO VI: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – IPEC/ FIOCRUZ.....	178

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura e genoma do DENV.....	3
Figura 1.2: História natural da dengue.....	5
Figura 1.3: População sob risco de transmissão da dengue e áreas com atividade epidêmica.....	7
Figura 1.4: Mecanismos de plaquetopenia na infecção pelo DENV	17
Figura 3.1: Identificação das MPs por citometria de Fluxo e método para isolamento das MPs.....	31
Figura 4.1: Ativação plaquetária em pacientes com dengue.....	38
Figura 4.2: DENV-2 induz ativação plaquetária.....	40
Figura 4.3: Ativação plaquetária em pacientes com dengue de acordo com a apresentação clínica.....	43
Figura 4.4: DENV-2 induz a secreção de fatores estocados em grânulos plaquetários.....	46
Figure 4.5: Síntese de IL-1 β em plaquetas de pacientes com dengue ou plaquetas expostas ao DENV-2 <i>in vitro</i>	48
Figura 4.6: DENV induz a secreção de MPs plaquetárias contendo IL-1 β	49
Figura 4.7: Ativação do inflamassoma NLRP3 em plaquetas de pacientes com dengue.....	51
Figura 4.8: A ativação de caspase-1 em plaquetas intermedia a secreção de micropartículas contendo IL-1 β	52
Figura 4.9: DENV ativa o inflammasoma em plaquetas por vias que requerem a geração de ROS na mitocôndria.....	54
Figura 4.10: Quinases da família RIP ativam o inflamassoma por vias dependentes de ROS mitocondriais.....	56
Figura 4.11: Aumento na permeabilidade vascular está associado com a secreção de IL-1 β em micropartículas plaquetárias.....	58
Figura 4.12: IL-1 β em MPs de plaquetas ativadas pelo DENV induz aumento de permeabilidade endotelial.....	59
Figure 4.13: Formação de agregados plaqueta-monócito em pacientes com dengue...	60
Figura 4.14: Agregados plaqueta-monócito estão associados com plaquetopenia e aumento de permeabilidade vascular na dengue.....	62
Figura 4.15: Aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias em agregados plaqueta-monócito de pacientes com dengue.....	64
Figura 4.16: Plaquetas de pacientes com dengue agregam com monócitos controle <i>in vitro</i>	65
Figura 4.17: Plaquetas de pacientes com dengue modulam a secreção de citocinas em monócitos.....	67
Figura 4.18: Dengue induz disfunção mitocondrial e exposição de fosfatidilserina em plaquetas.....	70

Figura 4.19: Dengue induz ativação de caspases e apoptose em plaquetas.....	72
Figura 4.20: Plaquetas apoptóticas induzem secreção de IL-10 em agregados plaqueta-monócito.....	74
Figura 4.21: Reconhecimento de fosfatidilserina modula secreção de IL-10 em agregados plaqueta-monócito.....	75
Figura 4.22: A fagocitose de plaquetas apoptóticas depende do reconhecimento de fosfatidilserina (PS) mas é dispensável para a secreção de IL-10.....	77
Figura 4.23: A adesão à fosfatidilserina (PS) induz secreção de IL-10 em monócitos independentemente da presença de P-selectina (CD62P).....	78
Figura 4.24: DENV-2 ativa plaquetas por mecanismos que envolvem DCSIGN.....	80
Figura 4.25: Ativação plaquetária induzida pelo DENV-2 correlaciona com a expressão de DCSIGN.....	81
Figura 5.1: Representação esquemática da ativação plaquetária na dengue mostrando sua relação com a patogenia e mecanismos moleculares envolvidos.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Principais citocinas alteradas na infecção pelo DENV e suas relações com aspectos clínicos e laboratoriais da dengue.....	14
Tabela 3.1: Características dos pacientes com dengue.....	25
Tabela 3.2: Características dos pacientes com doença febril não dengue.....	26
Tabela 4.1: Correlação entre ativação plaquetária e dados laboratoriais de pacientes com dengue.....	42
Tabela 4.2: correlações dos componentes do inflamossoma com dados laboratoriais de pacientes com dengue.....	57
Tabela 4.3: Correlação entre a formação de agregados plaqueta-monócito e dados laboratoriais de pacientes com dengue.....	61
Tabela 5.1: Análise de sequencias de RNAm de megacariócitos infectados com o DENV-2 ou Mock indica aumento de transcritos para componentes do inflamassoma nas células infectadas.....	89
Tabela 5.2: Análise de sequencias de RNA de plaquetas isoladas de voluntários saudáveis e pacientes com dengue.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACD- Anticoagulante composto por ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose;
- ADE – Amplificação dependente de anticorpos;
- ALT – Alanina transaminase;
- ANOVA – Análise de variância
- ARC – Célula reticular adventícia;
- ASC - Proteína do tipo *speck* associada a apoptose contendo domínio de recrutamento de caspase;
- AST – Aspartato transaminase;
- BHK – Células *baby hamster kidney*;
- C – Proteína do capsídeo dos Flavivirus;
- Caspase – Protease de cisteína-aspartato;
- CCL - Quimiocina ligante do motivo CC;
- CCR – Receptor de quimiocina do motivo CC;
- CD – Cluster de diferenciação;
- CLEC-5 – Receptor semelhante a lectina tipo C
- CoA – Coenzima A
- CO₂ – Dióxido de carbono;
- CXCL – Quimiocina ligante do motivo CXC;
- DC-SIGN – Não-integrina acoplada a ICAM-3 específica de célula dendrítica;
- DENV – Vírus dengue;
- DENV-2 AS – Genótipo Sudeste Asiático do DENV-2;
- DENV-2 AM – Genótipo Americano do DENV-2;
- DFND – Doença febril não dengue;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

E – Proteína do envelope dos Flavivírus;

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético;

ELISA – Ensaio imunoenzimático de captura

FasL – Ligante do Fas;

FCCP – Carbonil cianida 4(trifluorometoxil) fenilhidrazona;

Fc – Fração de ligação ao complemento de imunoglobulinas;

Fc γ R – Receptor para a fração Fc de imunoglobulina G;

FD – Febre do Dengue;

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto;

FHD – Febre Hemorrágica do Dengue;

FITC - Fluoresceína Isotiocinato

FLICA – Inibidor de caspase fluorescente;

HBSS – Solução salina balanceada de Hanks

HLA – Antígeno leucocitário humano;

HMEC-1 – Células endoteliais de microvasculatura de derme humana

HSA – Albumina de soro humano;

Ig – Imunoglobulina;

IL – Interleucina;

IMF – Intensidade média de fluorescência;

ICAM – Molécula de adesão intercelular;

IFN – Interferon;

IL-1Ra – Antagonista do receptor de IL-1;

IP-10 – Proteína 10 induzida por IFN;

LPS – Lipopolissacarídeo;

M – Proteína da membrana dos Flavivírus;

MCP – Proteína quimioatraente de macrófagos;

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade;

MIF – Fator inibidor da migração de macrófagos;

MIP – Proteína inflamatória de macrófagos;

MP – Micropartícula;

MS – Ministério da Saúde;

Nec-1 – Necrostatina-1

NLR- Receptor do tipo NOD

NLRP3- NLR contendo domínio pirina 3

NS – Proteína não estrutural de Flavivírus;

OMS – Organização Mundial de Saúde;

OPAS – Organização Panamericana de Saúde;

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico;

PBS – Tampão fosfato e salina;

PGE₁ – Prostaglandina E₁;

PE – Ficoeritrina

PF – Fator plaquetário;

PFU – Unidade formadora de plaque;

PS – fosfatidilserina;

PSG – Tampão PIPES, salina e glicose;

PSGL-1 – Ligante 1 da glicoproteína P-selectina;

PrM – Proteína pré-membrana dos Flavivírus;

PRP – Plasma rico em plaquetas;

PRR- Receptor de reconhecimento de padrão;

RANTES – Regulado por ativação, expresso e secretado por célula T normal;

RIP – Proteína de interação com receptor;

RNA – Ácido Ribonucleico;

ROS – Espécies reativas de oxigênio;

ROS_m – Espécies reativas de oxigênio de origem mitocondrial;

RPKM – leituras por kilobase de exons por milhões de leituras mapeadas;

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase acoplado a transcrição reversa;

SCD – Síndrome do choque por dengue;

SFB – Soro fetal bovino;

sIL2R – Receptor solúvel de IL-2;

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação;

SVS – Serviço de Vigilância em Saúde;

TBS – Tampão Tris e salina;

TF – Fator tissular;

TGF – Fator de crescimento e transformação;

TGO - Transaminase glutâmica oxalacética;

TGP - Transaminase Glutâmico Pirúvica;

TMRE – Tetrametilrodamina etil éster;

TMRM - Tetrametilrodamina metil éster;

TNF – Fator de necrose tumoral;

TRAIL – Ligante indutor de apoptose associado ao TNF;

UV – Ultra-violeta;

VCAM – Molécula de adesão de célula vascular;

VEGF – Fator de crescimento de endotélio vascular;

$\Delta\psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial;

I can't think of a better way to waste my time than try

What are you working for?

What are you searching for?

Emma Anzai e Shim Moore –*What are you looking for*

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**MECANISMOS DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NA DENGUE:
CONTRIBUIÇÕES PARA A PATOGÊNESE**

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Eugenio Damaceno Hottz

A dengue é a arbovirose humana mais prevalente no mundo. A infecção pelo vírus da dengue (DENV) tem um vasto espectro de sintomas, causando desde febre auto-limitada até casos graves com sangramento e choque podendo evoluir para o óbito. Apesar de plaquetopenia ser frequentemente observada em pacientes com dengue, a participação das plaquetas na patogênese da dengue permanece pouco explorada. Nós inicialmente investigamos a ativação plaquetária em pacientes com dengue ou em plaquetas expostas ao DENV *in vitro*. Na tentativa de associar a ativação plaquetária com mecanismos imunopatogênicos da dengue, a secreção de citocinas e quimiocinas em plaquetas estimuladas com o DENV e a síntese de IL-1 β em plaquetas de pacientes com dengue foram investigadas. Os mecanismos envolvidos no processamento e secreção da IL-1 β , bem como suas contribuições para a permeabilidade endotelial também foram objetos de estudo. A formação de agregados plaqueta-monócito e a expressão de marcadores de ativação de monócitos também foram avaliados em pacientes com dengue. Finalmente, nós investigamos o impacto da apoptose de plaquetas na dengue e sua relação com o desfecho de plaquetopenia. Nossos resultados indicam intensa ativação plaquetária em pacientes com dengue, especialmente em pacientes com dengue grave. Nós observamos uma expressão elevada de IL-1 β em plaquetas e micropartículas (MP) derivadas de plaquetas de pacientes com dengue, ou após a exposição de plaquetas ao DENV *in vitro*. Nós demonstramos que a dengue induz a montagem do inflamassoma NLRP3, ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β de modo dependente da geração de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. A IL-1 β sintetizada por plaquetas foi secretada principalmente em MPs. A ativação do inflamassoma e secreção de MPs contendo IL-1 β correlacionaram com sinais de permeabilidade endotelial aumentada nos pacientes. Além disso, MPs recuperadas de plaquetas expostas ao DENV induziram aumento de permeabilidade endotelial *in vitro* de modo dependente do receptor de IL-1. Plaquetas de pacientes com dengue também apresentaram características de apoptose como despolarização da mitocôndria, ativação de caspase-3 e de caspase-9 e exposição de fosfatidilserina, que foram associadas à plaquetopenia nos pacientes com dengue. Nós também demonstramos níveis elevados de agregados plaqueta-monócito em pacientes com dengue. A exposição de monócitos isolados de voluntários saudáveis a plaquetas isoladas de pacientes com dengue induziu a secreção das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-10 e MCP-1 pelos monócitos. A secreção de citocinas nos agregados plaqueta-monócito foi dependente tanto da adesão mediada por P-selectina quanto do reconhecimento de plaquetas apoptóticas, que regulou a secreção de IL-10. Nossos resultados trazem novas evidências de que as plaquetas participam ativamente como efetoras da resposta inflamatória na dengue, e contribuem para os mecanismos patogênicos envolvidos nas alterações hemodinâmicas comuns aos casos de dengue grave.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**MECHANISMS FOR PLATELET ACTIVATION IN DENGUE: CONTRIBUTIONS
TO THE PATHOGENESIS**

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Eugenio Damaceno Hottz

Dengue is the most frequent hemorrhagic viral disease and re-emergent infection in the world. Dengue infection has a large spectrum of clinical manifestations from self-limited febrile illness to severe syndromes accompanied by bleeding and shock. Although thrombocytopenia is characteristically observed in mild and severe forms of dengue, the role of platelet activation in dengue pathogenesis has not been fully elucidated. We hypothesize that platelet activation have major roles in inflammatory amplification and increased vascular permeability during severe forms of dengue. Here we investigate platelet activation in patients with dengue or in platelets exposed to DENV *in vitro*. The secretion of cytokines and chemokines in DENV-stimulated platelets and the synthesis of IL-1 β in platelets from patients with dengue were investigated. The mechanisms involved in processing and secretion of IL-1 β , as well as potential contribution of these events to endothelial permeability during infection were also evaluated. Platelet-monocyte aggregates formation and markers of monocyte activation were evaluated in patients with dengue. Finally, we investigated the impact of platelet apoptosis in dengue-associated thrombocytopenia. Our results show increased platelet activation in patients with dengue, especially patients with severe dengue. We showed higher expression of IL-1 β in platelets and platelet-derived MPs from patients with dengue or after platelet exposure to DENV *in vitro*. We demonstrated that DENV infection leads to assembly of NLRP3 inflammasomes, activation of caspase-1, and caspase-1-dependent IL-1 β secretion. Our findings also indicate that platelet-derived IL-1 β is chiefly released in MPs through mechanisms dependent on mitochondrial reactive oxygen species-triggered NLRP3 inflammasomes. Inflammasome activation and platelet shedding of IL-1 β -rich microparticles correlated with signs of increased vascular permeability. Moreover, microparticles from DENV-stimulated platelets induced enhanced endothelial permeability *in vitro* in an IL-1R-dependent manner. Platelets from dengue-infected patients also showed characteristics of apoptosis, including mitochondrial depolarization, activation of caspase-3 and -9 and phosphatidylserine exposure, which were associated with thrombocytopenia. We also observed increased levels of platelet-monocyte aggregates in blood samples from patients with dengue. The exposure of monocytes from healthy volunteers to platelets from patients with dengue induced the secretion of the cytokines IL-1 β , IL-8, IL-10 and MCP-1. In addition to the well-established modulation of monocyte cytokine responses by activated platelets through P-selectin binding, we found that interaction of monocytes with apoptotic platelets mediate IL-10 secretion through phosphatidylserine recognition in platelet-monocyte aggregates. Our findings provide new evidence that platelets actively participate as effector cells in inflammatory response of dengue infection, and contribute to the pathogenesis of dengue-associated vasculopathy.

1 Introdução

A dengue é uma doença infecciosa aguda causada pelo vírus da dengue (DENV), um membro da família flaviviridae e gênero *Flavivirus* do qual são conhecidos pelo menos quatro sorotipos (DENV-1 a 4) (Guzmán e Kouri, 2002). A infecção por qualquer dos quatro sorotipos pode ser assintomática ou causar doença de intensidade variada, desde doença febril auto-limitada (dengue branda ou clássica) até quadros graves com alterações de permeabilidade vascular, sangramentos e choque, podendo progredir para o óbito (Vaughn et al, 1997; OMS, 2009). A reemergência da dengue nas últimas décadas com aumento das epidemias em número e gravidade faz da dengue, atualmente, a principal arbovirose humana no mundo (OMS, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas sob risco de transmissão, ocorrendo por ano entre 50 e 100 milhões de infecções, 500.000 casos de dengue grave e 12.500 mortes (OMS, 2013). Recentemente, Bhatt e colaboradores (2013) reportaram uma expansão global da dengue, incluindo o aumento da frequência de casos graves, com incidência mais de três vezes maior que o estimado pela OMS. De acordo com esta estimativa, ocorreriam anualmente 390 (95% IC 284-528) milhões de infecções, sendo 96 (95% IC 67-136) milhões de infecções sintomáticas. A estimativa para o Brasil foi de mais de 5 milhões de casos em 2010 (Bhatt et al, 2013), enquanto o número de casos notificados ao Ministério da Saúde foi de 1.027.100 casos (MS/SVS/SINAN, 2013).

Enquanto as epidemias de dengue se expandem em território e magnitude, não são conhecidas terapias antivirais específicas e apenas tratamento de suporte é oferecido aos pacientes com dengue (OMS, 2009). Tampouco existe uma vacina tetravalente licenciada e, recentemente, os testes clínicos com o candidato vacinal em estágio mais avançado não ofereceu proteção contra o DENV-2 (Sabchareon et al, 2012). O controle tem focado no combate ao principal vetor urbano o mosquito *Aedes aegypti*, no entanto esta estratégia não tem conseguido conter a transmissão e avanço da dengue como um dos principais agravos da faixa tropical e subtropical (Gubler, 1998). Nesse contexto, entender os mecanismos patogênicos envolvidos nos quadros de dengue, principalmente nos casos de dengue grave, é de suma importância para o estabelecimento de novos alvos terapêuticos e melhor manejo clínico da doença.

Diferentes hipóteses têm sido propostas para a patogênese da dengue. Apesar de nenhuma hipótese sozinha explicar satisfatoriamente todos os casos de dengue grave, parece consensual que uma ativação imune exacerbada com intensa secreção de citocinas pró-inflamatórias é crucial para a vasculopatia associada a dengue (Pang et al, 2007; Bozza et al, 2008). No entanto, os mecanismos responsáveis pela intensificação da resposta inflamatória na dengue e seus principais efetores não são totalmente conhecidos. Enquanto a participação de efetores imunes como linfócitos e monócitos ativados é amplamente descrita (Durbin et al, 2008; Jaiyen et al, 2009; Dung et al, 2010; Azeredo et al, 2010), apenas recentemente a contribuição de outros efetores como as plaquetas tem sido explorada. As plaquetas, classicamente conhecidas por sua atividade hemostática, são cada vez mais reconhecidas como células inflamatórias (Weyrich et al, 2003; Sample et al, 2011; Vieira-de Abreu et al, 2012). Nesta tese, nós investigamos a participação das plaquetas na patogênese da dengue, focando em seu impacto na ativação imune e amplificação inflamatória, bem como os mecanismos envolvidos na ativação plaquetária durante a infecção. Este primeiro capítulo apresenta brevemente o estado atual do conhecimento a respeito da dengue, e das plaquetas como componentes da resposta imune e inflamatória, sendo, portanto, potenciais efetoras na patogênese da dengue.

1.1 Agente etiológico

O DENV é um membro do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae* classificado em um complexo antigênico que compreende quatro sorotipos (DENV-1 a 4) (Guzman e Kouri, 2002). É um vírus pequeno, de aproximadamente 50 nm, composto por um envelope lipídico que contem em sua superfície as glicoproteínas E (envelope) e M (membrana), envolvendo um nucleocapsídeo composto por genoma RNA em conjunto com múltiplas cópias da proteína C (capsídeo) (Lindenbach et al, 2007) (Figura 1.1 A). O genoma dos *Flavivirus* consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, e portanto infeccioso, com aproximadamente 11 kb. O genoma apresenta uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica para uma poliproteína que é posteriormente clivada por uma combinação de proteases viral e do hospedeiro em proteínas estruturais (C-prM-E) e não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3- NS4A-NS4B-NS5) (Chambers et al, 1990) (Figura 1.1 B e C).

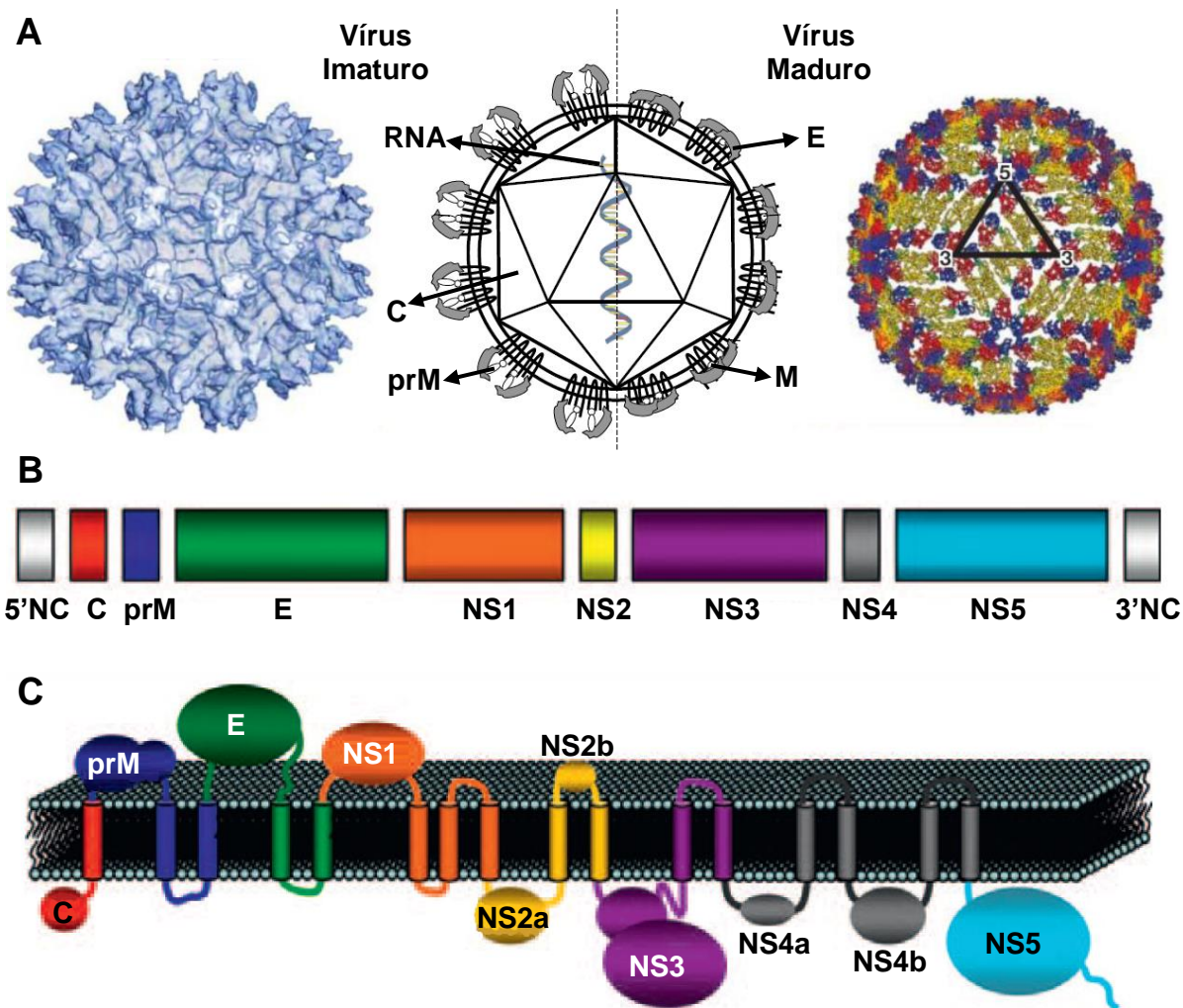


Figura 1.1: Estrutura e genoma do DENV. (A) Representação esquemática das proteínas estruturais na partícula viral imatura (esquerda) e na partícula viral madura (direita). (B-C) Representação esquemática da organização e expressão do genoma viral: (B) Regiões codificantes para as proteínas estruturais (C-prM-E) e não-estruturais (NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5) flanqueadas pelas regiões 3' e 5' não-codificantes (3'NC e 5'NC); (C) topologia da poliproteína na membrana do retículo endoplasmático (adaptado de Chambers et al, 1990; Heinz e Allison, 2001; Kuhn et al, 2002; Mukhopadhyay et al, 2005; e Lindenbach et al, 2007).

O vírus é rapidamente inativado a 50°C, com um decréscimo de 50% na infectividade a cada 10 minutos nessa temperatura. A infectividade também é sensível à inativação por luz ultravioleta (UV), solventes lipídicos, detergentes iônicos e não iônicos, e digestão por tripsina, papaína e lípase pancreática (Russel et al, 1980; Brinton, 1986).

A interação do DENV com a célula inicia-se com a ligação a certos receptores de superfície celular. A infecção de células dendríticas requer a expressão de DC-SIGN na célula alvo (Tassaneetrithep et al, 2003). Além de DC-SIGN, heparan sulfato, HSP70 e 90, GRP78 (BiP), moléculas relacionadas ao CD14, e integrina $\alpha_v\beta_3$ têm sido indicados como receptores para o DENV (Mukhopadhyay et al, 2005; Zhang et al, 2007; Green et al, 2014). Recentemente, Meertens e colaboradores (2012) demonstraram que os receptores de fosfatidilserina TIM e TAM podem mediar a ligação do DENV em células mononucleares via interação com a fosfatidilserina exposta na membrana viral.

1.2 História natural e classificação da dengue

A infecção pelo DENV ocorre durante o repasto de um mosquito *A. aegypti* infectado em um hospedeiro humano susceptível. Após a infecção, o período de incubação varia de 4 a 7 dias. Os quadros sintomáticos geralmente cursam com febre autolimitada de 2 a 7 dias acompanhada de dor de cabeça, mialgia, artralgia, prostração e anorexia. A defervescência marca o início da fase crítica, caracterizada por hemoconcentração, hipotensão, leucopenia, e plaquetopenia. Os níveis mais elevados do hematócrito e as contagens mais baixas de plaquetas são geralmente observados nesta fase. A partir da defervescência, na ausência de aumento importante da permeabilidade vascular o paciente evolui com melhora clínica; alterações importantes de permeabilidade, no entanto, podem levar ao extravasamento grave de plasma com efusão pleural, ascite, choque e/ou comprometimento orgânico decorrente da hipoperfusão, caracterizando assim a evolução para dengue grave. Manifestações hemorrágicas como petéquias, exantema, gengivorragia e, menos frequentemente, sangramento do trato gastrointestinal, metrorragia e hematúria podem ser observadas tanto na dengue clássica quanto na dengue grave, mas hemorragias importantes são mais comumente observadas nos quadros graves. A fase de recuperação (convalescência) inicia com melhora do estado geral, estabilização ou redução do hematócrito, aumento progressivo da contagem de plaquetas e reabsorção do líquido extravasado (Figura 1.2) (OMS, 2009).

Apesar do vasto espectro de apresentações clínicas, não é possível prever a evolução de um paciente ainda na fase febril. No entanto, a triagem adequada e intervenção terapêutica com hidratação venosa pode tanto prevenir a evolução para condições clínicas

mais graves, quanto reduzir significativamente a mortalidade nos casos de dengue grave. Por esta razão a OMS (2009) propôs a classificação dos pacientes com dengue clássica em dois grupos: dengue com ou sem sinais de alarme. Os sinais de alarme incluem dor abdominal, vômitos persistentes, sinais clínicos de extravasamento de fluido (hipotensão postural, oligúria), sangramento de mucosa, letargia, hepatomegalia (com aumento do fígado superior a 2 cm) ou aumento no hematócrito concorrente com declínio rápido da contagem de plaquetas. Deve-se lembrar que mesmo os pacientes que não apresentam sinais de alarme podem evoluir para dengue grave (OMS, 2009).

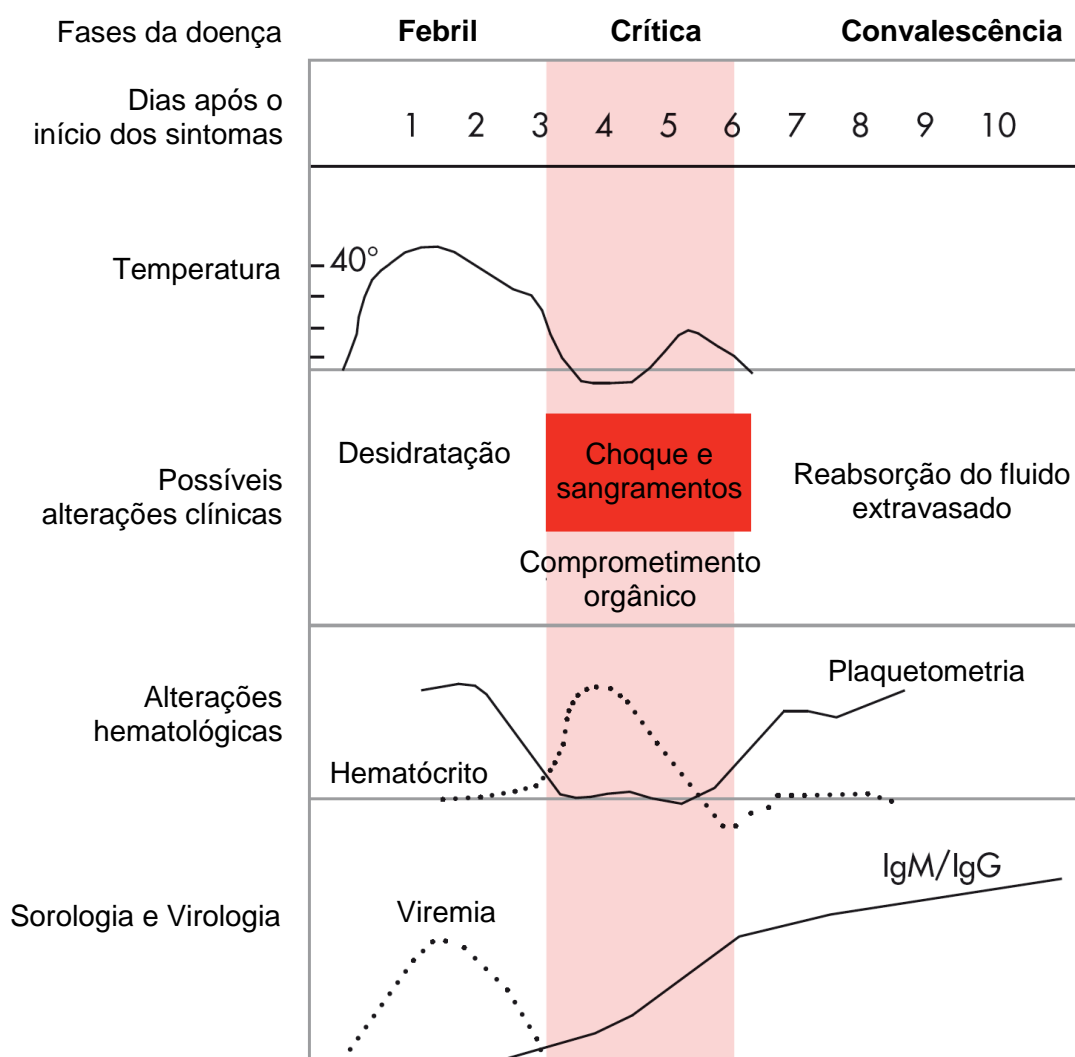


Figura 1.2: História natural da dengue. Curso das alterações clínicas e laboratoriais após início dos sintomas (OMS, 2009).

A classificação de casos em dengue clássica, dengue clássica com sinais de alarme ou dengue grave descrita acima foi proposta em substituição ao sistema de classificação anterior no qual os pacientes eram classificados como febre do dengue (FD) ou febre hemorrágica do dengue (FHD), sendo esta última caracterizada por manifestações hemorrágicas com hepatomegalia, plaquetopenia ($<100.000/\text{mm}^3$), hemoconcentração e hipoproteinemia. Pacientes com FHD eram ainda classificados em quatro graus de gravidade (FHD I – IV) sendo os graus III e IV definidos como síndrome do choque por dengue (SCD) (OMS, 1997). A necessidade de rever a classificação dos casos de dengue decorre da entrada da dengue na América Latina e outras regiões onde a infecção de populações adultas e geneticamente distintas refletiu em diferenças na apresentação clínica da dengue em relação aos casos pediátricos do Sudeste Asiático nos quais se baseava a classificação anterior. Desse modo, a aplicação estrita desse protocolo falhava em classificar pacientes clinicamente graves que não preenchiam completamente os critérios para FHD (Balmaseda et al, 2005; Deen et al, 2006; Rigau-Perez, 2006; Bandyopadhyay et al, 2006; OMS, 2009). Para a realização do presente estudo nós usamos a classificação revisada de casos (OMS, 2009), no entanto, estudos atuais ainda classificam os pacientes em FD/FHD/SCD e os resultados destas publicações serão citados nesta tese de acordo com a classificação usada pelos autores.

1.3 Epidemiologia

A dengue é hoje a principal virose reemergente no mundo. Segundo registros da OMS (2009), a incidência da dengue aumentou cerca de 30 vezes nos últimos 50 anos. Com distribuição cosmopolita, a transmissão ocorre atualmente em toda a faixa tropical, com zonas de maior risco de transmissão na Ásia e América do Sul (Figura 1.3 A) (Bhatt et al, 2013). Segundo as estimativas mais recentes (OMS, 2013; Bhatt et al, 2013), a dengue causa quase 100 milhões de infecções sintomáticas por ano (Figura 1.3 B). Além da expansão das regiões afetadas e do número de casos, um aumento significativo nos casos de dengue grave vem sendo observado. Cerca de 500 mil pessoas, principalmente crianças, são hospitalizadas com dengue grave anualmente, com uma taxa de mortalidade que chega a 2,5% (OMS, 2013).

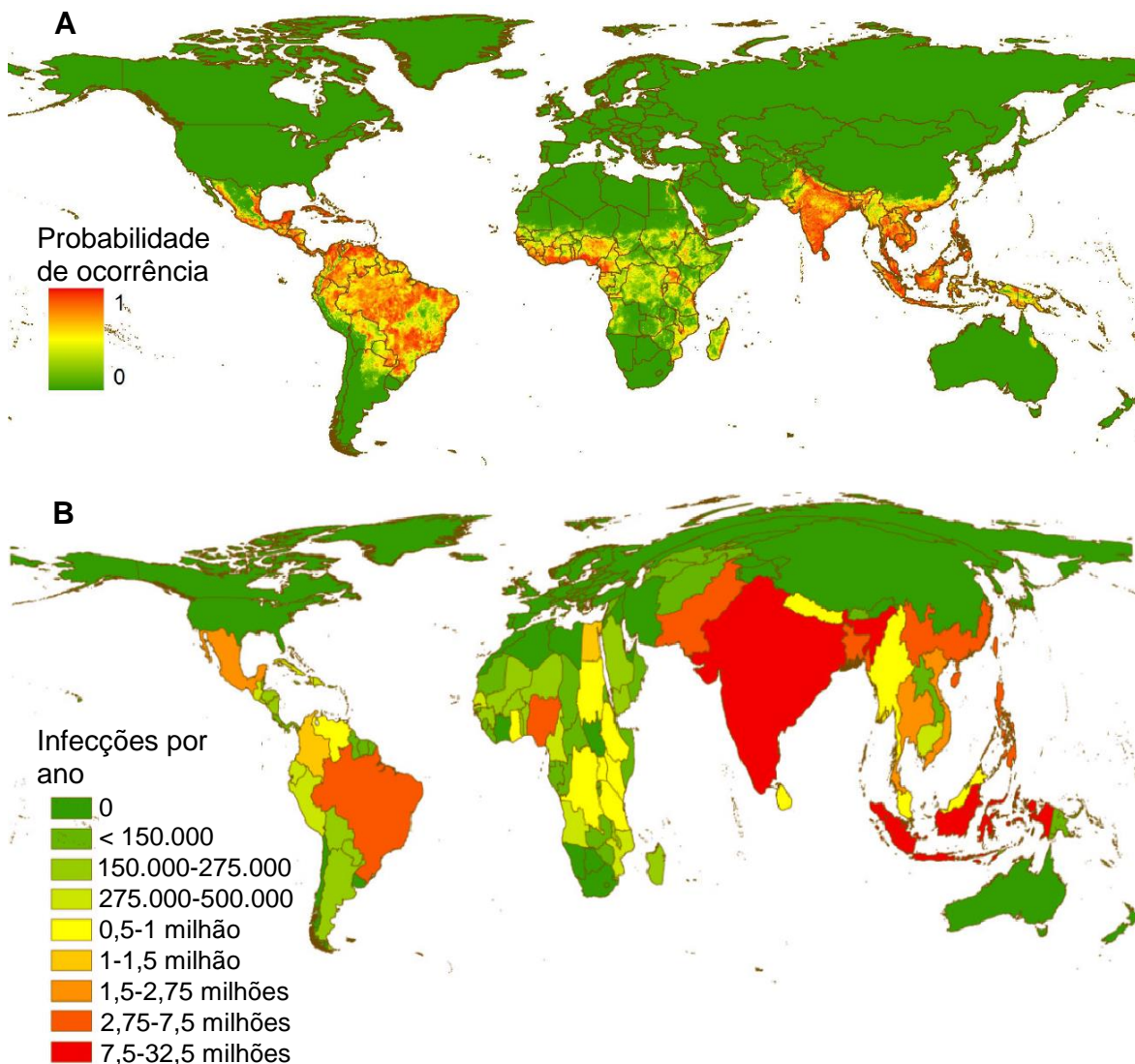


Figura 1.3: População sob risco de transmissão da dengue e áreas com atividade epidêmica. O painel A mostra a probabilidade da ocorrência de dengue, áreas com alta probabilidade são mostradas em vermelho e áreas com baixa probabilidade em verde. O painel B mostra o mapa de número de infecções por ano por área nacional (Bhatt et al, 2013).

O principal vetor no ambiente urbano é o mosquito *Ae. aegypti*, mas outras espécies do gênero como o *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis* também podem transmitir a dengue principalmente em ciclos rurais e silvestres (Gubler, 1998). Até a década de 1950, a transmissão urbana da dengue era remota. O ciclo de transmissão urbano se intensificou com o deslocamento de tropas durante a Segunda Grande Guerra, que possibilitou a dispersão do vetor e do vírus pelo sudeste Asiático (Halstead, 1988; Gubler, 1998; Ooi e

Gubler, 2008). O crescimento populacional e a urbanização desordenada que seguiram o pós-guerra, associados à ineficiência dos programas de saúde pública em controlar o vetor, possibilitaram o estabelecimento da transmissão endêmica/ epidêmica na região (Monath, 1994; Gubler e Clark, 1995; Gubler, 2002; Mackenzie et al, 2004; Ooi e Gubler, 2008).

No continente Americano a expansão da dengue foi mais recente devido às ações do Programa de Controle da Febre Amarela promovido pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS). Tais ações erradicaram o *Ae. aegypti* da maior parte do continente nas décadas de 1950 e 1960. No entanto, a interrupção do programa na década de 70, associada ao surgimento de cepas do mosquito resistentes aos inseticidas, levou à reinfestação do continente e, posteriormente, à reintrodução do DENV (Gubler e Clark, 1995; Halstead, 2006). Em uma estimativa recente (Bhatt et al, 2013), cerca de 13 milhões de infecções anuais foram atribuídas ao continente Americano, com quase a metade dos casos (5 milhões de infecções) ocorridos no Brasil (Figura 1.3 B).

Um estudo de Teixeira e colaboradores (2013) apresenta uma revisão e análise epidemiológica dos casos notificados de dengue no Brasil durante a última década (2000 a 2010). Segundo este estudo, ocorreram cerca de 8,4 milhões de casos de dengue durante o período analisado, sendo os maiores números de casos notificados nos anos de 2002, 2008 e 2010, com cerca de 700 mil casos em 2002 e 2008 e mais de 1 milhão de casos em 2010 (valores acima do 75 percentil da década). Foram registrados cerca de 2.700 casos de FHD com 150 óbitos em 2002, cerca de 3.800 casos de FHD com 485 óbitos em 2008, e cerca de 3.600 casos de FHD com 700 óbitos em 2010 (MS/SVS/SINAN, 2013).

No ano de 2011, semelhante às grandes epidemias da década anterior, observaram-se altas prevalências e altas taxas de mortalidade. Segundo o Ministério da Saúde, foram notificados, em 2011, 689.277 casos de dengue e 2.936 casos de FHD. Neste mesmo ano 520 óbitos por dengue foram registrados (MS/SVS/SINAN, 2013). As epidemias dos anos de 2012 e 2013 foram associadas à reintrodução do DENV-4 e à redução dos números de casos graves e de óbitos por dengue. Foram notificados ao Ministério da Saúde 1.006 casos de FHD em 2012 e 432 em 2013, com 317 e 67 óbitos, respectivamente (OPAS, 2013; MS/SVS/SINAN, 2013). Apesar da baixa prevalência e mortalidade da dengue nos dois últimos anos, a situação no Brasil ainda é preocupante. Com a co-circulação dos quatro sorotipos no país e a imunização natural da população mediante infecções seguidas pelos

diferentes sorotipos, uma tendência à infecção de pessoas cada vez mais jovens e com manifestações clínicas cada vez mais graves tem sido observada (Teixeira et al, 2013).

1.4 Patogenia

Ainda não se sabe exatamente como alguns pacientes com dengue desenvolvem doença branda enquanto outros evoluem para formas mais graves. Diferentes hipóteses têm sido propostas para a patogênese da dengue incluindo fatores associados ao vírus, fatores associados ao hospedeiro, e fatores epidemiológicos. Estas hipóteses são provenientes de estudos epidemiológicos em regiões endêmicas e de experimentos *in vitro*, no entanto, a ausência de modelos animais que reproduzam as diferentes apresentações clínicas da dengue dificulta o estudo dos mecanismos patogênicos. Primatas são hospedeiros naturais do DENV, mas modelos primatas como macacos rhesus e *Aotus* geralmente apresentam baixos títulos de viremia e não mostram sinais da doença (Gubler, 1998). Modelos murinos que reproduzem sinais clínicos da dengue incluem a infecção com DENV P23085, vírus humano adaptado a replicação em camundongos a partir de infecções intracerebrais seriadas em camundongos de diferentes idades (Souza et al, 2009; Assunção-Miranda et al, 2010); a infecção de camundongos humanizados (irradiados e reconstituídos com células hematopoiéticas humanas) (Bente e Rico-Hesse, 2006; Sridharan et al, 2013), entre outros (revisto recentemente por Guabiraba e Ryffel, 2014; e Zellweger e Shresta, 2014). O desenvolvimento destes modelos representa um importante avanço nas pesquisas sobre a patogênese da dengue.

Observações clínico-epidemiológicas do Sudeste Asiático na década de 1960 e de Cuba na década de 1980 suportam a hipótese de que infecções secundárias (pacientes experimentando a segunda infecção pelo DENV) estejam associadas à evolução para a FHD. Em ambas as epidemias, uma proporção elevada de casos de FHD foi observada em pacientes com infecção secundária pelo DENV-2. Os casos de FHD em infecções primárias predominavam entre crianças menores de um ano de idade nascidas de mães imunes para o DENV-1, e que apresentavam anticorpos maternos circulantes (Halstead et al, 1969; Halstead et al, 1970; Halstead, 1988; Kouri et al, 1989). Dessas observações formulou-se a hipótese de que a amplificação da infecção dependente de anticorpos (ADE) poderia dirigir a evolução para FHD durante as infecções secundárias. De acordo com esta hipótese,

células B de memória específicas para o sorotipo da infecção anterior produzem anticorpos de baixa capacidade neutralizante contra o sorotipo infectante. Estes anticorpos contribuiriam para a patogênese da dengue grave ao promover a entrada do DENV em células que expressam receptor para Fc γ (Fc γ R). Esse processo aumentaria o risco de desenvolvimento da FHD em virtude do aumento da infecção de células mononucleares e, conseqüentemente, da viremia (Halstead, 1988; Kliks et al, 1989; Vaughn, 2000; Halstead, 2003).

Estudos *in vitro* confirmam que concentrações subneutralizantes de soros imunes de pacientes com dengue ou de anticorpos contra a proteína E promovem o aumento da infecção de monócitos pelo DENV (Halstead, 1981; Gonçalvez et al, 2007). Outros estudos mostram que a infecção de monócitos, macrófagos ou de células dendríticas via ADE promove não só a amplificação da replicação viral, mas também aumenta a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (Anderson et al, 1997; Chareonsirisuthigul, 2007; Boonnak et al, 2008; Puerta Guardo et al, 2013). O tratamento de células endoteliais em cultura com o sobrenadante de células infectadas via ADE promove alterações de permeabilidade e expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, sendo as citocinas IL-6, IL12 e TNF- α intermediários chave desse processo (Anderson et al, 1997; Puerta Gardo et al, 2013). Estes estudos sugerem que a relação entre ADE e a susceptibilidade das infecções secundárias a quadros clínicos mais graves não se explica simplesmente pelo aumento dos títulos de viremia, mas principalmente pelas alterações da resposta inflamatória do hospedeiro.

Em contrapartida à resposta humoral heterotípica de baixa afinidade responsável pela ADE, a resposta celular T de memória ativada durante a infecção secundária também pode estar envolvida na patogênese da FHD. Durante uma infecção secundária, as células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória da infecção anterior tendem a responder mais rapidamente que as células *naive*, o que impede o sistema imune de elaborar respostas mais eficazes contra o sorotipo infectante (Alexander-Miller et al, 1996). A incapacidade de controlar o processo infeccioso resulta em um aumento de subpopulação linfocitária produtora de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ , e que evoluem para apoptose maciça. Também foi demonstrada, nessa situação, menor capacidade de liberação de grânulos citotóxicos,

resultando em menor capacidade de lise das células infectadas (Mongkolsapaya et al, 2003, 2006; Myint et al, 2006). Essa reação foi denominada “pecado original antigênico”.

A ativação massiva de linfócitos B e T de memória, assim como de monócitos, macrófagos e células dendríticas, resulta na secreção de citocinas e mediadores inflamatórios que atuam em diversos tecidos do hospedeiro, inclusive o endotélio vascular, modulando sua função e contribuindo para o aumento da permeabilidade e extravasamento de plasma (Pang et al, 2007). Estudos realizados com crianças e adultos infectados com diferentes sorotipos do DENV demonstraram o aumento significativo de citocinas e mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TNF- α e IFN- γ no plasma de pacientes com dengue grave (Raghupathy et al, 1998; Chen et al, 2006; Bozza et al, 2008; Jaiyen et al, 2009; van de Weg et al, 2013).

Apesar de dados epidemiológicos suportarem a infecção secundária como fator de risco para o desenvolvimento das formas graves da dengue, casos de SCD e até mesmo casos fatais de dengue têm sido descritos também em infecções primárias (Barnes & Rosen, 1974; de Araújo et al, 2009a). Na epidemia causada pelo DENV-3 no Rio de Janeiro em 2002, por exemplo, 52,2% dos casos fatais foram causados por infecções primárias (de Araújo et al, 2009a). Desse modo, somente a ADE e o pecado original antigênico não explicam todos os casos que evoluem para as formas graves da doença.

A partir da década de 1980, o advento das técnicas de biologia molecular possibilitou maior conhecimento sobre a circulação dos diferentes sorotipos e genótipos do DENV e suas associações com a gravidade da dengue (Rico-Hesse et al, 1997). Estes estudos identificaram que o genótipo de DENV-2 oriundo do sudeste asiático (DENV-2 SA) está associado a epidemias graves, como a de Cuba em 1981 e do Brasil em 2008 (Rico-Hesse et al, 1997; Teixeira et al, 2009), enquanto o genótipo americano do DENV-2 (DENV-2 AM) é caracterizado como o agente de epidemias que ocorrem sem registro de casos graves, como no Peru em 1995 (Leitmeyer et al, 1999, Cologna et al, 2005; Rico-Hesse, 2007). A maior virulência do DENV-2 SA em relação ao DENV-2 AM foi atribuída a diferenças nas sequências da proteína E e nas regiões não codificantes 5' e 3' do genoma viral (Leitmeyer et al, 1999; Pryor et al, 2001).

A hipótese que associa a gravidade da dengue à virulência do DENV infectante, e as que a associam às características imunológicas do hospedeiro não são excludentes. O isolamento viral de 4.846 amostras de pacientes acometidos com dengue em Bangcoc entre 1973 e 1999 aponta o DENV-3 como o principal responsável pela FHD em infecções primárias (49% dos casos), enquanto DENV-2 predominou nos casos de FHD em infecções secundárias (40% dos casos) (Nisalak et al, 2003). No que diz respeito aos genótipos do DENV-2, Halstead (2009) propõe que em infecções secundárias de pacientes imunes para o DENV-1, os anticorpos heterotípicos seriam capazes de amplificar a infecção do DENV-2 SA, mas não do DENV-2 AM, uma vez que este último apresentaria epítomos da proteína E semelhantes aos do DENV-1. Estes dados sugerem que a evolução para a dengue grave estaria associada tanto a fatores virais quanto a fatores imunológicos do hospedeiro.

Além da resposta de linfócitos B e T, outros fatores imunogenéticos do hospedeiro têm sido amplamente associados com a gravidade da dengue. A região do genoma humano de maior interesse é o cromossoma 6, que codifica as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) – ou sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA). Em populações de Cuba e do México, a presença do alelo HLA-DR4 confere proteção contra formas graves de dengue (LaFleur et al, 2002; Sierra et al, 2007). No Brasil o alelo HLA-DQ1 foi associado com a susceptibilidade à doença causada pelo DENV-1 (Polizel et al, 2004) e o alelo HLA-A*01 com a susceptibilidade à FHD (Monteiro et al, 2012). Outros polimorfismos genéticos associados com a susceptibilidade às formas graves da dengue incluem polimorfismos de base única (SNP) no gene para Fc γ R2, IL-1 β e IL-1RA, e nas regiões promotoras dos genes para DC-SIGN (CD209), TNF- α , CLEC-5 e IL-10 (Chiewsilp et al, 1981; Alagarasu et al, 2013a; Fernandez-Mestre et al, 2004; Sakuntabhai et al, 2005; Loke et al, 2002; Perez et al, 2010; Xavier-Carvalho et al, 2013). De modo importante, os polimorfismos nos promotores de TNF- α e CLEC-5 foram independentemente associados aos níveis de TNF α circulantes (Fernandez-Mestre et al, 2004; Xavier-Carvalho et al, 2013), o polimorfismo no promotor de DC-SIGN à trombocitopenia (Alagarasu et al, 2013b), e os polimorfismos nos genes para IL-1 β e IL-1RA à evolução para SCD (Sa-Ngasang et al, 2014).

Apesar das hipóteses descritas acima explorarem diferentes causas para dengue branda ou grave, é consensual entre elas que a patogênese da dengue é imunomediada, com perfis de citocinas distintos associados a diferentes prognósticos. Nesse contexto, citocinas de resposta anti-viral e citotóxica como IFN do tipo I e II, IL-12, IL-18 e MIP-1 β estariam associadas com bom prognóstico e cura clínica, enquanto um balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias determinaria as alterações endoteliais responsáveis pelos sinais clínicos de permeabilidade aumentada nos pacientes com dengue clássica, ou pelo choque nos casos de dengue grave (Bozza et al, 2008; Fagundes et al, 2011; Kumar et al, 2012; van de Weg et al 2013). A Tabela 1.1 apresenta sumariamente as principais citocinas alteradas durante a dengue e suas relações com a gravidade e com aspectos clínicos e laboratoriais da doença.

Tabela 1.1: Principais citocinas alteradas na infecção pelo DENV e suas relações com aspectos clínicos e laboratoriais.

Citocina	Relação com a gravidade	Associações com dados clínicos e laboratoriais	Referências
IL-1 β	Controle < SCD; Dengue clássica < Dengue grave; FD < FHD; FD > FHD.	Associada a ativação da fibrinólise; Associada com plaquetopenia (<50.000/mm ³), hemoconcentração e hipotensão; Associada a apoptose de PBMC.	Suharti et al, 2002 Bozza et al, 2008 Jaiyen et al, 2009 Kumar et al 2012
IL-1RA	Controle < SCD; Controle < Dengue; Dengue clássica < dengue com sinais de alarme.	Associada a ativação da coagulação; Correlação positiva com TGO/AST.	Suharti et al, 2002 Becquart et al, 2010 Rathakrishnan et al, 2012
sIL2R	Controle < Dengue; Controle < Dengue clássica e grave.	Associado com sangramento grave e óbito.	Becquart et al, 2010 van de Weg et al, 2013
IL-4	Controle < (dengue clássica < dengue grave); Controle > Dengue; FD > FHD.	Correlação negativa com TGO/AST.	Bozza et al, 2008 Rathakrishnan et al, 2012 Kumar et al, 2012
IL-6	FD e FHD < SCD; Controle < (FD < FHD); Controle < (dengue clássica < dengue grave); FD < FHD; Controle < (FD < FHD); Dengue clássica < Dengue grave.	Associada a incidência de ascite; Associada a ativação da coagulação/ fibrinólise; Associada com evolução para óbito; Associada com hemoconcentração; Infecção primária < infecção secundária; DENV-4 > DENV-2 ou DENV-3; Associada com os desfechos de choque, manifestações hemorrágicas, e óbito.	Juffrie et al, 2001 Suharti et al., 2002 Chen et al, 2006 Bozza et al, 2008 Priyadarshini et al, 2010 Levy et al, 2010 van de Weg et al, 2013
IL-8	FD e FHD < SCD; Controle < (FD < FHD); Controle < Dengue clássica > Sinais de alarme; Dengue clássica < Dengue grave.	Associado com evolução para o óbito; Associada com plaquetopenia; Associada com plaquetopenia; Associada com manifestações hemorrágicas.	Raghupathy et al, 1998 Bozza et al, 2008 Priyadarshini et al, 2010 Rathakrishnan et al, 2012 van de Weg et al, 2013
IL-10	Controle < Dengue; FD < FHD; FD < FHD; Controle < Dengue grave; Dengue clássica < Dengue grave.	Associada com trombocitopenia; Associada com evolução para óbito; Associada a leucopenia e linfocitopenia, correlação positiva com linfócitos apoptóticos.	Azeredo et al, 2001 Chen et al, 2006 Brasier et al, 2012 van de Weg et al, 2013 Malavige et al, 2012 e 2013
IL-12	Controle < Dengue; Controle > Dengue; Controle > Dengue com sinais de alarme.	Correlação positiva com a contagem de plaquetas.	Becquart et al, 2010 Rathakrishnan et al, 2012 Van de Weg et al, 2013

Tabela 1.1: Continuação

Citocina	Relação com a gravidade	Associações com dados clínicos e laboratoriais	Referências
IFN- α	Controle < Dengue; Controle < Dengue; Controle < Dengue clássica > Dengue grave;	Infecção primária > secundária; Correlação positiva com DC plasmacitóide TRAIL ⁺ ; Associada com leucopenia e com linfocitopenia.	Tang et al, 2010 Becquart et al, 2010 Gandini et al, 2013 Malavige et al, 2013 van de Weg et al, 2013
	Controle < Dengue clássica e grave.		
IFN- γ	Controle < FD e FHD; Controle < (dengue clássica < grave); FD > FHD; FD > FHD;	Associado com sobrevivência na FHD; Correlação positiva com TGP/ALT;	Chen et al, 2006 Bozza et al, 2008 Priyadarshini et al, 2010 Kumar et al, 2012 Rathakrishnan et al, 2012 Malavige et al, 2013
	Dengue clássica < dengue grave.	Infecção primária > secundária; Infecção primária > secundária.	Kumar et al, 2012
IP-10	FD > FHD; Controle < Dengue; Controle < Dengue clássica e grave.	Correlação positiva com TGP e linfócitos reativos.	Rathakrishnan et al, 2012 van de Weg et al, 2013
	Controle < (dengue clássica > dengue grave); Controle < (dengue clássica > com sinais de alarme); Controle < (dengue clássica > com sinais de alarme e dengue grave); Controle > dengue.	Associada com linfócitos NK (CD56 ⁺); Associada com linfócitos citotóxicos.	Bozza et al, 2008 Rathakrishnan et al, 2012 de-Oliveira-Pinto et al, 2012a van de Weg et al, 2013
MCP-1	Controle < (FD < FHD); Controle < Dengue; Controle < Dengue; Controle < (Dengue clássica > com sinais de alarme e grave); Controle e dengue clássica > sinais de alarme.	Associada a plaquetopenia; Associada com linfócitos citotóxicos.	Lee et al, 2006 Bozza et al, 2008 Rathakrishnan et al, 2012 de-Oliveira-Pinto et al, 2012a Van de Weg et al, 2013
	Controle < Dengue; Controle < SCD; FD < FHD; Controle < FD e FHD.	Associado a manifestações hemorrágicas; Associada a ativação da fibrinólise; Associada a apoptose de PBMC; FHD grau II > FHD grau I.	Azeredo et al, 2001 Suharti et al, 2002 Jaiyen et al, 2009 Levy et al, 2010
TNF- α	Controle < (FD < FHD); Controle < FHD; Controle < FHD;	Associado a evolução para o óbito;	Chen et al, 2006 Assunção-Miranda et al, 2010 Yeh et al, 2013
	Dengue clássica < Dengue grave; Controle < (Dengue clássica < Dengue grave).	Associado a resposta anti-coagulante (sTM e aPCR); Associado com aumento de permeabilidade endotelial.	Malavige et al, 2013 Lopes et al, (não publicado)

1.4.1 Mecanismos de plaquetopenia na dengue

A plaquetopenia é uma das principais alterações hematológicas no curso da infecção pelo DENV. As maiores prevalências de plaquetopenia e as contagens mais baixas de plaquetas são observadas nas formas mais graves da dengue. As contagens de plaquetas se correlacionam tanto com as alterações de permeabilidade e instabilidade hemodinâmica quanto com a recuperação clínica ou mortalidade dos pacientes (Chua et al, 1993; Krishnamurti et al, 2001; Chen et al, 2007; Mourão et al, 2007). Associações entre a plaquetopenia e a gravidade das manifestações hemorrágicas, no entanto, geralmente não são observadas (Krishnamurti et al, 2001; Wills et al, 2002). A etiologia da plaquetopenia associada a dengue ainda não é clara, mas diferentes fatores parecem estar envolvidos incluindo desde a supressão hematopoiética até o consumo/ destruição periférica das plaquetas (revisto em Hottz et al, 2011 – ANEXO D). A Figura 1.4 sumariza os principais mecanismos de plaquetopenia durante a infecção pelo DENV.

A depressão medular é um mecanismo primário de citopenias durante a dengue. A presença do RNA viral em amostras de medula de pacientes (de Araujo et al, 2009b) sugere que o DENV pode infectar células hematopoiéticas. Modelos de infecção de progenitores hematopoiéticos *in vitro* demonstram a redução da capacidade proliferativa dessas células com inibição da hematopoiese de diversas linhagens, inclusive da linhagem megacariocítica (Nakao et al, 1989; Murgue et al, 1997; Basu et al, 2008). A inibição da diferenciação em megacariócitos parece estar associada com infecção dos progenitores e indução das vias de apoptose em megacariócitos imaturos (Basu et al, 2008). Outro mecanismo seria a infecção das células estromais medulares levando a alteração do perfil de citocinas no microambiente medular, que não mais suportaria a hematopoiese (La Russa e Innis, 1995; Rothwell et al, 1996). Recentemente, Sridharan e colaboradores (2013) desenvolveram um modelo de camundongo humanizado que apresenta plaquetas e megacariócitos humanos, a infecção deste animal com o DENV causou trombocitopenia transiente que foi associada à redução de megacariócitos e precursores megacariocíticos humanos na medula (Sridharan et al, 2013). Estudos recentes com primatas não humanos demonstram que os megacariócitos são os principais alvos do DENV na medula óssea (Noisakran, 2012; Clark, 2012), mas o impacto da infecção de megacariócitos maduros sobre a geração de plaquetas, quantitativa ou qualitativamente, permanece desconhecido.

Supressão medular	Infecção de progenitores hematopoiéticos	
	<p>CD34⁺ MK</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Capacidade proliferativa alterada; - Inibição da diferenciação; - Apoptose de megacariócitos imaturos; - Redução da megacariopoiese.
Supressão medular	Infecção de células estromais	
	<p>ARC CD34⁺</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mudança do perfil de citocinas; - Incapacidade de sustentar células formadoras de colônias; - Redução da megacariopoiese.
Aumento da destruição periférica de plaquetas	Anticorpos anti-plaquetas	
	<p>Platelets</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Imunoglobulinas associadas a plaquetas; - Lise de plaquetas mediada por complemento; - Fagocitose de plaquetas via receptor para Fc; - Retenção de plaquetas no sistema reticulendotelial.
	Interações plaqueta-endotélio e plaqueta-leucócito	
	<p>Activated platelets EC</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação do endotélio; - Agregação de plaquetas no endotélio ativado/ infectado; - Ativação plaquetária; - Formação de agregados plaqueta-leucócito; - Interações plaqueta-monócito e plaqueta-neutrófilo.
	Ação direta do DENV	
	<p>Activated platelets</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação de plaquetas pelo DENV; - Presença de componentes virais em plaquetas; - Infecção de plaquetas pelo DENV (?).
Fatores solúveis		
<p>Citocinas</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Níveis elevados de citocinas; - Desbalanço dos fatores de coagulação/ fibrinólise; - Mediadores lipídicos (Fator ativador de plaquetas (PAF) entre outros). 	

Figura 1.4: Mecanismos de plaquetopenia na infecção pelo DENV (adaptado de Hottz et al, 2011) (ANEXO I). MK, megacariócitos; ARC, célula reticular adventícia; EC, célula endotelial.

Outra linha de evidências propõe que a destruição de plaquetas na circulação periférica cause a plaquetopenia nos pacientes com dengue. A participação de anticorpos contra as proteínas virais E e NS1 com reatividade cruzada para integrinas da superfície de plaquetas têm sido amplamente investigada (Lin et al, 2006). Estes anticorpos intermediariam a lise de plaquetas induzida por complemento (Lin et al, 2001; Sun et al, 2007) ou a fagocitose das plaquetas opsonizadas via ligação ao Fc γ R nos macrófagos (Saito et al, 2004; Honda et al, 2009). Os altos níveis de imunoglobulinas associadas a plaquetas em pacientes com dengue correlacionam negativamente com as contagens de plaquetas dos mesmos, e plaquetas isoladas destes pacientes são fagocitadas por macrófagos *in vitro* (Saito et al, 2004; Honda et al, 2009). No entanto, o bloqueio competitivo dos Fc γ R pela administração de imunoglobulina endovenosa falha em recuperar as contagens de plaquetas de pacientes com dengue (Dimaano et al, 2007), sugerindo que a fagocitose de plaquetas via Fc γ R não é o principal mecanismo de plaquetopenia. Além disso, os níveis de anticorpos contra proteínas virais se mantêm altos durante a fase de recuperação, enquanto as contagens de plaquetas voltam aos níveis de referência.

Alonzo e colaboradores (2012) demonstraram que o reconhecimento da fosfatidilserina em plaquetas é o principal fator associado à fagocitose de plaquetas de pacientes com dengue por macrófagos. Este estudo mostra características indicativas de apoptose em plaquetas de pacientes com dengue, incluindo a exposição de fosfatidilserina e ativação de caspase-3. A apoptose, um processo de morte celular programada originalmente descrito em células nucleadas, foi recentemente demonstrada em plaquetas (Leytin et al, 2006; Mason et al, 2007). A ativação da cascata de caspases apoptóticas pela via intrínseca, ou seja, envolvendo disfunção mitocondrial, é descrita em plaquetas ativadas por agonistas (Verhoeven et al, 2005; Leytin et al, 2006; Lopez, 2008; Leytin et al, 2009) ou que envelhecem na circulação ou estocagem (Verhoeven et al, 2005; Mason et al, 2007). As vias envolvidas na ativação da apoptose em plaquetas de pacientes com dengue, no entanto, ainda não foram identificadas. Além disso, o impacto do reconhecimento e fagocitose das plaquetas apoptóticas, como demonstrado por Alonzo e colaboradores (2012), sobre a imunomodulação das células fagocíticas em pacientes com dengue é também desconhecido.

Outros mecanismos de plaquetopenia envolvem a ativação das plaquetas na circulação e a formação de agregados homotípicos ou heterotípicos, incluindo agregação

com leucócitos e/ou sobre o endotélio ativado, facilitando assim a deposição de plaquetas na microvasculatura periférica. Plaquetas isoladas de pacientes com dengue ou plaquetas expostas ao DENV *in vitro* apresentam alterações morfológicas sugestivas de ativação (Ghosh et al, 2008; Noisakran et al, 2009). Plaquetas expostas ao DENV *in vitro* também apresentam aumento na expressão de P-selectina e ligação do fibriogênio (Ghosh et al, 2008). Além disso, níveis aumentados de agregados plaqueta-monócito circulantes também têm sido observados em pacientes com dengue (Tsai et al, 2011). Os possíveis mecanismos envolvidos na ativação plaquetária durante a dengue incluem a adesão de plaquetas sobre células endoteliais infectadas (Krishnamurti et al, 2002); intensa produção de fatores como trombina e fator ativador de plaquetas (PAF) (Krishnamurti et al, 2001; Yang et al, 1995); e/ou uma ação direta do DENV sobre plaquetas (Ghosh et al, 2008). Estes dados são indicativos de ativação plaquetária durante a dengue, mas os mecanismos responsáveis por este processo e suas consequências clínicas permanecem pouco explorados.

1.4.2 Plaquetas como efetores imunes e inflamatórios e seu potencial impacto na patogênese da dengue

Plaquetas são células classicamente conhecidas por suas atividades especializadas e essenciais às respostas hemostáticas. Muito pelo fato de plaquetas não possuírem núcleo, as atividades identificadas em plaquetas foram, por muito tempo, restritas a função pró-coagulante, com respostas rápidas envolvendo agregação e secreção de fatores estocados em grânulos. No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado um novo repertório de atividades biológicas em plaquetas, muitas das quais estão relacionadas à resposta imune e inflamatória (Sample et al, 2011; Vieira-deAbreu et al, 2012). Apesar de não possuírem núcleo, as plaquetas possuem estoques de moléculas de RNA e diversos mecanismos de controle pós-transcricional, sendo capazes de ativar vias especializadas de síntese proteica para alterar seu proteoma, fenótipo e funções (Denis et al, 2005). Além disso, plaquetas podem sustentar respostas por horas após o estímulo inicial de ativação, inclusive interações com células endoteliais e leucócitos intermediando respostas destas células (Kaplanski et al, 1993; Weyrich et al, 1996; Nishimura et al, 2012). Apesar do avanço recente no conhecimento sobre a biologia das plaquetas, pouco se sabe a respeito da participação das plaquetas na ativação imune e amplificação inflamatória durante a dengue.

Plaquetas estimuladas respondem rapidamente com a secreção de proteínas estocadas em grânulos. As plaquetas possuem dois tipos principais de grânulos secretórios: os grânulos α e os grânulos densos (Flaumenhaft, 2013; White et al, 2013). Os grânulos α são as organelas mais abundantes em plaquetas, as proteínas estocadas nestes grânulos incluem reguladores da coagulação e fibrinólise (Fator V, Fator VIII, PAI-1), citocinas/quimiocinas (MIF, FGF- β , TGF- β , VEGF, CXCL4/PF4, CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CXCL8/IL-8) e moléculas de adesão (P-selectina, fibrinogênio, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, fibronectina). A P-selectina (CD62P) é tanto secretada quanto exposta na membrana da plaqueta ativada (Blair et al, 2009; Vieira-de-Areu et al, 2012; Flaumenhaft, 2013; Strüßmann et al, 2013). Os grânulos densos são menos abundantes e estocam moléculas como ADP, ATP e serotonina (Flaumenhaft, 2013). De modo interessante, fatores estocados em grânulos α plaquetários e secretados mediante estímulo como RANTES, PF4, TGF- β , MIP-1 α , VEGF e PDGF estão frequentemente aumentados no plasma de pacientes com dengue e, em alguns estudos, correlacionam com as contagens de plaquetas (Srichaikul e Nimmannitya, 2000; Tsenq et al, 2005; Rathakrishnan et al, 2012; Malavige et al, 2012; Kumar et al, 2012; de-Oliveira-Pinto et al, 2012a; Furuta et al, 2012). Considerando que plaquetas são fontes importantes desses mediadores, a secreção de citocinas e quimiocinas por plaquetas ativadas durante a dengue pode ser um mecanismo patogênico importante.

Além dos fatores pré-formados estocados em grânulos, plaquetas estocam moléculas de RNA contendo *introns* que, em resposta ao sinal de ativação, são processadas em RNAm permitindo a síntese de proteínas como o TF e a IL-1 β (Denis et al, 2005; Schwertz et al, 2006; Shashkin et al, 2008; Weyrich et al, 2009). A síntese *de novo* de TF e IL-1 β por plaquetas foi recentemente descrita como um mecanismo importante de inflamação e coagulopatia na sepse bacteriana e na malária grave (Rondina et al, 2011; Brown and McIntyre 2011; Aggrey et al, 2013). Não é sabido, contudo, se a infecção pelo DENV ativa o processamento pós-transcricional e síntese de proteínas em plaquetas. A citocina IL-1 β , em especial, é uma importante citocina pró-inflamatória na dengue, estando seus níveis associados com aumento de permeabilidade endotelial e hemostasia descompensada (ver Tabela 1.1). No entanto, a contribuição das plaquetas para os níveis desta citocina em pacientes com dengue não foi ainda investigada.

Enquanto a síntese de IL-1 β por plaquetas tem sido amplamente demonstrada, os mecanismos envolvidos em seu processamento e secreção por plaquetas permanecem elusivos. Diferente da maioria das citocinas, a IL-1 β é sintetizada como um precursor de 31 kD cuja secreção e atividade biológica dependem da clivagem proteolítica por complexos multimoleculares denominados inflamassomas. Os inflamassomas são compostos por um receptor de reconhecimento de padrão (PRR) citoplasmático, uma proteína adaptadora conhecida como proteína do tipo *speck* associada a apoptose contendo domínio de recrutamento de caspase (ASC) quando necessária, e sua unidade proteolítica a caspase-1 (Schroder e Tschopp, 2010; Davis et al, 2011). O inflamassoma mais amplamente caracterizado é composto pelo receptor do tipo NOD (NLR) contendo domínio pirina 3 (NLRP3), a molécula adaptadora ASC, e caspase-1 ativada (Davis et al, 2011). O inflamassoma NLRP3 responde a uma série de estímulos que incluem componentes virais ou bacterianos (Lamkanfi et al, 2011), ATP, asbesto, cristais de urato (Martinon et al, 2006) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais (Zhou et al, 2011). Recentemente, a montagem do inflamassoma NLRP3 induzida pelo DENV foi demonstrada em macrófagos infectados *in vitro* (Wu et al, 2012). Apesar de plaquetas serem reconhecidas fontes de IL-1 β , os componentes do inflamassoma e a montagem de inflamassomas funcionais não foram ainda identificados em plaquetas.

Brown e McIntyre (2011) mostraram que plaquetas estimuladas com LPS secretam a IL-1 β via micropartículas (MPs). MPs são corpos membranares de tamanho pequeno (entre 0,1 e 1,0 μ m) que são secretados por células durante ativação ou morte celular (Burnier et al, 2012). Plaquetas constituem a principal fonte de MPs na circulação fornecendo cerca de 80% das MPs circulantes (Horstman et al, 1999). As MPs carregam e entregam receptores transmembrana, enzimas e RNA para células alvo via fusão de membranas (Mause et al, 2010; Rautou et al, 2011; Laffont et al, 2013; Ismail et al, 2013); e citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento via interação com receptores de superfície (Mause et al, 2005; Wang et al, 2011; Brown and McIntyre, 2011). Dessa forma, MPs plaquetárias atuam como mediadoras da comunicação plaqueta-célula, e alterações de sua quantidade e conteúdo estão associadas com uma série de eventos fisiopatológicos envolvendo coagulação e inflamação em quadros de sepse, malária e artrite reumatoide (Boilard et al, 2010; Campos et al, 2010; Franks et al, 2013).

A ativação plaquetária também suporta a adesão de plaquetas a leucócitos. Onlamoon e colaboradores (2010) demonstraram altos níveis de agregados plaqueta-monócito e plaqueta-neutrófilo em um modelo de FHD em primatas. A agregação plaqueta-monócito também foi demonstrada na FD em humanos (Tsai et al, 2011). Durante essas interações, a ligação da P-selectina na superfície das plaquetas ativadas ao ligante 1 da glicoproteína P-selecina (PSGL-1) sobre os leucócitos não apenas mantém as células aderidas, mas também sinaliza para vias de expressão gênica induzindo respostas funcionais nos leucócitos (Larsen et al, 1989; Weyrich et al, 1996). A adesão de plaquetas ativadas a monócitos sinaliza para a síntese de uma série de citocinas, geralmente pró-inflamatórias, entre elas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e MCP-1 (Dixon et al, 2006; Weyrich et al, 2005; Weyrich et al, 1996). Como discutido anteriormente (Tabela 1.1) estas citocinas são efetores importantes da patogênese da dengue com altos níveis observados em pacientes com dengue grave (Bozza et al, 2008; Jaiyen et al, 2009; Priyadarshini et al, 2010; van de Weg et al, 2013), no entanto, a modulação de sua secreção pela formação de agregados plaqueta-monócito durante a dengue não foi ainda investigada.

1.5 Hipótese e justificativa

É crescente, portanto, o conhecimento sobre a participação das plaquetas nas respostas imune e inflamatória. Nossa hipótese é de que a ativação e a apoptose de plaquetas durante a infecção pelo DENV possam contribuir não apenas para a trombocitopenia ao promover o consumo e retirada de plaquetas da circulação, mas também para outros mecanismos patogênicos ao modular respostas imunes e inflamatórias mediante secreção de citocinas e interação com leucócitos. As plaquetas constituem a população celular mais afetada quantitativamente durante a dengue. As contagens de plaquetas se correlacionam tanto com as alterações de permeabilidade e instabilidade hemodinâmica nos pacientes com dengue grave quanto com o risco de evolução para o óbito. A compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação plaquetária durante a infecção pelo DENV é, portanto, de grande importância para o entendimento da patogenia da dengue, visando a identificação de novos alvos terapêuticos e o melhor manejo clínico dos casos graves.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar a participação das plaquetas na patogenia da dengue a partir da identificação de mecanismos moleculares de ativação e morte plaquetária associados à resposta inflamatória, induzidos direta ou indiretamente pelo DENV.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ativação plaquetária em pacientes com dengue e em plaquetas expostas ao DENV *in vitro*;
- Identificar mediadores inflamatórios secretados por plaquetas na infecção pelo DENV via degranulação (VEGF, RANTES, outros) ou síntese (IL-1 β);
- Investigar a presença dos componentes do inflamassoma em plaquetas e sua ativação na infecção pelo DENV;
- Investigar a resposta mitocondrial em plaquetas durante a infecção pelo DENV e sua participação nos processos de sinalização intracelular e ativação de vias de morte;
- Estudar os mecanismos de interação de plaquetas ativadas e apoptóticas com monócitos e sua participação na imunomodulação dos monócitos.
- Investigar a relação da ativação plaquetária, secreção de citocinas e morte celular com apresentações clínicas associadas à gravidade da dengue;

3 Material e Métodos

3.1 Pacientes e voluntários saudáveis

Amostras de sangue periférico foram obtidas de 84 pacientes com dengue assistidos no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC) – FIOCRUZ durante as epidemias ocorridas de 2011 a 2013. As características dos pacientes incluídos são apresentadas na Tabela 3.1. Em uma primeira etapa do estudo, 39 pacientes foram seguidos prospectivamente com amostras obtidas em três fases da infecção: fase febril (n = 26, coleta realizada em média no dia $3,8 \pm 1,6$ após o início dos sintomas), fase de defervescência (n = 26, dia $6,3 \pm 2,4$ após o início dos sintomas) e fase de convalescência (n = 13, dia $25,3 \pm 12,9$ após o início dos sintomas). Para os demais pacientes apenas uma coleta foi realizada na fase febril ou de defervescência.

O diagnóstico foi confirmado sorologicamente a partir da detecção de IgM e IgG contra a proteína viral E (E-Den01M and E-Den01G; PanBio) e/ou do antígeno viral NS1 (BioRad); ou molecularmente a partir da detecção do RNA viral. O sorotipo do DENV infectante foi determinado usando RT-PCR (Lanciotti et al, 1992; Johnson et al, 2005). Os sorotipos predominantes foram DENV-1 em 2011 e o DENV-4 em 2012 e 2013. O RNA para o DENV-2 foi observado em apenas dois casos incluídos em 2011. Infecções primárias ou secundárias foram distinguidas a partir da razão entre anticorpos IgM:IgG como previamente descrito (Kuno et al, 1991; Shu et al, 2003; Falconar et al, 2006). Na epidemia de 2011, causada pelo DENV-1, 61% dos casos foram infecções secundárias; enquanto nas epidemias de 2012 e 2013, causadas pelo recém-introduzido DENV-4, o percentual de infecções secundárias foi de 89% e 96%, respectivamente. Os casos foram classificados quanto à gravidade de acordo com o manual da OMS (2009), e a coorte foi composta por pacientes com dengue branda (56%), dengue branda com sinais de alarme (39%) ou dengue grave (5%).

Amostras de sangue periférico também foram obtidas de 46 voluntários saudáveis cuja idade e sexo foram pareados com os pacientes. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC (#016/2010) (ANEXO VI) e os experimentos executados de acordo com este protocolo. O consentimento para a participação no estudo foi obtido de todos os pacientes e voluntários saudáveis antes de qualquer procedimento associado ao estudo.

Tabela 3.1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com dengue:

	Controle (n = 46)	Dengue branda (n = 47)	Dengue com sinais de alarme ¹ (n = 33)	Dengue grave ² (n = 4)
Idade, anos	28 (27-32)	37 (28-46)	35 (29-42)	28 (20-38,5)
Gênero, Masculino	20 (43 %)	29 (61 %)	26 (79 %)	2 (50 %)
Plaquetometria, x1.000 /mm ³	241 (215-262) [#]	121 (86,7-156,5)*	115 (75-164)*	40 (24,5-78,2)* ^{&}
Hematócrito, %	39,4 (36-41,3) [#]	42,7 (40-44,8)	42,6 (40,2-45,9)	42,3 (39,2-45,1)
Albumina, g/dL	3,8 (3,4-4,0) [#]	3,7 (3,4-3,9)	3,6 (3,3-3,9)	2,9 (2,9-3,4) ^{&}
TGO/AST, U/L	19 (15,8-22,2) [#]	50 (29,2-84,2)	54 (37,5-106,5)*	145 (97-172)* ^{&}
TGP/ALT, U/L	28 (20,8-36,4) [#]	72 (44-102)*	62 (50,5-120,5)*	104 (76,8-144,8)
Manifestações hemorrágicas ³	–	12 (25,5 %)	17 (51,5 %)	4 (100 %)
Hidratação venosa	–	7 (15 %)	21 (63,3 %)	4 (100 %)
Infecção secundária	–	35 (74,5 %)	27 (81,8 %)	3 (75,00 %)
PCR positivo	–	22 (46,8 %)	17 (51,5 %)	2 (50 %)
DENV-1	–	11 (50 %)	10 (58,8 %)	2 (100 %)
DENV-2	–	2 (9,1 %)	–	–
DENV-4	–	9 (40,9 %)	7 (41,2 %)	–

Dados apresentados como mediana (interquartis – IQ 25-75%) ou número (percentual - %);

¹Dor abdominal, vômito persistente, hipotensão postural, oligúria, sangramento de mucosa, ou aumento do hematócrito concorrente com declínio rápido da contagem de plaquetas;

²Extravasamento de plasma grave, acúmulo de líquido em cavidade – ascite (evidenciado por ultrassonografia abdominal) e/ou sangramento grave;

³Sangramento de gengiva, metrorragia, hematêmese, hematuria, petéquias e exantema;

[#] Mediana (IQ 25-75%) de dez voluntários saudáveis representativos.

*p < 0,05 em comparação ao grupo controle;

[&] p < 0,05 em comparação a dengue branda;

Foi previamente demonstrado (Wang et al, 2010 e 2013) que a hipertermia *per se* pode induzir ativação e apoptose em plaquetas. Para controlar esta variável, nós incluímos um grupo controle de 13 pacientes com outras doenças febris não dengue (DFND). O critério de inclusão para este grupo foi apresentar febre e ter sorologia/ PCR negativo para dengue. As características e etiologias dos pacientes com DFND são listadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Características dos pacientes com DFND:

	DFND (n = 13)
Idade, anos	38,46±11,84
Gênero, Masculino	8 (61,54%)
Plaquetometria, x 1.000/mm ³	264,0±108,3
Etiologia:	
Infecção viral	4 (30,77%)
Infecção bacteriana	2 (15,38%)
Esporotricose	1 (7,69%)
Aspergilose	1 (7,69%)
Malária, <i>Plasmodium vivax</i>	1 (7,69%)
Malária, <i>P. falciparum</i>	1 (7,69%)
Reação medicamentosa	1 (7,69%)
Desconhecida	2 (15,38%)

Dados apresentados como media ± desvio padrão, ou número (%);

3.2 Isolamento de plaquetas

As plaquetas foram isoladas usando o método de Hamburger e McEver (1999). Dezesete mL de sangue foram colhidos a partir de punção venosa usando um escalpe de 21G em uma seringa contendo 3 mL de ACD (8 g/L de ácido cítrico, 22,4 g/L de citrato de sódio e 2 g/L de dextrose; pH 5,1). O sangue foi centrifugado a 200 x g por 20 min a temperatura ambiente para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi coletado e centrifugado a 500 x g por 20 min na presença de 100 nM de prostaglandina E₁ (PGE₁ Cayman Chemical 13010.1). O sobrenadante foi descartado, as plaquetas ressuspensas em 25 mL de PSG (5 mM de PIPES, 145 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 50 μM

de Na₂HPO₄, 1 mM de MgCl₂·6H₂O, 5,5 mM de glicose; pH 6,8) contendo 100 nM de PGE₁ e centrifugadas a 500 x g por 20 min a temperatura ambiente. As plaquetas foram ressuspensas em meio 199 (M199 com EBSS, L-Glutamina e HEPES; Lonza 12-117F).

O protocolo descrito acima foi utilizado predominantemente para obtenção de plaquetas a serem analisadas por citometria de fluxo. Para análises que exigem uma maior pureza das amostras, como *Western Blot* e dosagens de citocinas, uma etapa de depleção de células CD45⁺ (leucócitos) foi adicionada (Kit para depleção de CD45 humano; StemCell, Easy Sep Technology). Após a centrifugação do PRP (segunda etapa de centrifugação descrita acima) as plaquetas foram ressuspensas em 2,5 mL de PBS contendo 2 mM de EDTA, 0,5% albumina de soro humano (HSA) e 100 nM de PGE₁, incubadas com anticorpos tetraméricos anti-CD45 (1:200) por 10 min, e com esferas magnéticas cobertas com dextran (1:100) por mais 15 min. As células CD45⁺ foram depletadas da suspensão a partir da exposição a um campo magnético por 10 min. As plaquetas recuperadas foram ressuspensas em 25 mL de PSG contendo 100 nM de PGE₁ e centrifugadas a 500 x g por 20 min a temperatura ambiente. As plaquetas foram ressuspensas em M199. A pureza da preparação de plaquetas (> 99% CD41⁺) foi confirmada por citometria de fluxo.

3.3 Isolamento de monócitos

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas do sangue total sem o PRP (camada inferior de células resultante da primeira centrifugação descrita acima) através da centrifugação em gradiente de Ficoll (GE Healthcare). Após lavagem em PBS as células mononucleares foram ressuspensas para 10⁸/mL em PBS contendo 1 mM de EDTA e 2% de soro fetal bovino, incubadas com anticorpos tetraméricos anti-CD14 (1:10) por 15 min e com esferas magnéticas cobertas com dextran (1:20) por mais 10 minutos. As células foram ressuspensas para um volume final de 2,5 mL e os monócitos (CD14⁺) selecionados a partir da exposição a um campo magnético por 10 min (Kit para seleção positiva de CD14 humano, StemCell, Easy Sep Technology). Os monócitos foram ressuspensos em 2,5 mL e a última etapa repetida duas vezes. A viabilidade (> 95% de células viáveis) foi avaliada pela marcação com azul de Trypan. A pureza das preparações (> 90% CD14⁺) foi confirmada por citometria de fluxo.

3.4 Produção e titulação do DENV-2

O DENV-2 16681 foi replicado em células de mosquito *Aedes albopictus* clone C6/36 adaptadas ao crescimento a 33° C e cultivadas em meio L-15 (Leibovitz) suplementado com triptose fosfato 0,3%, glutamina 0,02%, solução de aminoácidos não-essenciais MEM 1% e soro fetal bovino 5%. Depois de seis dias de propagação, o sobrenadante contendo o vírus foi separado por centrifugação a 1,000 x g por 5 min, coletado, e alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento do uso (Assunção-Miranda et al, 2010; Conceicao et al, 2010). Vírus inativados foram obtidos incubando-se o DENV-2 por 1 h a 56° C (Souza et al, 2009). O sobrenadante de células C6/36 não infectadas cultivadas nas mesmas condições que as células nas quais o vírus replicou (Mock) foi usado como controle nos experimentos realizados. O DENV-2 16681 foi gentilmente cedido por Halstead em 1996 e produzido em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Vírus – UFRJ.

Para obtenção do DENV separado dos fatores secretados pelas células C6/36 infectadas, a suspensão viral ou o Mock foram centrifugados em um filtro de centrifuga Centricon YM-100 de acordo com as especificações do fabricante (Merck Millipore). Após a filtração, a fração retida (DENV-2 concentrado) foi ressuspensa em M199 para um volume igual ao da preparação inicial.

O título viral foi verificado a partir de ensaio de plaque em células BHK (*baby hamster kidney*) como anteriormente descrito (Conceicao et al, 2010). As células BHK foram cultivadas em placas de 12 poços em a-MEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 U/mL de penicilina e streptomina a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por um dia ou até a confluência. O meio foi então removido e as células infectadas por 1 hora com 200 µL de suspensão viral diluída serialmente. As células foram mantidas em meio contendo 1% de carboximetilcelulose (Sigma Aldrich) por 5 dias a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após este período as células foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 20% para visualização dos plaques. A quantidade de partículas virais infectantes foi expressa por unidade formadora de plaque (PFU) por mL.

3.5 Ativação *in vitro* de plaquetas com agonistas ou com o DENV

Plaquetas isoladas de voluntários saudáveis foram incubadas com 0,1 ou 0,5 U/mL de trombina (Sigma T1063), 250 ng/mL de convulxina (Santa Cruz sc-202554) ou com o DENV-2 (multiplicidade de infecção – moi = 1 PFU por plaqueta) a 37°C pelos tempos indicados. Em experimentos selecionados as plaquetas foram pré-incubadas por 30 min com o inibidor Pan de caspases ZVAD-fmk (Biovision) (20 µg/mL), com o inibidor de caspase-1 YVAD-fmk (MBL International) (10 µM), com o inibidor de RIP-1 necrostatina-1 (Nec-1) (Calbiochem) (50 µg/mL), ou anticorpos neutralizantes anti-DC-SIGN (R&D Systems 120507), anti-integrina α_v , ou controle de isotipo (IgG) (25 µg/mL); ou por 1 hora com o antioxidante mitocondrial mitoTEMPO (Enzo Life Sciences) (500 µM) antes da infecção com o DENV-2.

3.6 Interação plaqueta-monócito *in vitro*

Para a interação entre plaquetas e monócitos de pacientes com dengue e voluntários saudáveis, plaquetas e monócitos de doadores heterólogos foram co-incubados por 12 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Cada ponto experimental continha 10⁵ monócitos e 10⁷ plaquetas em um volume de 100 µL de M199 contendo 10µg/mL de polimixina B (Sigma-Aldrich). Plaquetas na ausência de monócitos e monócitos na ausência de plaquetas foram incubados nas mesmas condições como controles. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 10 min a 500 x g, fixadas por 10 min com paraformaldeído 4% e a formação de agregados plaqueta-monócito avaliada por citometria de fluxo como descrito a seguir (seção 3.7.2). Os sobrenadantes das plaquetas, dos monócitos e dos agregados plaqueta-monócito foram coletados e congelados a -20°C até o momento do uso.

Para as interações entre plaquetas estimuladas com agonistas e monócitos, plaquetas e monócitos autólogos foram co-incubados por 8 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Cada ponto experimental continha 5x10⁵ monócitos e 5x10⁷ plaquetas em um volume de 200 µL de M199 contendo 10µg/mL de polimixina B. As plaquetas foram estimuladas com 0,5 U/mL de trombina ou 0,5 U/mL de trombina mais 250 ng/mL de convulxina por 5 min e logo em seguida diluídas 1:5 e incubadas com os monócitos (a concentração final de trombina e/ou convulxina nos monócitos foi de 0,1 U/mL e 50

ng/mL, respectivamente). Em determinados experimentos as plaquetas foram pré-tratadas com anticorpos de bloqueio anti-Pselectina (R&D systems, BBA30) (10µg/mL), anti-fosfatidilserina (abcam, ab18005) (50 µg/mL) ou controle de isotipo (IgG de camundongo) por 30 min antes da incubação com os monócitos; ou os monócitos foram pré-tratados com 10 µg/mL de Citocalasina D mais 10 µg/mL de citocalasina B ou veículo (DMSO) por 30 min antes da incubação com as plaquetas.

3.7 Citometria de Fluxo

Plaquetas foram distinguidas pela marcação com anti-CD41 conjugado a fluoresceína isotiocinato (FITC) ou ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen) (1:20, 30 min) e pelos tamanho e complexidade característicos. Para a avaliação da expressão de P-selectina (CD62P) na superfície, plaquetas foram incubadas com anti-CD62P conjugado a FITC ou PE (BD Pharmingen) (1:20, 30 min); A expressão de DC-SIGN foi determinada incubando as plaquetas com anti-DC-SIGN conjugado a biotina (eBioscience, eBh209) (1.5 µg/mL, 20 min) seguido de incubação com streptavidina conjugada a PECy5 (0.2 µg/mL, 20 min); a ativação de caspase-1 ou caspase-9 foi acessada incubando as plaquetas com as sondas fluorescentes FAM-YVAD-FMK ou FAM-LEDH-FMK (inibidores de caspase conjugados a fluorocromos – FLICA), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (FLICA, Immunochemistry Technologies); e a exposição de fosfatidilserina foi determinada pela ligação de Anexina V conjugada a FITC de acordo com as instruções do fabricante (BD Pharmingen). Para marcações intracelulares, plaquetas marcadas com anti-CD41-FITC foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min, lavadas uma vez, e permeabilizadas com Triton 0,1% por 10 min. As plaquetas foram então incubadas por 30 minutos com anti-IL1 β ou anti-NLRP3 (5 mg/mL; Santa Cruz Biotechnology) seguidos de mais uma incubação de 30 min com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a sonda Alexa flúor 546. Controles de isotipo foram usados para controlar a ligação inespecífica dos anticorpos. 10.000 eventos por região foram adquiridos em citometro FACScalibur (BD Bioscience) após compensação apropriada das cores. Todas as aquisições foram analisadas com o programa CellQuest Pro (BD Bioscience).

3.7.1 Análise das micropartículas derivadas de plaquetas

A população de micropartículas foi determinada calibrando o citômetro com esferas de látex de tamanhos definidos (Polybead, Polyscience Inc. #07310). A região das micropartículas foi desenhada para conter esferas de tamanho igual ou menor a $0,989 \mu\text{m}$ (Figura 3.1 painel superior). A quantificação das micropartículas derivadas de plaquetas foi expressa em micropartículas CD41^+ por 100 plaquetas em cada amostra.

No intuito de isolar MPs de plaquetas expostas ao Mock ou ao DENV, nós testamos centrifugações em diferentes condições para obter a maioria das MPs nos sobrenadantes restando uma contaminação mínima por plaquetas. A centrifugação a $500 \times g$ por 10 min mostrou um resultado satisfatório (Figura 3.1 painel inferior).

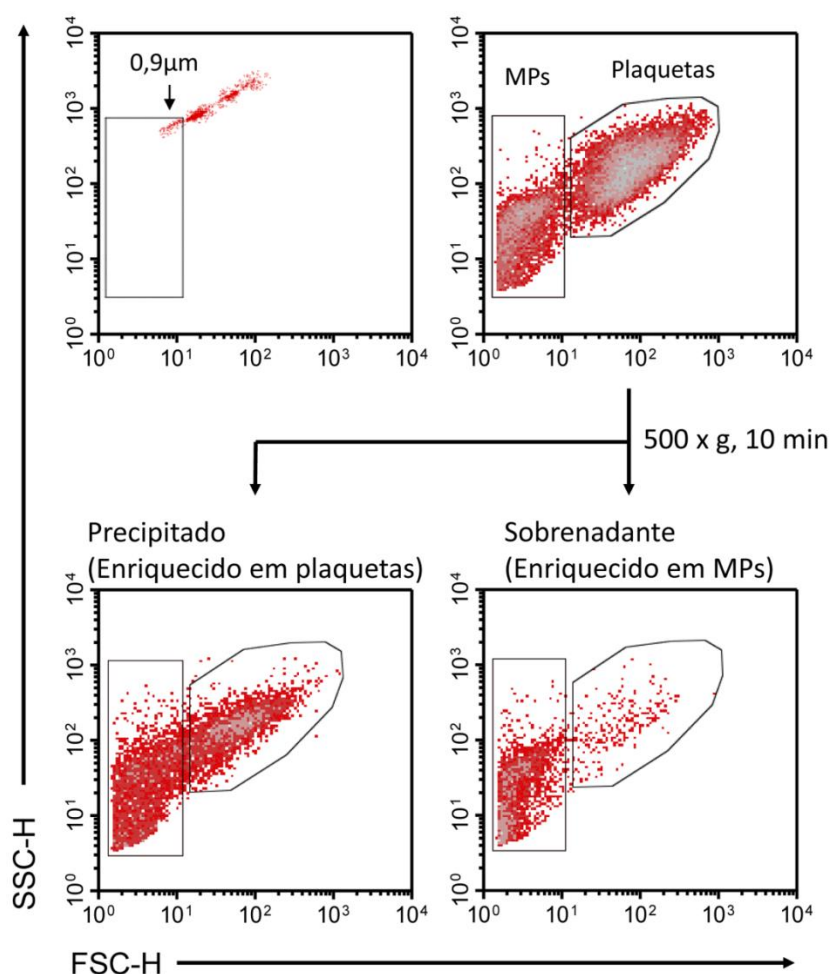


Figura 3.1: Identificação das MPs por citometria de Fluxo e método para isolamento das MPs. Topo: *Density plots* representativos das microesferas de latex (polybeads) (esquerda) e de plaquetas + MPs (direita). Abaixo: *Density plots* representativos do precipitado (plaquetas) e sobrenadante (MPs) recuperados após centrifugação a $500 \times g$ por 10 minutos.

3.7.2 Avaliação dos agregados plaqueta-monócito

Amostras de sangue total (2,5 mL) foram incubadas por 10 min com solução de lize para FACS (BD Bioscience) e centrifugadas a 500 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em tampão HT (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0,4 mM NaH₂PO₄, 5,5 mM glucose, 0,35% BSA; pH 7,4) e incubadas por 20 min a temperatura ambiente com anti-CD41 conjugado a PE (1:10) (BD Pharmingen), anti-CD14 conjugado a FITC (1:10) (BD Pharmingen) e anti-CD86 conjugado a PECy5 (BD Pharmingen) (1:10) ou anti-CD80 conjugado a PECy5 (1:200) (eBioscience). Após a incubação, 250 µL da solução de lize para FACS foram adicionados pra fixar as amostras. Controles de isotipo foram usados para controlar a ligação inespecífica dos anticorpos. Os monócitos foram distinguidos pela marcação com CD14 e pelo tamanho e granulosidade característicos. 5,000 eventos CD14⁺ foram adquiridos em um citometro FACScalibur (BD Bioscience) após compensação apropriada das cores.

3.7.3 Avaliação da Função mitocondrial

As plaquetas foram ressuspensas em 500 µL de tampão de Tyrode (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 11,9 mM NaHCO₃, 0,42 mM NaH₂PO₄, 4,7 mM glucose; pH 7,4) e a função mitocondrial avaliada por citometria de fluxo a partir da fluorescência de sondas específicas para a mitocôndria. O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi avaliado incubando as plaquetas (100 nM, 10 min) com a sonda tetrametilrodamina etil ester – TMRE (Fluka Analytical) ou tetrametilrodamina metil ester – TMRM (Invitrogen); e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) de origem mitocondrial foi determinada incubando as plaquetas (2,5 µM, 10 min) com a sonda MitoSOX Red (Invitrogen). Para controlar a especificidade das sondas para as mitocôndrias, as plaquetas de pacientes com dengue ou voluntários saudáveis foram tratadas com o ionóforo de prótons FCCP (0.5 µM) – que despolariza completamente as mitocôndrias – por 15 min a 37°C antes da adição das sondas. Para acessar a permeabilidade das membranas mitocondriais a prótons, plaquetas foram tratadas com o inibidor da F₁F₀-ATP-sintase Oligomicina (1 µg/ml) por 15 min a 37°C antes de avaliar o $\Delta\Psi_m$.

3.7.4 Ensaio de fagocitose de plaquetas

A fagocitose de plaquetas foi avaliada como anteriormente descrito (Aslam et al, 2007). As plaquetas foram marcadas por 1 hora a 37°C com 5 µM da sonda fluorescente Far Red DDAO-SE (Molecular Probes), lavadas três vezes por ressuspensão em PSG contendo 100 nM de PGE₁ e centrifugação a 500 x g por 20 min, e finalmente ressuspensas em M199. As plaquetas marcadas foram então estimuladas com trombina e/ou convulxina como descrito acima (seção 3.6 *Interação plaqueta-monócito in vitro*) e incubadas com os monócitos por 1 hora a 37°C para permitir que ocorra a fagocitose. A fluorescência das plaquetas extracelulares (não fagocitadas) foi coberta incubando as células por 20 min com azul de Trypan 0,1%. As células foram lavadas e a fluorescência intracelular analisada por citometria de fluxo. Monócitos incubados com plaquetas não marcadas, e monócitos incubados com plaquetas marcadas não cobertos com azul de Trypan foram usados para calibrar o citômetro. Monócitos pré-tratados com os inibidores da polimerização de actina Citocalasina D e citocalasina B foram usados como controle negativo da fagocitose de plaquetas.

3.8 Western blot

Plaquetas isoladas de pacientes com dengue ou voluntários saudáveis foram homogeneizadas em tampão de lize (0,15 M NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1% triton X-100) contendo coquetel de inibidores de protease (Roche). A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada com o kit de dosagem de proteínas BCA (Thermo scientific) e 40 a 60 µg de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com tampão Tris salina (TBS) suplementado com 0,1% Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite por 1 hora, e incubadas durante a noite com o anticorpo primário anti-caspase-9 humana produzido em camundongo, anti-caspase-3 humana produzido em coelho, ou anti-IL-1β humana produzido em coelho (1:1.000). Após remoção do anticorpo primário seguida de 5 lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou de coelho conjugado a peroxidase (1:10.000), lavadas novamente e expostas ao substrato quimioluminescente SuperSignal[®] West Dura (Thermo scientific). As membranas foram então descarregadas e marcadas novamente

incubando-se por 1 hora com anticorpo primário anti- β actina humana produzido em camundongo (1:40.000).

3.9 Microscopia de fluorescência confocal

Plaquetas (5×10^7) foram aderidas espontaneamente por 30 min em placas de permanox de 8 poços (Lab-Tek, Thermo Scientific), fixadas por 10 min com formalina 3%, lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas por 5 min com Triton X-100 0,1%. As placas foram bloqueadas por 30 min com PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) e incubadas a 4°C durante a noite com os anticorpos primários anti-NLRP3 humano produzido em cabra e anti-ASC humano produzido em coelho (Santa Cruz). Após retirada dos anticorpos primários as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com os anticorpos secundários anti-IgG de cabra conjugado a sonda Dylight 488 e anti-IgG de coelho conjugado a sonda Dylight 649 (1:1.000), e então lavadas extensivamente. Os anticorpos primários foram usados a 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS contendo 1% BSA. Placas preparadas na ausência dos anticorpos primários foram processadas paralelamente. As preparações foram montadas em Prolong Gold (Invitrogen) e analisadas em microscópio confocal Olympus FV101-O. O programa Olympus Fluoview FV1000 image acquisition software versão 5.0 foi utilizado para fotografar as lâminas.

3.10 Ensaio de permeabilidade endotelial em Transwell

Células endoteliais de microvasculatura de derme humana (HMEC-1) ($2,5 \times 10^5$) foram cultivadas até a confluência em meio MCDB131 (Sigma Aldrich) com 2% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen) sobre *transwell* de 6,5 mm de diâmetro e poros de 0,4 μm para placas de 24 poços (Costar, Corning Inc) cobertos com gelatina. Após 24 h, o meio de cultura foi substituído por micropartículas recuperadas de plaquetas expostas ao Mock ou ao DENV-2 e as células incubadas durante a noite a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . O meio de cultura foi substituído por albumina conjugada a FITC (100 μM em PBS) na câmara superior e PBS na câmara inferior. O conteúdo da câmara inferior foi recolhido após 15 min e a passagem de albumina através das monocamadas de HMEC-1 determinada pela fluorescência a 520 nm (excitação a 480 nm). Para caracterizar a contribuição da IL-1 β na permeabilidade induzida pelas MPs, nós incubamos as

monocamadas de HMEC-1 com as MPs na presença ou ausência do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) (10 µg/mL). As alterações na permeabilidade foram expressas como mudança percentual em relação à passagem de albumina em HMEC-1 não estimuladas (basal). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.11 Adesão de Monócitos a P-selectina e fosfatidilserina imobilizadas

Placas de 4 poços de 16 mm (Nunclon) foram incubadas com 300 µL de fosfatidilserina (100 µg/ml) dissolvida em etanol gelado por 18 horas a 4°C até a evaporação do etanol. As placas foram então incubadas durante a noite com 10 mg/mL de P-selectina humana recombinante (R&D systems) ou albumina de soro humano (HSA), e em seguida bloqueadas com 10 mg/mL de HSA por 4 horas a 25°C. As placas foram lavadas duas vezes com HBSS contendo 0,05% de Tween-20 e três vezes com HBSS. 10⁶ monócitos em 300 µL de M199 contendo 10 mg/mL de polimixina B foram adicionados às superfícies cobertas e mantidos por 8 horas a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e congelados a -20°C até o momento do uso. Os monócitos aderidos às superfícies foram fixados, corados com Giemsa e contados em microscópio de luz.

3.12 Dosagem de citocinas

As concentrações das citocinas no sobrenadante de plaquetas expostas o DENV-2 *in vitro* ou das interações de plaquetas com monócitos foram quantificadas a partir de um ensaio Multiplex para 27 citocinas (Bio-Plex Human Cytokine Assay; Bio-Rad) ou ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) (R&D systems) de acordo com as instruções dos fornecedores. Para o ensaio Multiplex, 50 µL das amostras foram incubadas com microesferas marcadas com sondas fluorescentes conjugadas a anticorpos específicos para cada citocina alvo. As microesferas foram lavadas e incubadas com anticorpos de detecção conjugados a biotina, e posteriormente com streptavidina conjugada a PE. As concentrações das citocinas foram determinadas usando uma leitora Luminex™ (Bio-Plex, Bio-Rad). As citocinas IL-8 e IL-10 foram dosadas por ELISA (Duo Set, R&D Systems) de acordo com as especificações do fabricante. Tais dosagens foram realizadas em placas de 96 poços com metade da área. Foram utilizados 50 µL de amostras não diluídas para a

quantificação de IL-10, enquanto para a dosagem de IL-8 as amostras foram diluídas 10 ou 20 vezes em M199.

3.13 Medida da atividade da citrato-sintase

Plaquetas isoladas de pacientes com dengue ou voluntários saudáveis foram homogeneizadas em tampão de lize (0,15 M NaCl, 10mM Tris pH 8,0, 1% triton X-100) contendo coquetel de inibidores de protease (Roche). 10 µg de extrato total de proteínas foram incubadas com acetil coenzima A (acetil CoA), oxaloacetato e DTNB. A citrato-sintase catalisa a reação entre acetil CoA e oxaloacetato resultando na formação de ácido cítrico e a coenzima A cotendo um grupo tiol. Na presença de DTNB, a coenzima A contendo o grupo tiol forma a Coenzima A conjugada com 2-nitro 5-tiobenzoato (CoA-TNB2) de cor amarela. A atividade da citrato-sintase foi medida a partir da detecção da CoA-TNB2 em espectrofotômetro (412 nm). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). As variáveis numéricas foram expressas como mediana e intervalo interquartil (IQ 25-75%) e os dados clínicos qualitativos como número e percentual (%) de indivíduos afetados. Todas as variáveis numéricas foram testadas para distribuição normal usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparações envolvendo mais de dois grupos a análise de variância (Oneway ANOVA) foi usada para determinar as diferenças e o pós-teste de Bonferroni foi aplicado para identificar a localização das diferenças entre os grupos. Para comparações entre dois grupos apenas, nós comparamos as variáveis contínuas usando o teste t de student (no caso de distribuição paramétrica) ou o teste U de Mann-Whitney (no caso de distribuição não-paramétrica). O teste t pareado foi utilizado para comparar plaquetas de um mesmo doador na presença ou ausência de estímulo. As correlações foram obtidas usando o teste de Pearson.

4 Resultados

4.1 Ativação plaquetária e infecção pelo DENV

No intuito de investigar a relação entre ativação plaquetária e infecção pelo DENV, nós avaliamos plaquetas isoladas de pacientes com dengue quanto a expressão de P-selectina (CD62P), uma glicoproteína dos grânulos α plaquetários que é translocada para a superfície das plaquetas durante o processo de degranulação (Vieira-de Abreu et al, 2012). A análise da expressão de P-selectina foi realizada em pacientes incluídos em três epidemias (2011-2013), bem como em plaquetas de voluntários saudáveis expostas ao DENV-2 *in vitro*. Os sorotipos de DENV circulantes em cada epidemia foram o DENV-1 e -2 em 2011; e o DENV-4 em 2012 e 2013.

Em uma primeira etapa deste estudo, os pacientes foram avaliados prospectivamente, com até três coletas realizadas em diferentes fases da doença: fase febril (n = 26), de defervescência (n = 26) e de convelescência (n = 13). Quando resultados obtidos destes pacientes foram incluídos em análises não-prospectivas (transversais/ corte) apenas a primeira coleta de cada paciente (realizada na fase febril ou de defervescência) foi analisada.

4.1.1 Ativação Plaquetária em pacientes com dengue

A expressão de P-selectina em plaquetas de pacientes com dengue foi avaliada de duas formas distintas: pelo percentual (%) de plaquetas expressando P-selectina; ou pela quantidade de P-selectina (intensidade média de fluorescência, IMF) expressa nas plaquetas. Esta abordagem nos permitiu avaliar não apenas a quantidade de plaquetas ativadas circulantes, mas também a intensidade da ativação.

A expressão de P-selectina em plaquetas foi significativamente maior ($p < 0,05$) em pacientes com dengue na fase febril ($53,1 \pm 16$ %; $49,6 \pm 22,8$ IMF) e de defervescência ($42,6 \pm 14,8$ %; $42,8 \pm 20,7$ IMF) em comparação com a fase de convelescência ($20,8 \pm 5,3$ %; $22,9 \pm 6,2$ IMF) ou com plaquetas isoladas de voluntários saudáveis ($14,5 \pm 4,2$ %; $16,8 \pm 4,3$ IMF) (Figura 4.1A). A expressão de P-selectina também foi maior em plaquetas de pacientes com dengue na fase febril em comparação aos pacientes com doenças febris não dengue (DFND) ($41,3 \pm 15,7$ %; $32,5 \pm 9,2$ IMF), apesar destes apresentarem um aumento na expressão de P-selectina em relação aos voluntários saudáveis (Figura 4.1A).

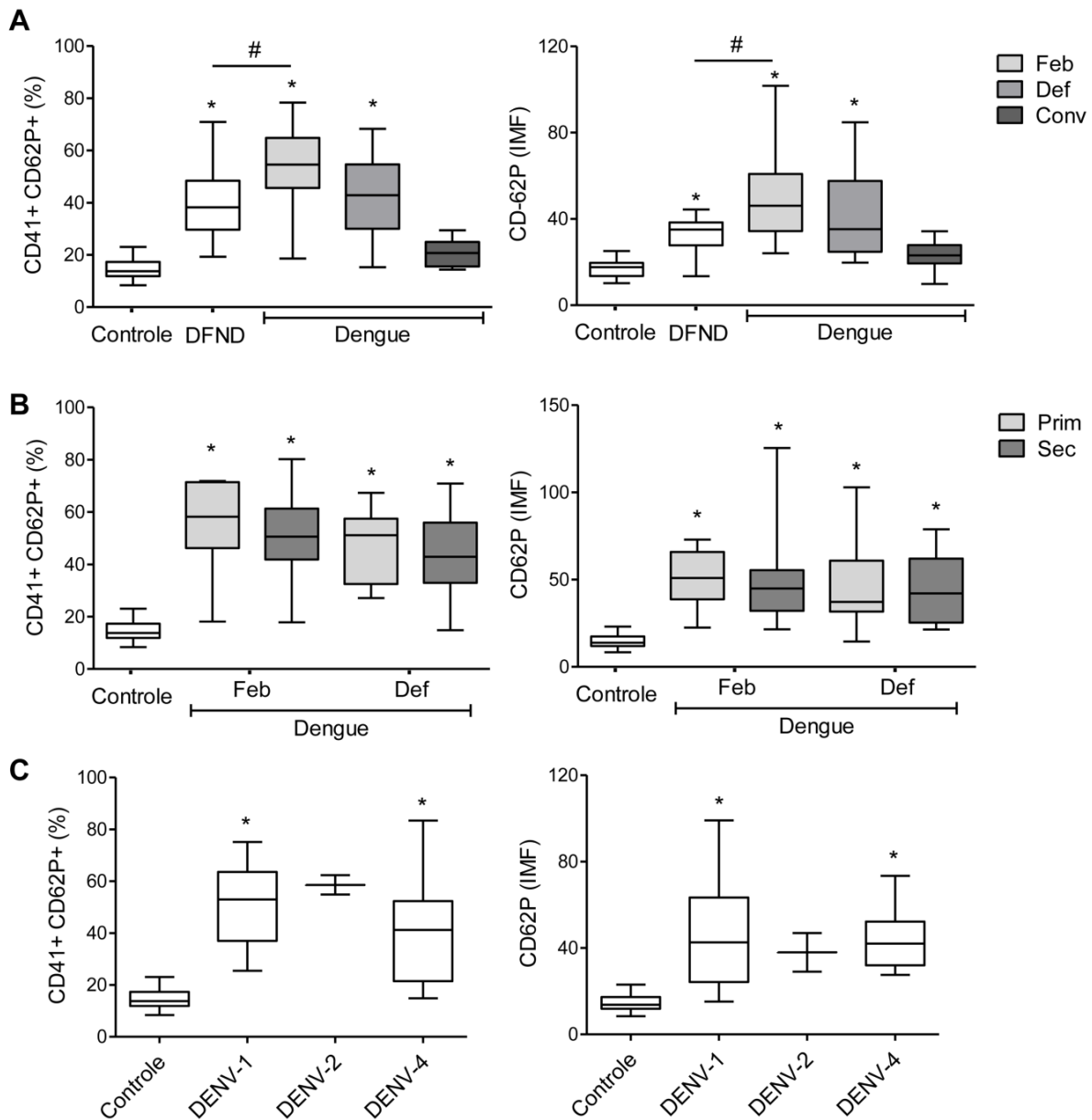


Figura 4.1: Ativação plaquetária em pacientes com dengue. O percentual (%) de plaquetas CD62-P⁺ e a intensidade média de fluorescência (IMF) para CD62-P em plaquetas de voluntários saudáveis (Controle, n = 14), pacientes com doenças febris não-dengue (DFND, n = 13) ou pacientes com dengue (Dengue, n = 77) (**A**) durante a fase febril (Feb) de defervescência (Def) ou de convalescência (Conv); (**B**) com infecção primária (Prim) ou secundária (Sec); ou (**C**) de acordo com o sorotipo do DENV infectante (DENV-1, -2 ou -4). Os gráficos mostram a mediana, interquartis e 5-95 percentis. * representa p<0,05 em relação ao grupo Controle ou Conv; # representa p<0,05 em relação ao grupo DFND.

Não foram observadas diferenças significativas na expressão de P-selectina em plaquetas de pacientes com infecção primária ou secundária, mesmo quando amostras da fase febril e de defervescência foram avaliadas separadamente (Figura 4.1B). Também não observamos diferenças significativas na expressão de P-selectina entre os pacientes infectados com diferentes sorotipos do DENV (DENV-1, -2 ou -4) (Figura 4.1C).

4.1.2 DENV-2 induz ativação plaquetária in vitro

Entre os possíveis fatores envolvidos na ativação plaquetária durante a dengue, nós investigamos se o DENV-2 poderia ativar diretamente plaquetas isoladas de voluntários saudáveis. As plaquetas foram incubadas com o DENV-2, DENV-2 inativado por aquecimento, ou mock. A exposição de plaquetas ao DENV-2, mas não ao mock ou ao DENV-2 inativado, aumentou significativamente a expressão de P-selectina após seis horas de incubação (DENV-2, $49,5 \pm 13,6$ versus $26,1 \pm 8,9$ ou $29,4 \pm 7,5$ IMF para DENV-2 inativado e mock, respectivamente) (Figura 4.2A e B). A cinética da ativação plaquetária induzida pelo DENV-2 foi diferente da ativação por trombina ($0,1 \mu\text{g/mL}$), sugerindo que a ativação plaquetária induzida por trombina ou pelo DENV exploram mecanismos distintos (Figura 4.2A).

A exposição de plaquetas ao DENV-2 recuperado após centrifugação em um filtro de centrífuga Centricon YM-100 (Merck Millipore) também induziu ativação plaquetária. Plaquetas isoladas de voluntários saudáveis foram expostas separadamente à fração filtrada (fatores solúveis em suspensão) ou à fração retida (vírus purificado) ressuspensa em meio 199. A exposição de plaquetas ao DENV-2 purificado aumentou significativamente a expressão de P-selectina em comparação com a fração filtrada ou com o Mock processado paralelamente (DENV-2 purificado, $49,6 \pm 12,5$ versus $23,6 \pm 14,5$ ou $32,6 \pm 13,7$ IMF para fração filtrada do DENV-2 ou fração retida do Mock, respectivamente) (Figura 4.2C).

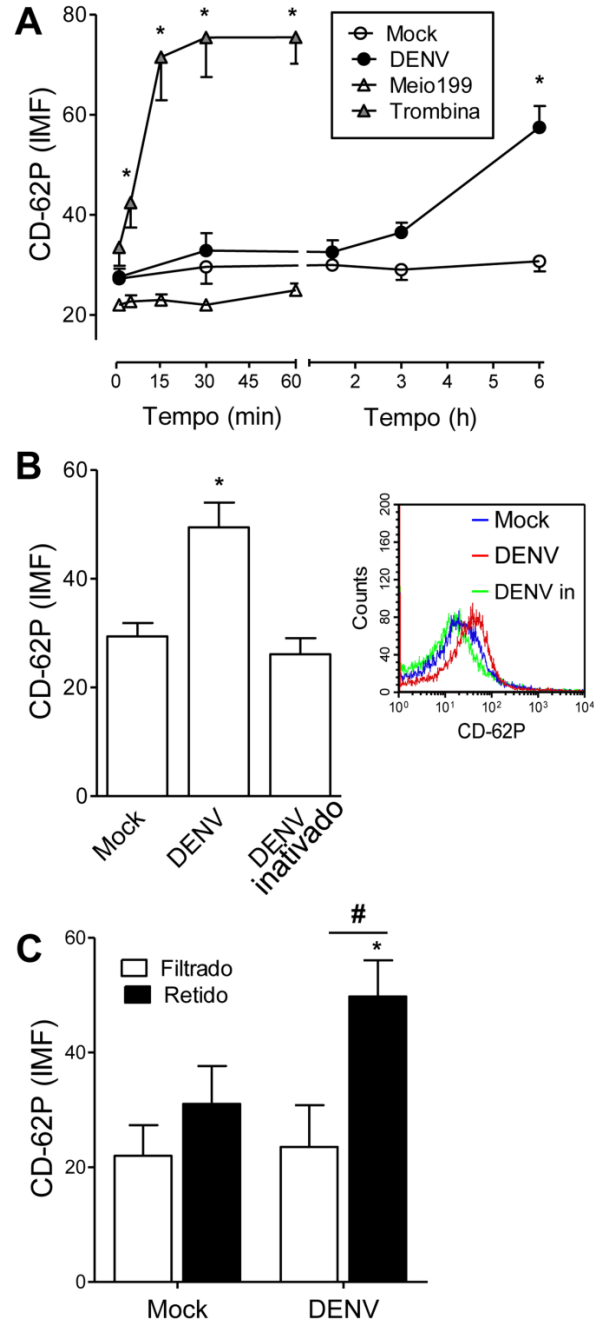


Figura 4.2: DENV-2 induz ativação plaquetária. (A) A intensidade média de fluorescência (IMF) para CD-62P em plaquetas ativadas com 0,1 U/mL de trombina ou expostas ao Mock ou DENV pelos tempos indicados. (B-C) A IMF para CD62P em plaquetas expostas (6h 37°C) ao Mock, DENV ou DENV inativado por aquecimento (DENV in) (B), ou à fração filtrada (filtrado) ou retida (retido) do DENV-2 recuperado após centrifugação em um filtro de centrifuga Centricon YM100 ou Mock processado em paralelo (C). Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 a 6 experimentos independentes com doadores distintos. * representa $p < 0,05$ em relação ao Mock ou meio199; # representa $p < 0,05$ entre as frações filtrada e retida (DENV-2 purificado).

4.1.3 A ativação plaquetária está associada com a gravidade da dengue

Plaquetopenia acentuada e sinais clínicos de extravasamento de plasma definem as formas graves da infecção pelo DENV. As contagens de plaquetas se correlacionam tanto com as alterações de permeabilidade e instabilidade hemodinâmica quanto com a recuperação clínica e mortalidade (Krishnamurti et al., 2001; Chen et al., 2007; Mourão et al 2007; Chua et al, 1993). No intuito de investigar a associação da ativação plaquetária com a gravidade da dengue, os pacientes foram agrupados de acordo com a classificação de casos proposta pela OMS (2009) ou de acordo com a apresentação de plaquetopenia, sinais clínicos de permeabilidade vascular aumentada, ou de manifestações hemorrágicas.

A expressão de P-selectina foi significativamente ($p < 0.05$) maior nas plaquetas de pacientes com dengue grave ($67,6 \pm 11,4$ %; $83,9 \pm 42,5$ IMF) quando comparada aos pacientes com dengue clássica ($40,1 \pm 15,3$ %; $40,2 \pm 17,8$ IMF). No que diz respeito à intensidade da expressão de P-selectina, pacientes com dengue grave ainda apresentaram maior ativação plaquetária quando comparados aos pacientes com dengue com sinais de alarme ($48,4 \pm 19,3$ IMF). Não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes com dengue clássica e os pacientes que apresentavam sinais de alarme (Figura 4.3A).

De acordo com a contagem de plaquetas obtida no mesmo dia em que a expressão de P-selectina foi avaliada, os pacientes foram agrupados em plaquetopênicos (< 150.000 plaquetas/ mm^3) ou não-plaquetopênicos. Baseado nesta classificação, 53% dos pacientes foram plaquetopênicos enquanto os demais 47% não apresentaram plaquetopenia no momento da análise da ativação plaquetária. A expressão de P-selectina foi maior nos pacientes plaquetopênicos em comparação com os não-plaquetopenicos ($53,2 \pm 15,3$ %; $59,1 \pm 29,1$ IMF *versus* $41,6 \pm 14,7$ %; $34,4 \pm 11,9$ IMF) (Figura 4.3B).

O aumento na permeabilidade vascular em pacientes com dengue foi evidenciado pela presença dos seguintes sinais: aumento superior a 20% no hematócrito, hipoalbuminemia ($< 3,6$ g/dL), hipotensão postural, ascite, e/ou oligúria; enquanto a presença de manifestações hemorrágicas foi caracterizada por: sangramento de gengiva, metrorragia, hematúria, hematêmese e/ou exantema. Tanto o percentual de plaquetas ativadas quanto a intensidade da ativação plaquetária foram maiores nos pacientes que apresentavam sinais de permeabilidade vascular aumentada em relação aos pacientes que não tiveram evidencia de alterações de barreira vascular (Figura 4.3C). No entanto, a

ocorrência de manifestações hemorrágicas se correlacionou apenas com o percentual de plaquetas ativadas (Figura 4.3C e D).

Além disso, a expressão de P-selectina em plaquetas de pacientes com dengue se correlacionou negativamente com as contagens de plaquetas e com a concentração sérica de albumina, e positivamente com os valores de hematócrito (Tabela 4.1). Juntos, estes dados sugerem que a ativação plaquetária pode contribuir não apenas para a plquetopenia associada à infecção pelo DENV, mas também para a amplificação da resposta inflamatória e alteração da função endotelial durante a infecção.

Tabela 4.1: Correlação entre ativação plaquetária e dados laboratoriais de pacientes com dengue.

	Expressão de P-selectina (%)	
	<i>R</i>	<i>p</i>
Plaquetometria ¹	-0,3303	0,0147
Albuminemia ²	-0,4149	0,0119
Hematócrito ¹	0,3475	0,0144

¹Correlação com a contagem de plaquetas ou valor de hematócrito obtidos no mesmo dia em que a expressão de P-selectina foi avaliada;

²Correlação da expressão de P-selectina com a mais baixa concentração de albumina apresentada por cada paciente.

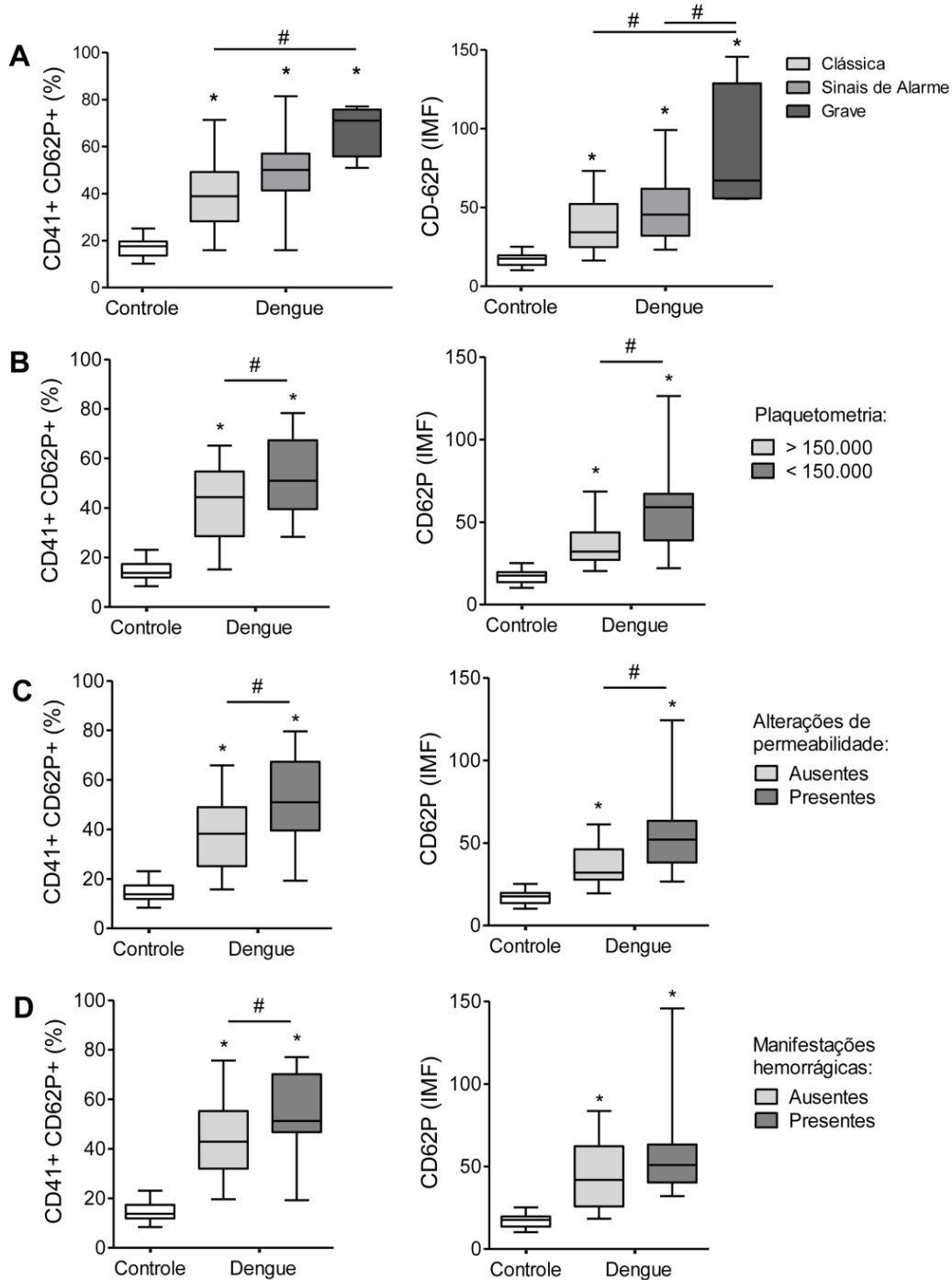


Figura 4.3: Ativação plaquetária em pacientes com dengue de acordo com a apresentação clínica. O percentual (%) de plaquetas CD62-P+ e a intensidade média de fluorescência (IMF) para CD62-P em plaquetas de voluntários saudáveis (Controle) ou pacientes com dengue (Dengue) classificados de acordo com a classificação de casos da OMS (A); ou com a presença ou ausência de plaquetopenia (B), alterações de permeabilidade vascular (C) ou manifestações hemorrágicas (D). Os gráficos mostram a mediana, interquartil e 5-95 percentis. * representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # representa $p < 0,05$ entre os grupos selecionados.

4.2 Ativação plaquetária e resposta inflamatória na dengue

Tendo em vista a associação da ativação plaquetária com as alterações de permeabilidade e a gravidade dos pacientes com dengue, nós investigamos se plaquetas ativadas durante a dengue contribuem para a ativação imune e amplificação da resposta inflamatória. Nós avaliamos plaquetas de pacientes infectados com o DENV-4 (epidemias de 2012 e 2013) quanto à habilidade de sintetizar, processar e secretar a citocina pró-inflamatória IL-1 β , e quanto à habilidade de interagir com monócitos modulando a resposta destas células. Os fatores secretados por plaquetas expostas ao DENV-2 *in vitro* também foram determinados. Além disso, nós investigamos os mecanismos moleculares envolvidos na secreção de mediadores inflamatórios e na interação plaqueta-monócito, bem como a relevância destes processos como possíveis mecanismos patogênicos na dengue.

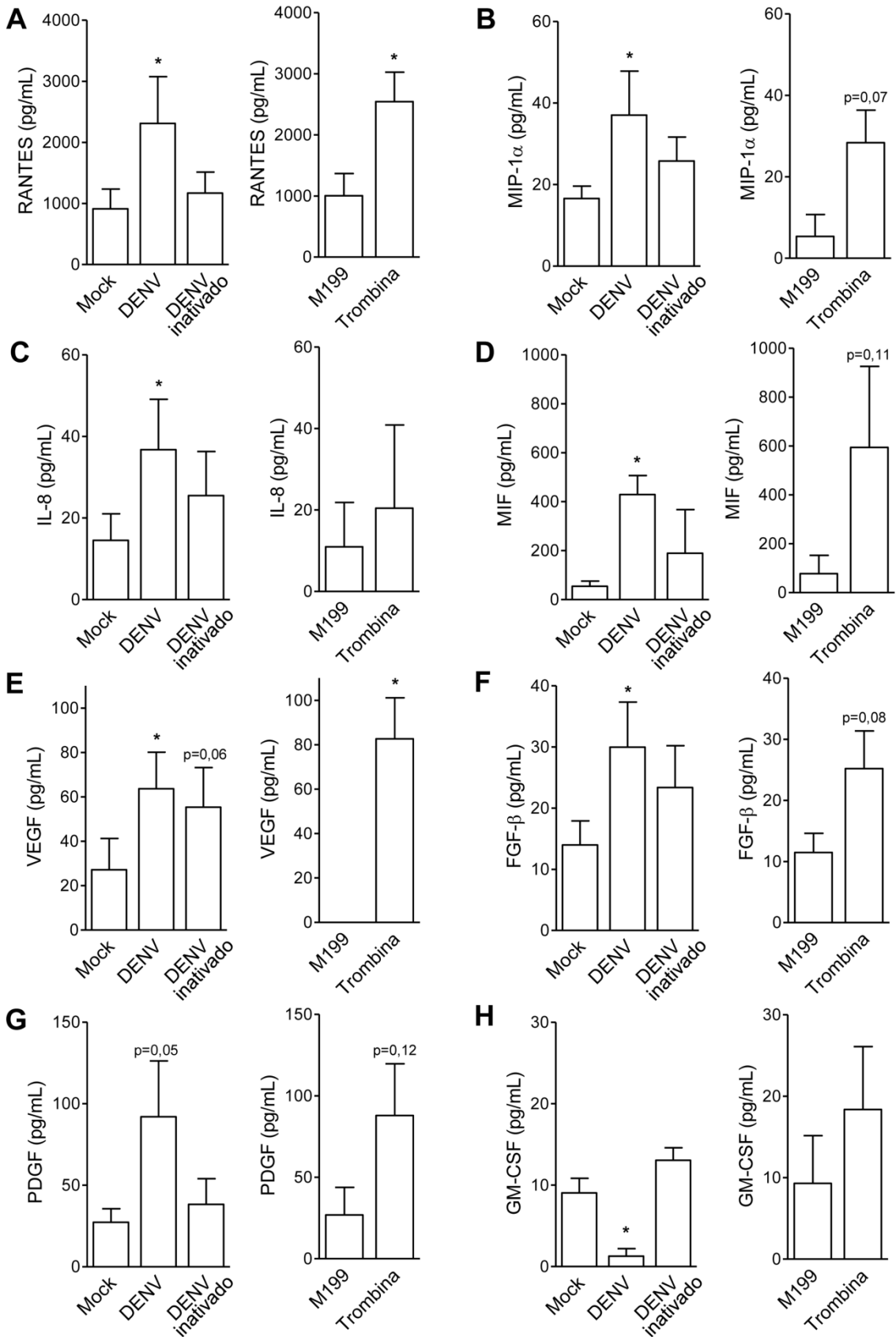
4.2.1 DENV-2 induz a secreção de fatores estocados em grânulos plaquetários *in vitro*

Apesar da expressão de P-selectina em plaquetas expostas ao DENV indicar a secreção de fatores estocados em grânulos, os fatores específicos secretados por plaquetas em resposta ao DENV permanecem desconhecidos. Foi recentemente demonstrado que a degranulação plaquetária é um evento organizado, de modo que diferentes estímulos (LPS de diferentes origens, por exemplo) promovem a secreção de diferentes fatores dos grânulos plaquetários (Berthet et al, 2012). No intuito de investigar o perfil de mediadores secretados por plaquetas em resposta ao DENV, nós avaliamos as concentrações de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de plaquetas (isoladas com depleção de células CD45⁺) incubadas (6 horas, 37°C) com o DENV-2, DENV-2 inativado por aquecimento, ou mock. A título de comparação, plaquetas mantidas em meio 199 nas mesmas condições e ativadas com trombina (0,1 U/mL) 15 minutos antes da recuperação dos sobrenadantes foram processadas paralelamente.

Entre os fatores que são estocados nos grânulos plaquetários e secretados mediante estímulo (Vieira-de-Abreu et al, 2013; Strüßmann et al, 2013), nós observamos níveis aumentados das quimiocinas RANTES, MIP-1 α , MIF e IL-8 (Figura 4.4A-D) e dos fatores de crescimento VEGF, FGF- β e PDGF (Figura 4.4E-G) nos sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV em comparação ao Mock. Plaquetas estimuladas com trombina também secretaram níveis significativamente maiores de RANTES e VEGF (Figura 4.4A e E),

enquanto um aumento importante, mas não significativo, foi observado nas concentrações de MIP-1 α , MIF, PDGF e FGF básica. Apesar das diferenças não terem sido significativas, a secreção destes fatores em plaquetas estimuladas com trombina é descrita na literatura (Jonnalagadda et al, 2012; Strüßmann et al, 2013). De modo interessante, a exposição ao DENV modulou negativamente a secreção de GM-CSF, que ocorreu de forma espontânea em plaquetas mantidas em meio 199 ou plaquetas expostas ao Mock (Figura 4.4H). A ativação plaquetária por trombina não modulou a secreção de GM-CSF e IL-8 em nossos ensaios.

Figura 4.4: DENV-2 induz a secreção de fatores estocados em grânulos plaquetários. Plaquetas foram expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado por aquecimento por 6 horas. Plaquetas incubadas em meio 199 (M199) nas mesmas condições foram mantidas sem estímulo ou foram ativadas com 0,1 U/mL de trombina por 15 minutos antes de serem centrifugadas e o sobrenadante recolhido. As concentrações de (A) RANTES, (B) MIP-1 α , (C) IL-8, (D) MIF, (E) VEGF, (F) FGF- β , (G) PDGF, e (H) GM-CSF foram avaliadas no sobrenadante de plaquetas mantidas em cada condição. Barras representam médias \pm erro padrão da média de 3 (para estímulo com trombina) a 8 (para estímulo com o DENV) experimentos com plaquetas de doadores independentes. * significa $p < 0,05$ em relação ao Mock ou M199.



4.2.2 Infecção pelo DENV induz síntese e secreção de IL-1 β em plaquetas

Além da secreção de fatores estocados em grânulos, a habilidade de plaquetas em processar pré-RNA contendo *introns* e sintetizar a IL-1 β a partir da tradução do RNA maduro tem sido demonstrada (Denis et al, 2005; Schwertz et al, 2006; Shashkin et al, 2008; Weyrich et al, 2009). No intuito de determinar se plaquetas sintetizam IL-1 β durante a infecção pelo DENV, plaquetas isoladas de voluntários saudáveis ou de pacientes com dengue foram permeabilizadas e marcadas com um anticorpo que reconhece tanto a IL-1 β imatura (pré-IL-1 β) quanto a IL-1 β clivada (ativa). O percentual de plaquetas expressando IL-1 β foi significativamente ($p < 0,01$) maior em pacientes com dengue ($53,1 \pm 20,4\%$) em comparação aos voluntários saudáveis ($7,5 \pm 5,7\%$) (Figura 4,5A).

Nós então examinamos se o DENV-2 induz diretamente a síntese e secreção de IL-1 β em plaquetas de voluntários saudáveis. A exposição de plaquetas ao DENV-2 por 6 horas aumentou significativamente ($p < 0,05$) o percentual de plaquetas positivas para IL-1 β (DENV-2, $26,0 \pm 8,6\%$ versus $7,4 \pm 3,2\%$ ou $4,2 \pm 2,8\%$ para DENV-2 inativado e mock, respectivamente) (Figura 4.5B). Os níveis de IL-1 β também foram maiores nos sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV em comparação ao mock ou ao DENV inativado por aquecimento (Figura 4.5C). De modo similar ao observado para a expressão de P-selectina, a síntese de IL-1 β também foi induzida em plaquetas expostas ao DENV-2 purificado (Figura 4.5D). Estes resultados indicam que plaquetas humanas sintetizam, acumulam e secretam IL-1 β diante da infecção pelo DENV.

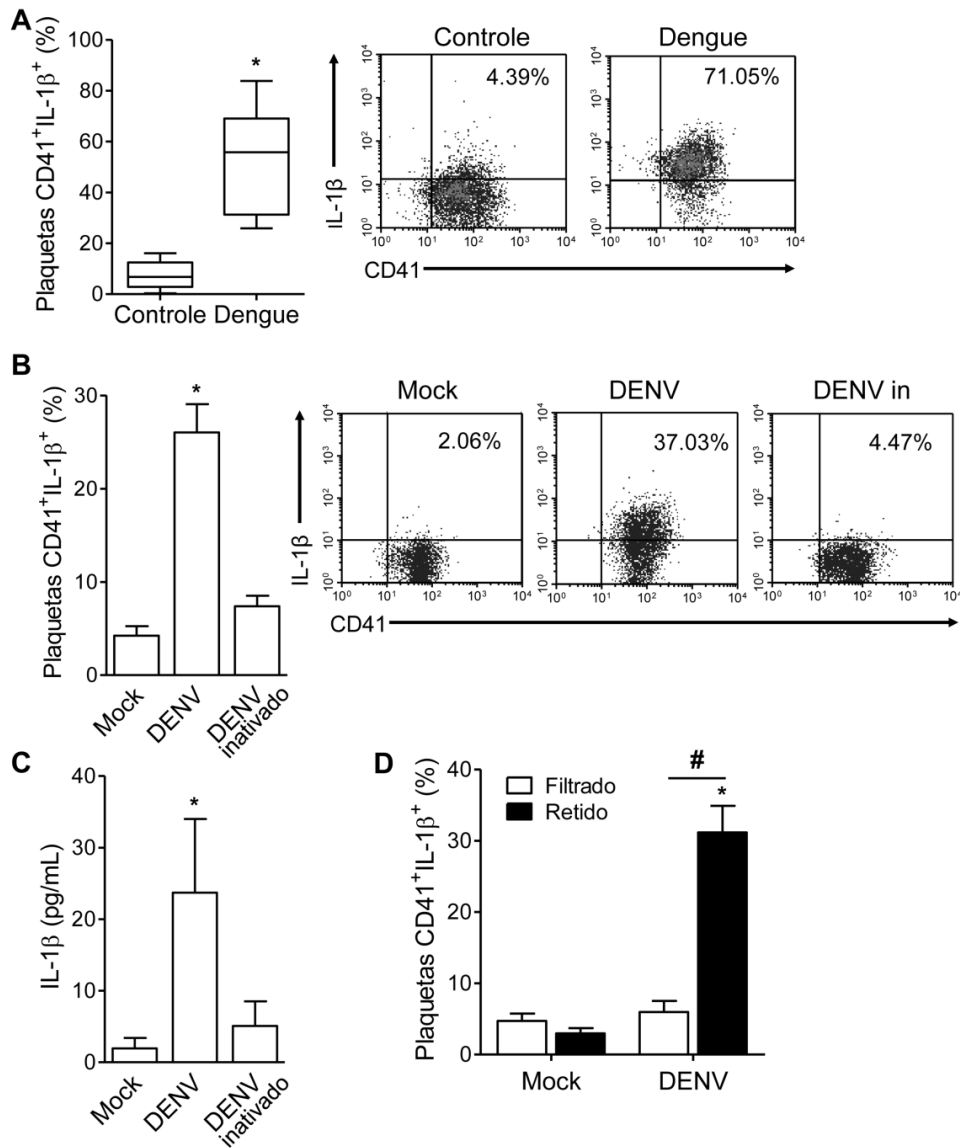


Figure 4.5: Síntese de IL-1 β em plaquetas de pacientes com dengue ou plaquetas expostas ao DENV-2 *in vitro*. (A) O percentual (%) de plaquetas IL-1 β ⁺ em voluntários saudáveis (Controle, n = 12) ou pacientes com dengue (Dengue, n = 18). O gráfico mostra mediana, interquartis e 5-95 percentis. (B-C) Plaquetas foram expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado por aquecimento. (B) O % de plaquetas expressando IL-1 β e (C) a concentração de IL-1 β nos sobrenadantes foram analisados em cada condição. (D) A expressão % de IL-1 β em plaquetas expostas à fração filtrada (filtrado) ou retida (retido) do DENV-2 purificado através de um filtro Centricon YM100 ou Mock processado paralelamente. Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 a 8 experimentos independentes com doadores distintos. * significa p<0,05 comparado com o Controle ou Mock, # significa p<0,05 entre filtrado e retido. *Densit plots* representativos mostram a expressão de IL-1 β em plaquetas de um voluntário saudável e um paciente com dengue (A), ou em plaquetas de um voluntário saudável expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado (B).

4.2.3 Infecção pelo DENV induz secreção de micropartículas contendo IL-1 β em plaquetas

A secreção da IL-1 β via MPs tem sido mostrada em monócitos e em plaquetas (Wang et al, 2011; Brown and McIntyre, 2011). Nós então examinamos MPs derivadas de plaquetas de pacientes ou de plaquetas expostas ao DENV *in vitro* quanto à presença de IL-1 β . Plaquetas de pacientes com dengue apresentam uma proporção mais elevada de MPs em relação aos voluntários saudáveis (Figura 4.6A). A marcação positiva para IL-1 β foi detectada em 25,3 \pm 11,2% das MPs plaquetárias de pacientes com dengue e em 3,5 \pm 1,9% nos controles (Figura 4.6B). Além disso, a exposição de plaquetas de voluntários saudáveis ao DENV-2, mas não ao mock ou ao vírus inativado, aumentou significativamente a secreção de MPs plaquetárias (Figura 4.6C) e de MPs contendo IL-1 β (Figura 4.6D).

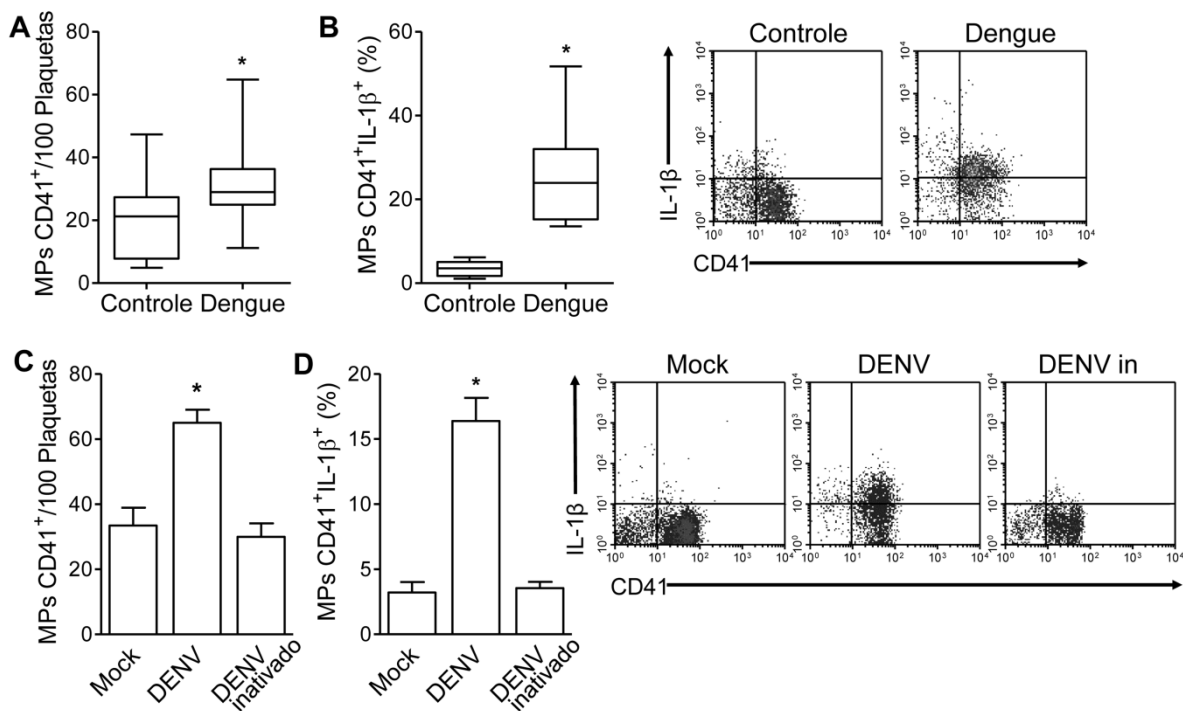


Figura 4.6: DENV induz a secreção de MPs plaquetárias contendo IL-1 β . (A) A proporção de MPs por 100 plaquetas em amostras de voluntários saudáveis (Controle, n = 12) ou pacientes com dengue (Dengue, n = 18). (B) O percentual (%) de MPs positivas para IL-1 β em Controle ou Dengue. Gráficos mostram mediana, interquartis e 5-95 percentis. (C-D) Plaquetas de voluntários saudáveis foram expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado por aquecimento. A quantidade de MPs plaquetárias (C) e o % de MPs contendo IL-1 β (D) são mostrados. As barras representam média \pm erro padrão da média de 8 experimentos independentes com doadores distintos. * significa p<0,05 em relação ao Controle ou Mock. *Densit plots* representativos mostram a expressão de IL-1 β em MPs de um voluntário saudável e um paciente com dengue (B), ou de plaquetas expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado (D).

4.2.4 Ativação do inflamassoma NLRP3 em plaquetas de pacientes com dengue

Os inflamassomas são complexos multimoleculares intracelulares que controlam a secreção da IL-1 β no sistema imune a partir da atividade da caspase-1. A ativação do inflamassoma NLRP3 promove o recrutamento do adaptador ASC e a ativação da caspase-1 em resposta a infecções ou danos teciduais (Schroder e Tschopp, 2010; Davis et al, 2011). Nós, inicialmente, investigamos a presença de componentes do inflamassoma em plaquetas. Como mostra a figura 4.7A, o receptor NLRP3 está presente em plaquetas tanto de voluntários saudáveis quanto de pacientes com dengue. Os níveis de NLRP3 em MPs plaquetárias, por outro lado, foram enriquecidos em amostras de pacientes com dengue em relação aos controles (Figura 4.7B).

No intuito de investigar mais profundamente a ativação do inflamassoma em plaquetas, nós examinamos a montagem do inflamassoma NLRP3 a partir de microscopia confocal. Plaquetas isoladas de pacientes com dengue ou voluntários saudáveis foram marcadas com anticorpos específicos para NLRP3 e ASC. Nós observamos colocalização citoplasmática de NLRP3 e ASC em plaquetas isoladas de pacientes com dengue, mas não em plaquetas controle, nas quais ambas as proteínas estavam presentes mas não colocalizadas (Figura 4.7C). Consistente com estes dados, a ativação de caspase-1 foi maior em plaquetas de pacientes com dengue ($17,11 \pm 4,74$ IMF) em comparação com plaquetas de voluntários saudáveis ($9,53 \pm 1,28$ IMF) (Figura 4.7D) e maiores quantidades de IL-1 β clivada foram observadas em plaquetas de pacientes com dengue quando comparado a plaquetas controle (Figura 4.7E). Juntos, estes dados demonstram a presença dos componentes do inflamassoma NLRP3 em plaquetas, e a montagem do inflamassoma NLRP3 com ativação de caspase-1 diante da infecção pelo DENV.

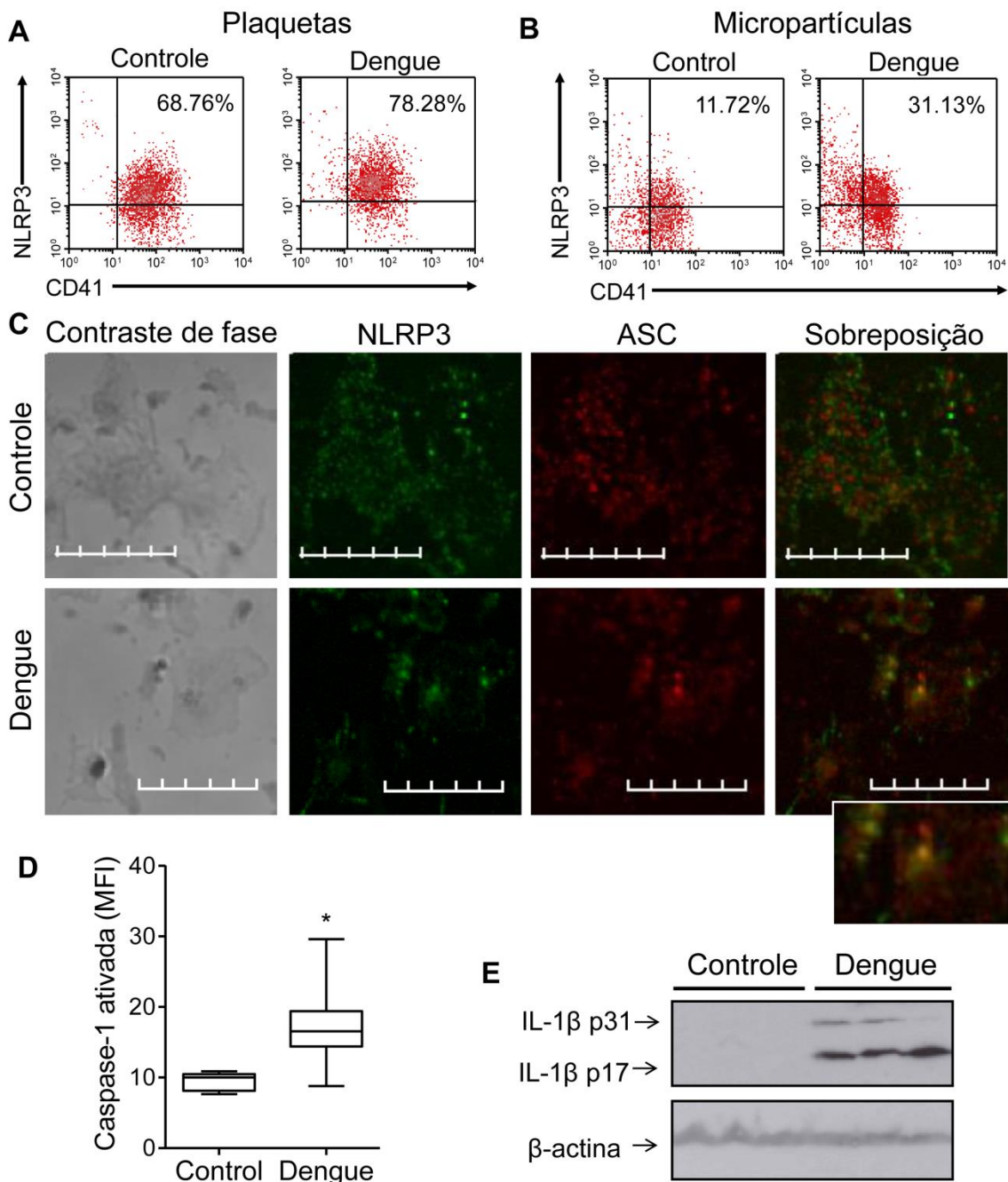


Figura 4.7: Ativação do inflamassoma NLRP3 em plaquetas de pacientes com dengue. (A-B) *Density plots* representativos mostrando a expressão de NLRP3 em plaquetas (A) e MPs (B) de um voluntário saudável (Controle) ou paciente com dengue (Dengue). (C) Plaquetas Controle ou Dengue foram marcadas com anti-NLRP3 (verde) e anti-ASC (vermelho) e examinadas em microscópio confocal Olympus FV10i-O com aumento de 240x. Imagens foram processadas no programa FLUOVIEW FV1000 MPE 5.0. Barras representam 10 μ m. (D) A ativação de caspase-1 foi avaliada em plaquetas Controle (n = 6) ou Dengue (n = 18) pela intensidade média de fluorescência (IMF) da sonda FLICA. O gráfico mostra mediana, interquartil e 5-95 percentis. * representa $p < 0,05$ em relação ao controle. (E) *Western blot* para pré-IL-1 β (p31), IL-1 β clivada (P17) e β -actina em plaquetas isoladas de três voluntários saudáveis e três pacientes com dengue.

4.2.5 A secreção de MPs contendo IL-1 β depende da ativação de caspase-1

A exposição de plaquetas de voluntários saudáveis ao DENV-2 aumentou significativamente ($p < 0,05$) a ativação de caspase-1 (DENV-2, $47,4 \pm 10,6$ IMF *versus* $26,1 \pm 9,8$ ou $25,8 \pm 9,7$ IMF para DENV-2 inativado e mock, respectivamente) (Figura 4.8A). Para esclarecer o papel do inflamassoma na secreção de MPs plaquetárias contendo IL-1 β , plaquetas foram tratadas com o inibidor de caspase-1 YVAD-fmk antes de serem incubadas com o DENV. O pré-tratamento com YVAD não afetou a síntese de IL-1 β em plaquetas (Figura 4.8B), mas reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de IL-1 β nos sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV (Figura 4.8C). De modo interessante, a exposição de plaquetas ao DENV na presença de YVAD inibiu completamente ($p < 0,05$) a secreção de MPs contendo IL-1 β (Figura 4.8D), indicando que o empacotamento da IL-1 β e secreção via MPs depende da ativação do inflamassoma.

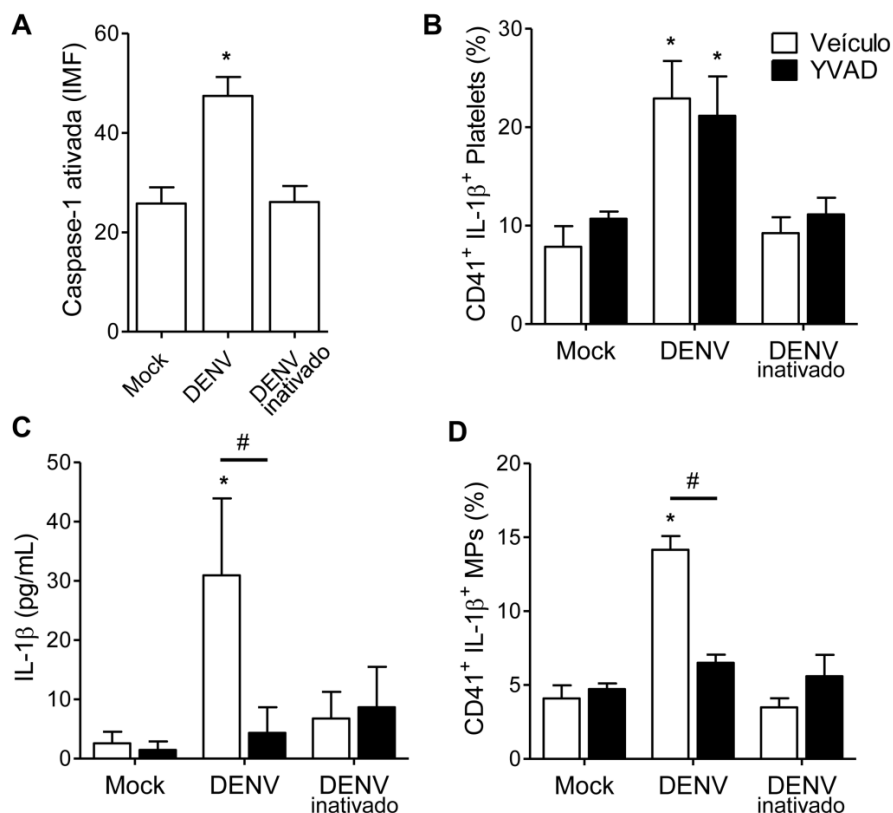


Figura 4.8: A ativação de caspase-1 em plaquetas intermedeia a secreção de micropartículas contendo IL-1 β . Plaquetas foram expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado por aquecimento na presença ou ausência do inibidor de caspase-1 YVAD ou DMSO (Veículo). A ativação de caspase-1 avaliada pela intensidade média de fluorescência (IMF) da sonda FLICA (A), o percentual (%) de plaquetas expressando IL-1 β (B), a concentração de IL-1 β nos sobrenadantes (C), e o % de MPs contendo IL-1 β (D) foram avaliados em cada condição. As barras representam médias \pm erro padrão da média de 6 a 8 experimentos independentes com doadores distintos. * representa $p < 0,05$ em comparação ao Mock; # significa $p < 0,05$ entre YVAD e DMSO.

4.2.6 Espécies reativas de oxigênio derivadas da mitocôndria ativam o inflamassoma em plaquetas expostas ao DENV

Em células monocíticas, a geração aumentada de ROS pela mitocôndria (ROS_m) induz a ativação de NLRP3 e montagem do inflamassoma (Zhou et al, 2011). Para determinar se esta via participa da ativação do inflamassoma NLRP3 em plaquetas durante a dengue, nós inicialmente investigamos se plaquetas de pacientes com dengue produzem ROS_m. Como observado nas Figuras 4.9A e 4.9B, plaquetas isoladas de pacientes com dengue produzem níveis elevados de ROS de origem mitocondrial. O tratamento das plaquetas de pacientes com o desacoplador FCCP reduziu significativamente a geração de ROS, confirmando que as ROS foram geradas na mitocôndria (Figura 4.9B). A geração de ROS mitocondriais também foi significativamente ($p < 0,01$) maior em plaquetas expostas ao DENV *in vitro* em comparação ao DENV inativado ou ao mock (Figura 4.9C).

No intuito de investigar o papel desempenhado pelas ROS derivadas da mitocôndria na ativação do inflamassoma em plaquetas, nós tratamos plaquetas com o antioxidante específico para ROS mitocondriais mitoTEMPO antes de expô-las ao DENV-2. A exposição de plaquetas ao DENV na presença de mitoTEMPO reduziu significativamente a geração de ROS_m (Figura 4.9D), confirmando novamente a origem mitocondrial das ROS. De modo similar, o aumento na ativação de caspase-1 e a secreção de IL-1 β também foram inibidas pelo tratamento com mitoTEMPO (Figura 4.9 E-F) indicando que a ativação do inflamassoma em plaquetas expostas ao DENV depende de sinalização mitocondrial.

Para determinar se o tratamento antioxidante inibiu a ativação do inflamassoma de um modo seletivo, nós avaliamos os efeitos do mitoTEMPO na secreção da quimiocina RANTES, que é pré-formada e estocada nos grânulos plaquetários (Vieira de Areu et al, 2013; Blair et al, 2009). Como mostrado na figura 4.9G, o tratamento com mitoTEMPO não impediu a secreção de RANTES em plaquetas expostas ao DENV-2, sugerindo especificidade da sinalização via ROS mitocondrial para a ativação do inflamassoma NLRP3.

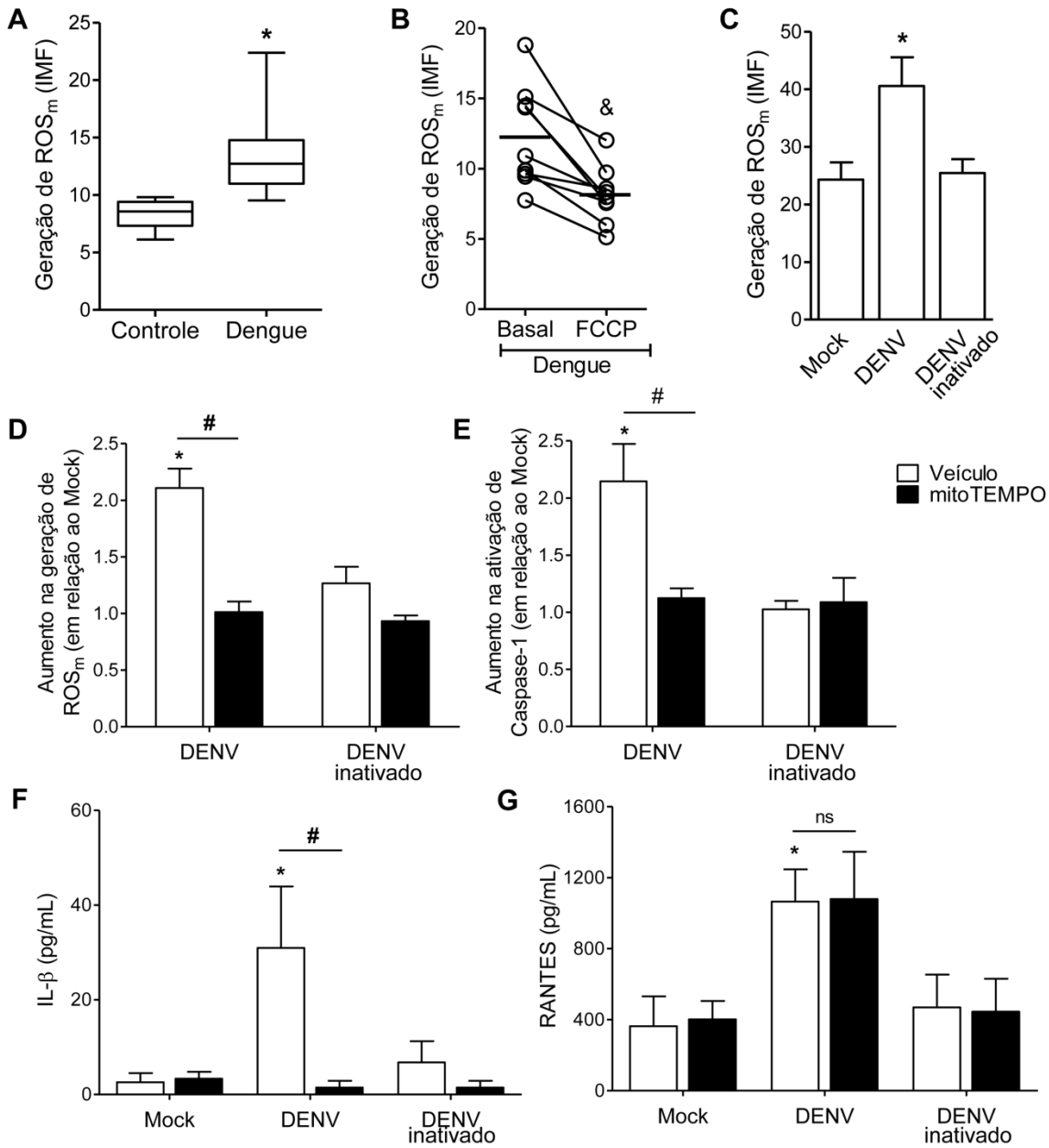


Figura 4.9: DENV ativa o inflammasoma em plaquetas por vias que requerem a geração de ROS na mitocôndria. (A-B) A geração de ROS de origem mitocondrial (ROS_m) em plaquetas isoladas de voluntários saudáveis (Controle, n = 8) ou de pacientes com dengue (Dengue, n = 29) indicada pela intensidade média de fluorescência (IMF) da sonda MitoSOX Red. (A) O gráfico mostra mediana, interquartil e 5-95 percentis. (B) Cada ponto representa plaquetas de um paciente na ausência (basal) ou na presença de FCCP. As linhas horizontais indicam médias. (C-G) Plaquetas foram expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado por aquecimento na presença ou ausência de mitoTEMPO. A IMF para MitoSOX Red (C-D), a ativação de caspase-1 indicada pela IMF da sonda FLICA (E), e as concentrações de IL-1β (F) e RANTES (G) foram avaliadas em plaquetas mantidas em cada condição. Barras representam médias ± erro padrão da média de 4 a 8 experimentos independentes. * indica p<0,05 em relação ao controle ou Mock; & indica p<0,05 em relação ao basal; # significa p<0,05 em relação ao veículo (DMSO).

4.2.7 Quinases da família RIP contribuem para a ativação do inflamassoma em plaquetas expostas ao DENV via mecanismos dependentes de ROS_m

Vince e colaboradores (2012) demonstraram ativação do inflamassoma NLRP3 via produção de ROS_m induzida pelas quinases RIP-1/RIP-3. Considerando o papel crítico das ROS_m na ativação do inflamassoma em plaquetas, nós testamos se o inibidor de RIP1/RIP3 necrostatina-1 (Nec-1) influencia a geração de ROS derivadas da mitocôndria em plaquetas expostas ao DENV-2. Como observado na Figura 4.10A, a exposição de plaquetas ao DENV-2 na presença de Nec-1 protegeu as plaquetas da geração de ROS pela mitocôndria. Consistente com a inibição do inflamassoma pelo tratamento com mitoTEMPO, e as ROS mitocondriais como efetores da sinalização via RIP, a ativação de caspase-1 e a secreção de IL-1 β induzidas pelo DENV em plaquetas também foram inibidas ($p < 0,05$) pelo tratamento com Nec-1 (Figura 4.10B e C). De modo similar ao mitoTEMPO, a Nec-1 não afetou a secreção de RANTES em plaquetas estimuladas com o DENV-2 (Figura 4.10D).

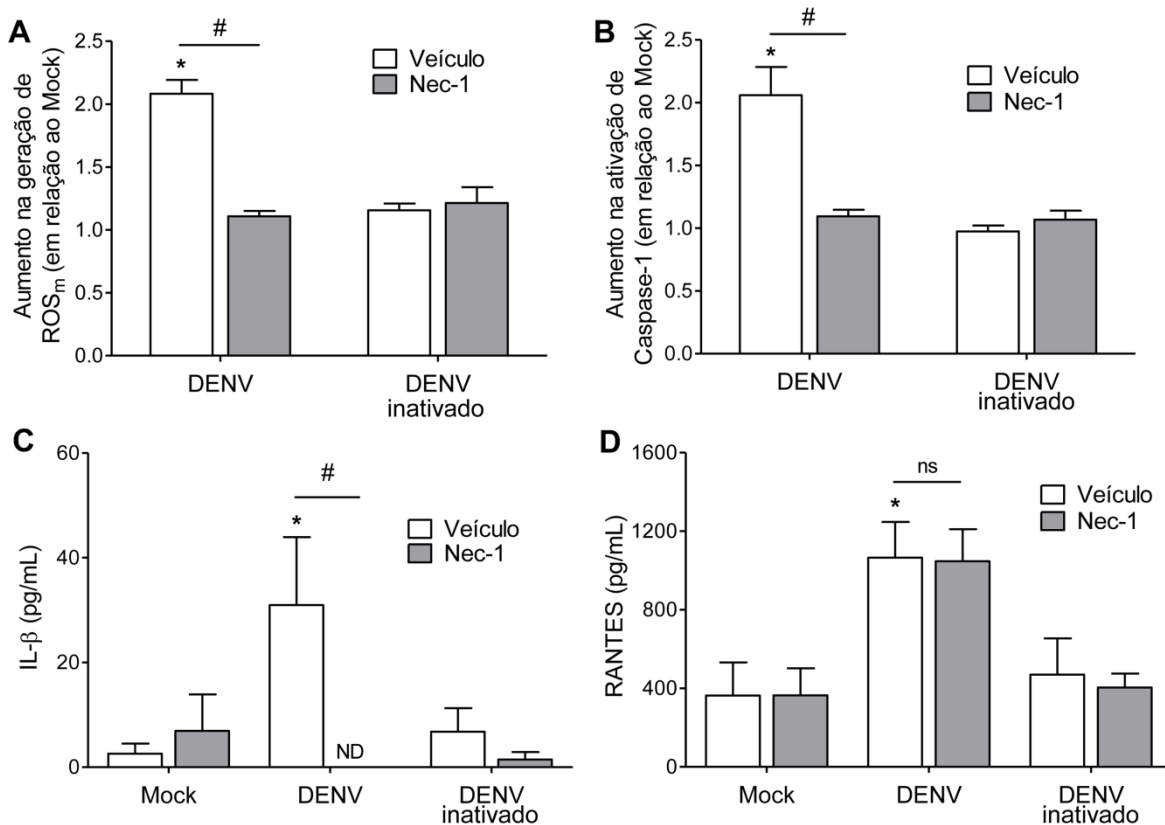


Figura 4.10: Quinases da família RIP ativam o inflamassoma por vias dependentes de ROS mitocondriais: Plaquetas foram expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado por aquecimento na presença ou ausência do inibidor de RIP1/RIP3 Necrostatina-1 (Nec-1). A intensidade média de fluorescência (IMF) para MitoSOX Red (**A**), a ativação de caspase-1 indicada pela IMF da sonda FLICA (**B**), e as concentrações de IL-1β (**C**) e RANTES (**D**) foram avaliadas em plaquetas mantidas em cada condição. Barras representam médias ± erro padrão da média de 4 a 8 experimentos independentes com doadores distintos.* indica $p < 0,05$ em relação ao Mock; # significa $p < 0,05$ em relação ao veículo.

4.2.8 A síntese de IL-1 β em plaquetas e a secreção de MPs contendo IL-1 β estão associadas com aumento de permeabilidade vascular na dengue

A classificação quanto a presença de sinais clínicos de permeabilidade vascular dos pacientes incluídos nesta etapa do estudo seguiu os mesmos critérios daqueles apresentados anteriormente (item 4.1.3, página 40). Para as análises apresentadas a seguir, 45% dos pacientes foram positivos, enquanto 55% foram negativos para alterações de permeabilidade vascular. O percentual de plaquetas e MPs plaquetárias expressando IL-1 β foi significativamente ($p < 0,05$) maior em pacientes que apresentaram sinais clínicos de permeabilidade vascular aumentada ($65,4 \pm 16,4\%$ e $32,4 \pm 11,4$ para plaquetas e MPs plaquetárias, respectivamente) em comparação com os pacientes que não apresentaram evidências de aumento de permeabilidade ($38,9 \pm 16,2\%$ e $17,3 \pm 5,2\%$ para plaquetas e MPs plaquetárias, respectivamente) (Figura 4.11A e B). Resultados similares foram observados para a geração de ROS_m (Figura 4.11C) e ativação de caspase-1 (Figura 4.11D).

Além disso, nós observamos que os valores de hematócrito se correlacionaram positivamente com o percentual de plaquetas expressando IL-1 β , com a quantidade de MPs plaquetárias, e com o percentual de MPs contendo IL-1 β ; enquanto os níveis séricos de albumina se correlacionaram negativamente com o percentual de plaquetas positivas para IL-1 β e com a ativação de caspase-1. Não houve associações significativas entre ativação do inflamossoma e contagem de plaquetas (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: correlações dos componentes do inflamossoma com dados laboratoriais de pacientes com dengue.

	Hematócrito ¹		Albumina ²		Plaquetometria ¹	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Plaquetas IL-1 β +	0,5725	0,0409	-0,5726	0,0408	-0,4181	0,1762
MPs CD41+	0,4865	0,0296	-0,2845	0,2855	-0,4164	0,0857
MPs IL-1 β +	0,6003	0,0301	-0,3499	0,2915	-0,4069	0,1892
Caspase-1 ativada	0,4421	0,0864	-0,5096	0,0437	-0,2224	0,3751

¹Correlação com a contagem de plaquetas e valor de hematócrito obtidos no mesmo dia em que expressão de IL-1 β foi avaliada;

²Correlações com a mais baixa concentração de albumina apresentada por cada paciente. Correlações significativas são apresentadas em negrito.

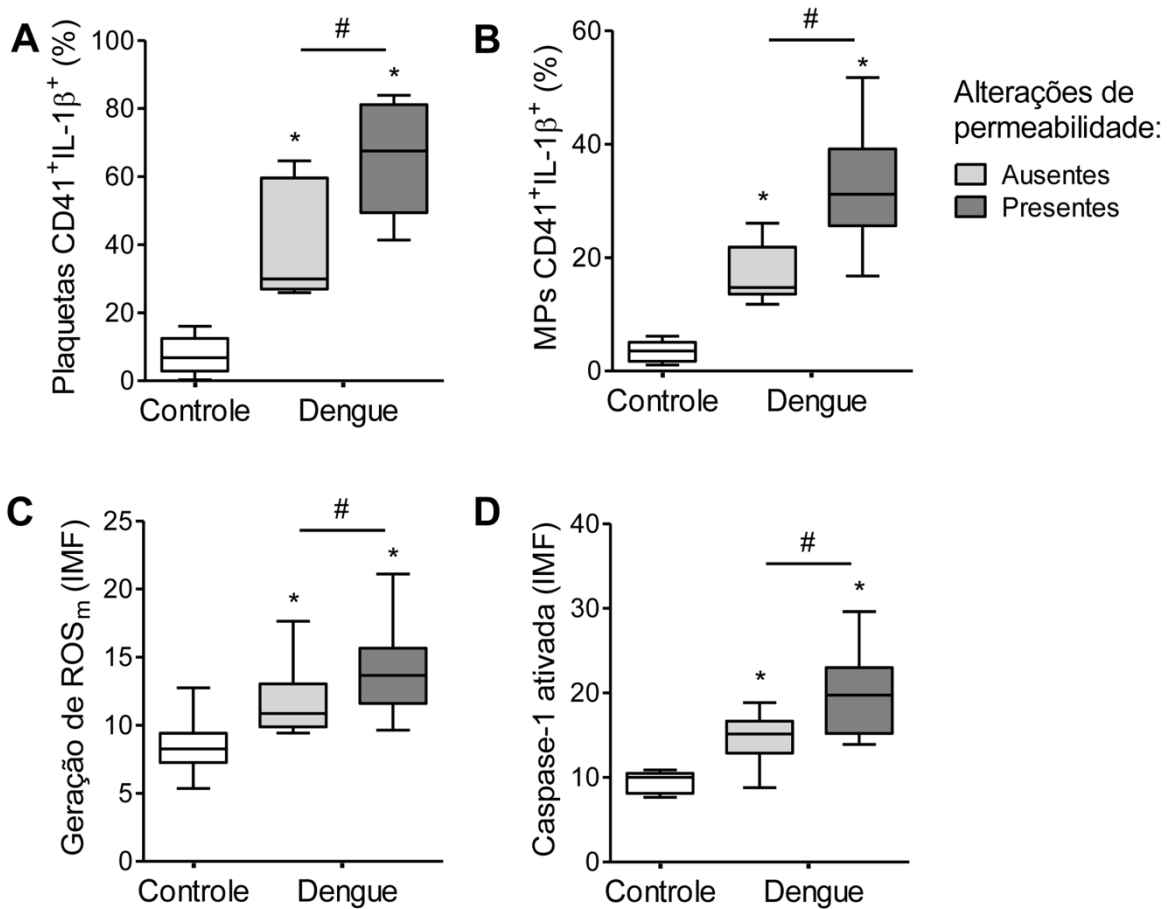


Figura 4.11: Aumento na permeabilidade vascular está associado com a ativação do inflamassoma e secreção de IL-1 β em micropartículas plaquetárias. (A-D) O percentual (%) de plaquetas (A) ou MPs (B) expressando IL-1 β , e a intensidade média de fluorescência (IMF) das sondas MitoSOX Red (C) indicando a geração de ROS de origem mitocondrial (ROS_m) ou FLICA (D) indicando ativação de caspase-1 em plaquetas isoladas de voluntários saudáveis (Controle) ou de pacientes com dengue (Dengue) que foram positivos ou negativos para alterações de permeabilidade vascular. Gráficos mostram mediana, interquartis e 5-95 percentis. * significa p<0,05 em relação ao Controle; # indica p<0,05 entre pacientes positivos ou negativos para alterações de permeabilidade vascular.

Para examinar os efeitos das MPs plaquetárias contendo IL-1 β sobre a permeabilidade endotelial, nós tratamos monocamadas de células endoteliais microvasculares humanas (HMEC-1) com MPs recuperadas de plaquetas expostas ao DENV-2 ou mock e medimos a permeabilidade da monocamada através de um ensaio de *Trans Well*. Monocamadas de células endoteliais estimuladas com MPs de plaquetas ativadas pelo DENV-2 apresentaram uma permeabilidade significativamente ($p < 0,05$) maior em comparação às células estimuladas com MPs de plaquetas expostas ao Mock. Este aumento na permeabilidade foi bloqueado na presença do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Figura 4.12). Estes resultados indicam que MPs plaquetárias contendo IL-1 β podem ativar o endotélio aumentando a permeabilidade vascular durante a infecção pelo DENV.

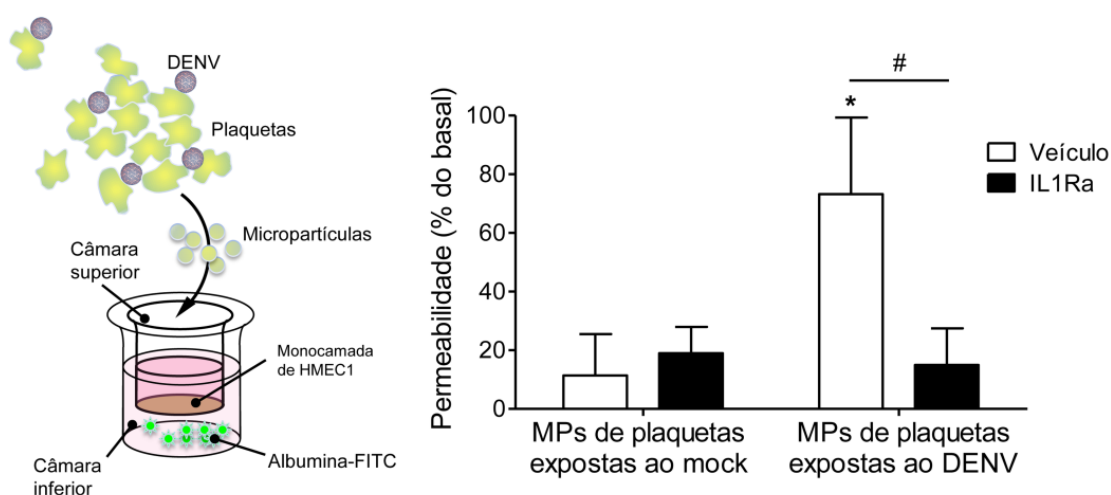


Figura 4.12: IL-1 β em MPs de plaquetas ativadas pelo DENV induz aumento de permeabilidade endotelial. A passagem passiva de albumina conjugada ao FITC através de monocamadas de células endoteliais incubadas com MPs recuperadas de plaquetas expostas ao Mock ou ao DENV. As células endoteliais foram estimuladas na presença ou ausência do IL-1Ra. Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos com plaquetas de doadores independentes. * significa $p < 0,05$ em relação ao Mock; # indica $p < 0,05$ entre células tratadas com IL-1Ra ou veículo.

4.2.9 Aumento da agregação plaqueta-monócito em pacientes com dengue

Além da secreção de mediadores inflamatórios, plaquetas podem modular as respostas imune e inflamatória a partir da interação com leucócitos, especialmente monócitos e neutrófilos (Dixon et al, 2006; Polanowska-Grabowska et al, 2010; Parimon et al, 2013). Para investigar a formação de agregados plaqueta-monócito durante a dengue, nós avaliamos a presença do marcador de plaquetas CD41a na população de monócitos (CD14⁺) por citometria de fluxo. Como mostra a Figura 4.13A, pacientes com dengue apresentam mais agregados plaqueta-monócito circulantes que voluntários saudáveis (27,5±15,3% vs 8,1±1,7%, p<0,001).

A P-selectina é a principal molécula de adesão na superfície da plaqueta ativada que promove a interação com leucócitos a partir da ligação com a glicoproteína 1 ligante de P-selectina (PSGL-1) (Larsen et al, 1989; Parimon et al, 2013). A expressão de P-selectina nos pacientes com dengue incluídos nesta etapa do estudo (epidemia de 2013, DENV-4) foi em média 37,8±19,5%, e o percentual de plaquetas expressando P-selectina se correlacionou positivamente com os níveis de agregados plaqueta-monócito circulantes (r = 0,5438, p = 0,0161) (Figure 4.11B).

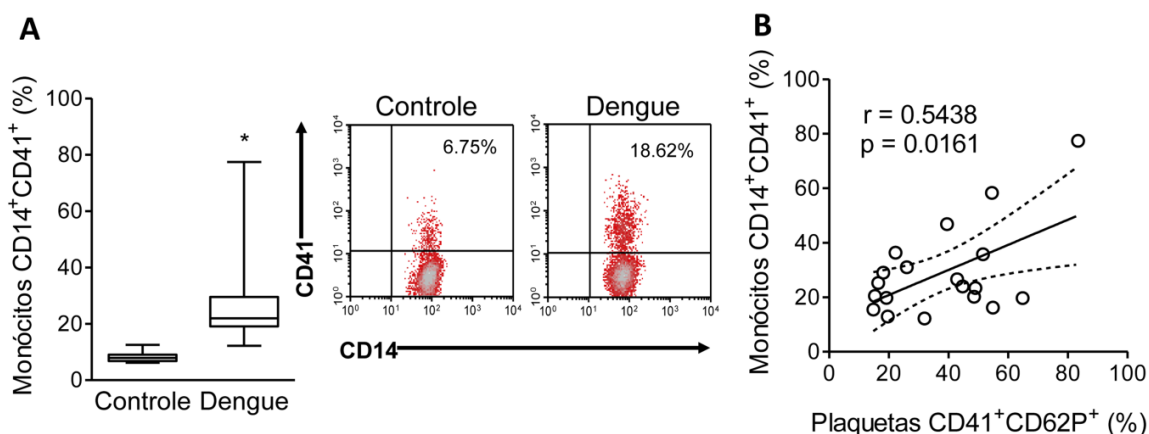


Figure 4.13: Formação de agregados plaqueta-monócito em pacientes com dengue. (A) O percentual (%) de monócitos CD14⁺CD41⁺ circulantes foi avaliado em voluntários saudáveis (Controle, n = 14) ou pacientes com dengue (Dengue, n = 22). O gráfico mostra mediana, interquartil e 5-95 percentis. * representa p<0,05 em relação ao controle. *Density plots* representativos mostram a expressão de CD41 em monócitos de um voluntário saudável e um paciente com dengue. (B) O % de plaquetas expressando CD62P foi plotado contra o % de monócitos expressando CD41. Regressão linear foi traçada de acordo com a distribuição dos pontos.

4.2.10 A formação de agregados plaqueta-monócito está associada com plaquetopenia e aumento de permeabilidade vascular em pacientes com dengue

A classificação dos pacientes incluídos nesta etapa do estudo de acordo com a contagem de plaquetas ou a presença de alterações de permeabilidade seguiu os mesmos critérios daqueles apresentados anteriormente. Entre os 22 pacientes nos quais os agregados plaqueta-monócito foram avaliados, a proporção de pacientes trombocitopênicos ou não-trombocitopênicos foi de 45% *versus* 55%, respectivamente; e a de pacientes positivos ou negativos para sinais de permeabilidade vascular aumentada foi de 48% *versus* 52%, respectivamente. Tanto os pacientes trombocitopênicos quanto os positivos para alterações de permeabilidade vascular apresentaram níveis aumentados de agregados plaqueta-monócito quando comparados com os pacientes classificados como negativos para plaquetopenia ou sinais de permeabilidade vascular aumentada (Figura 4.14 A-B). Além disso, nós observamos que o percentual de monócitos agregados a plaquetas se correlaciona de modo inverso com a contagem de plaquetas e com os níveis de albumina sérica nos pacientes com dengue (Figura 4.14 C-D e Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Correlação entre a formação de agregados plaqueta-monócito e dados laboratoriais de pacientes com dengue.

	Agregação plaqueta-monócito	
	<i>R</i>	<i>p</i>
Plaquetometria ¹	-0.5593	0.0084
Albuminemia ²	-0.5601	0.0299
Hematócrito ¹	0.0008	0.9795

¹Correlação com a contagem de plaquetas e valor de hematócrito obtidas no mesmo dia em que os agregados plaqueta-monócito foram avaliados;

²Correlação da formação de agregados plaqueta-monócito com a mais baixa concentração de albumina apresentada por cada paciente;

Correlações significativas são mostradas em negrito.

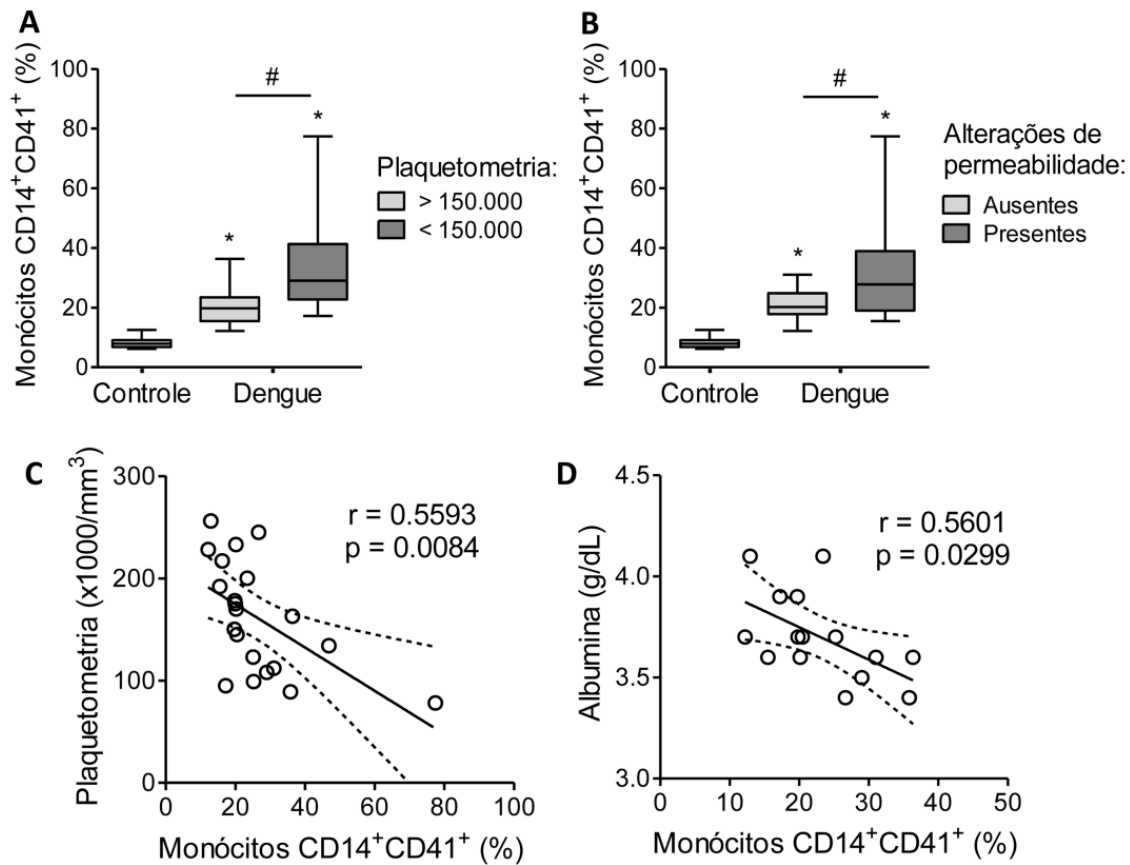


Figura 4.14: Agregados plaqueta-monócito estão associados com plaquetopenia e aumento de permeabilidade vascular na dengue. O percentual (%) de monócitos circulantes CD14⁺CD41⁺ em voluntários saudáveis (Controle) ou pacientes com dengue (Dengue) que foram positivos ou negativos para (A) plaquetopenia ou (B) alterações de permeabilidade vascular. Os gráficos mostram mediana, interquartil e 5-95 percentis. * representa $p < 0,05$ em relação ao controle; # significa $p < 0,05$ entre pacientes positivos e negativos. (C-D) o % de monócitos CD14⁺CD41⁺ foi plotado contra a plaquetometria obtida no mesmo dia na análise dos agregados plaqueta-monócito (C) e a albuminemia mais baixa de cada paciente (D). Regressão linear foi traçada de acordo com a distribuição dos pontos.

4.2.11 Expressão aumentada de moléculas co-estimulatórias em agregados plaqueta-monócitos

Tendo em vista a associação da formação de agregados plaqueta-monócito com o desfecho de aumento da permeabilidade vascular, nós formulamos a hipótese de que a interação plaqueta-monócito poderia participar da amplificação da resposta imune e inflamatória na dengue ao contribuir para a ativação dos monócitos, que tem sido amplamente demonstrada em pacientes com dengue (Durbin et al, 2008; Azeredo et al, 2010). Os monócitos ativados, por sua vez, contribuiriam para a tempestade de citocinas, um dos principais mecanismos de aumento da permeabilidade vascular durante a dengue grave (Pang et al, 2007; Bozza et al, 2008).

Para verificar se os pacientes incluídos no presente estudo apresentavam aumento da ativação de monócitos como demonstrado anteriormente em pacientes com dengue (Durbin et al, 2008; Azeredo et al, 2010), nós avaliamos a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 na população de monócitos (CD14⁺). Ambas as moléculas, CD80 e CD86, foram aumentadas nos monócitos de pacientes com dengue em comparação aos de voluntários saudáveis (14,1±11,1 *versus* 3,2±2,7 e 72,3±18 *versus* 44±18,9 para CD80 e CD86 respectivamente, p<0,01) (Figure 4.15A e B). De modo interessante, a formação de agregados plaqueta-monócito nos pacientes com dengue correlacionou positivamente com a expressão de CD80 (Figura 3.13C), mas não de CD86 (Figura 4.15D) nos monócitos.

No intuito de esclarecer a relação entre interação plaqueta-monócito e ativação dos monócitos durante a dengue, nós analisamos a expressão das moléculas co-estimulatórias nos monócitos que estavam agregados com plaquetas (CD14⁺CD41⁺) ou que não tinham plaquetas aderidas em sua superfície (CD14⁺CD41⁻). Como mostra a figura 4.15E, a expressão de CD80 foi observada majoritariamente nos monócitos CD41⁺ em relação aos CD41⁻, indicando aumento da ativação dos monócitos nos agregados plaqueta-monócito circulantes em pacientes com dengue.

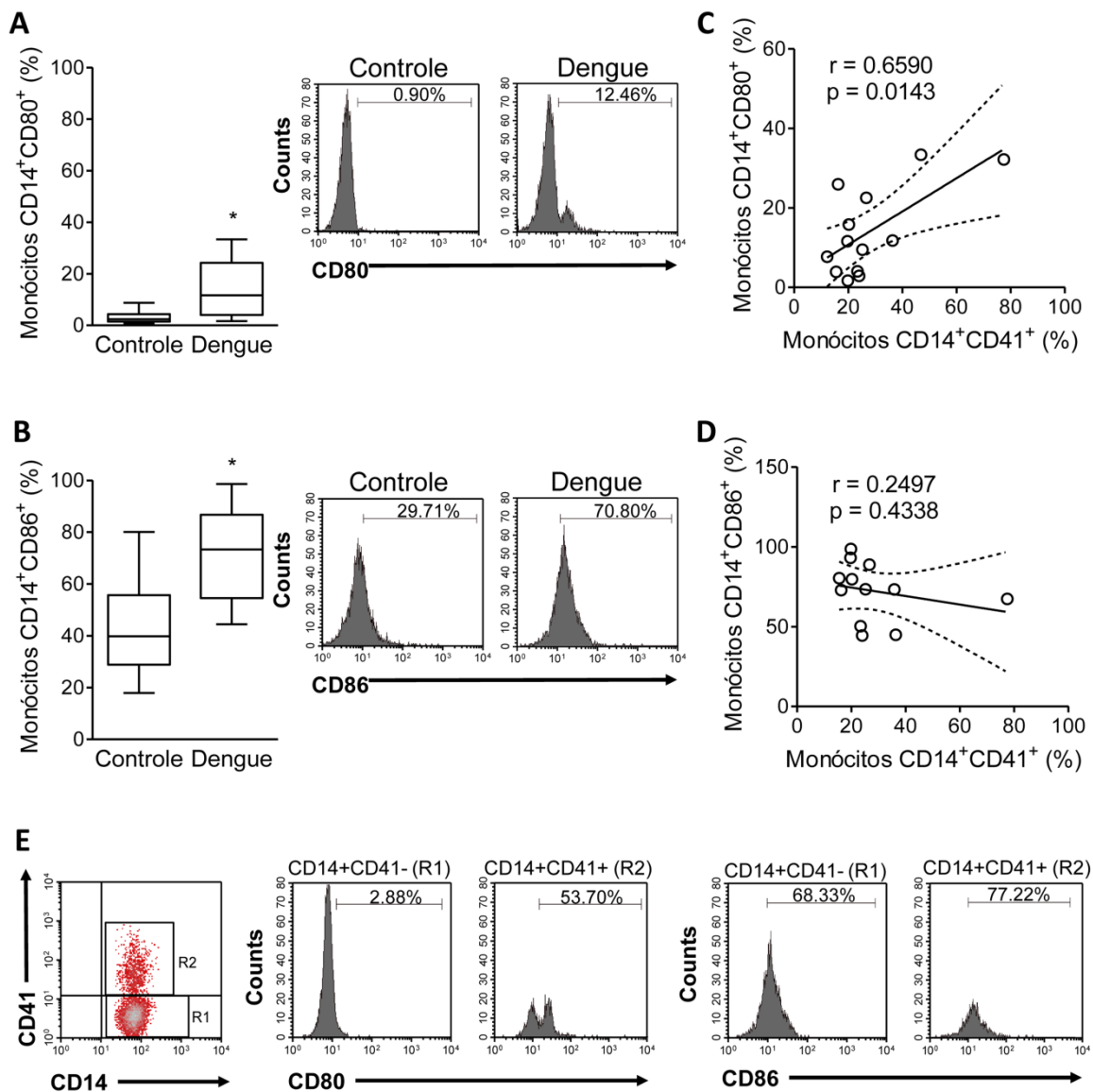


Figura 4.15: Aumento na expressão de moléculas co-estimatórias em agregados plaqueta-monócito de pacientes com dengue. O percentual (%) de monócitos (A) CD14⁺CD80⁺ e (B) CD14⁺CD86⁺ em voluntários saudáveis (Controle) e pacientes com dengue (Dengue). Os gráficos mostram mediana, interquartil e 5-95 percentis. * significa $p < 0,05$ em relação ao Controle. Histogramas representativos mostram a expressão de (A) CD80 ou (B) CD86 em monócitos Controle e Dengue. (C-D) O % de monócitos CD14⁺CD41⁺ foi plotado contra o % de monócitos (C) CD14⁺CD80⁺ ou (D) CD14⁺CD86⁺. Regressão linear foi traçada de acordo com a distribuição dos pontos. (E) Histogramas representativos da expressão de CD80 e CD86 em monócitos negativos (CD14⁺CD41⁻ (R1)) ou positivos (CD14⁺CD41⁺ (R2)) para CD41.

4.2.12 Plaquetas de pacientes com dengue agregam com monócitos controle e induzem secreção de citocinas *in vitro*

Nós então investigamos a habilidade de plaquetas isoladas de pacientes com dengue em formar agregados com monócitos de voluntários saudáveis modulando assim sua resposta. Após incubar plaquetas (isoladas com depleção de células CD45⁺) com monócitos (isolados com seleção positiva para CD14) por 12 horas, nós avaliamos o percentual de agregados plaqueta-monócito nas seguintes condições: plaquetas controle + monócitos controle; plaquetas controle + monócito de pacientes com dengue; e plaquetas de pacientes com dengue + monócitos controle. A formação de agregados plaqueta-monócito foi maior quando monócitos de voluntários saudáveis foram incubados com plaquetas de pacientes com dengue em comparação a plaquetas de um voluntário saudável heterólogo ($62,5 \pm 9,1$ vs $30,7 \pm 11,6$, $p=0,006$). A incubação de plaquetas controle com monócitos de pacientes com dengue não promoveu nenhum aumento significativo na formação de agregados plaqueta-monócito em comparação à interação entre plaquetas e monócitos de voluntários saudáveis ($41,8 \pm 19,5$, $p=0,2234$) (Figure 4.16).

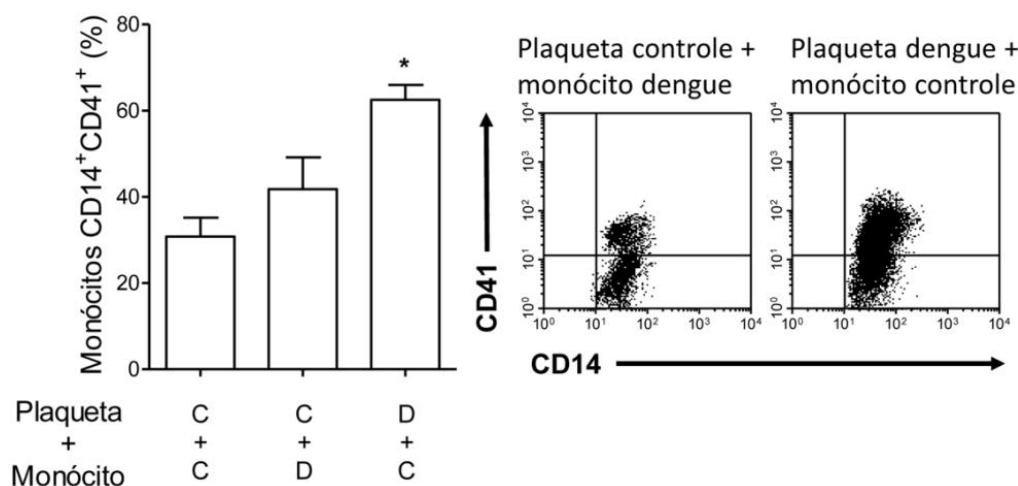


Figura 4.16: Plaquetas de pacientes com dengue agregam com monócitos controle *in vitro*. Plaquetas e monócitos isolados de voluntários saudáveis (Controle, C) ou de pacientes com dengue (D) foram incubados um com o outro como descrito no material e métodos. C+C, plaquetas controle incubadas com monócitos controle de doador heterólogo; C+D, plaquetas controle incubadas com monócitos de pacientes com dengue; ou D+C, plaquetas de pacientes com dengue incubadas com monócitos controle. O gráfico mostra o percentual (%) de monócitos CD14⁺CD41⁺ em cada condição. Barras representam médias \pm erro padrão da média de 7 combinações independentes de plaquetas e monócitos. * significa $p < 0,05$ em relação ao grupo C+C. Dot plots representativos mostram monócitos positivos para CD41 em C+C e D+C.

Trabalhos realizados na última década por nossos colaboradores da Universidade de Utah têm demonstrado que o contato com plaquetas ativadas aumenta a síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em monócitos, incluindo IL-1 β , IL-8, TNF- α e MCP-1 (Weyrich et al, 1996; Dixon et al, 2006; Weyrich et al, 2005). No presente estudo, os níveis de IL-1 β e IL-8 foram significativamente ($p < 0,05$) elevados no sobrenadante dos monócitos expostos a plaquetas de pacientes com dengue quando comparado a plaquetas controle (Figura 4.17A e B). Os níveis de MCP-1 foram elevados em todas as condições em que monócitos foram expostos a plaquetas quando comparado aos monócitos incubados sozinhos, independentemente da origem das células se de pacientes ou controles (Figura 4.17C). Além disso, a secreção de RANTES *ex vivo* foi maior em plaquetas de voluntários saudáveis em comparação com plaquetas isoladas de pacientes (Figura 3.17D).

A secreção de TNF- α não foi diferente entre monócitos expostos a plaquetas de voluntários ou de pacientes, ou entre interações plaqueta-monócito e monócitos sozinhos (Figura 4.17E). Nós observamos, contudo, que monócitos expostos a plaquetas de pacientes com dengue secretaram níveis mais elevados de IL-10 (Figura 4.17F), uma citocina para a qual modulação mediada pela interação plaqueta-monócito não foi até então descrita.

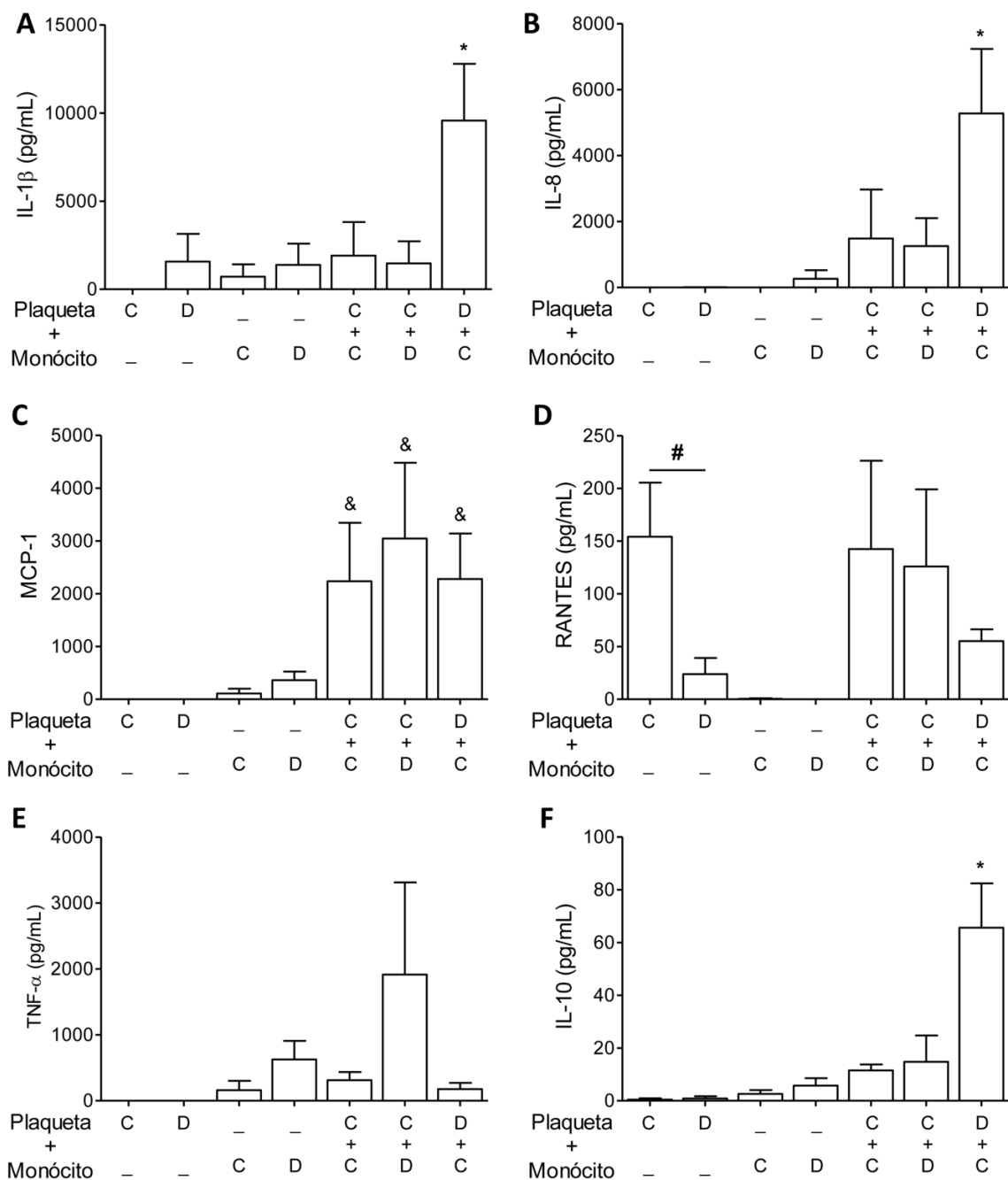


Figura 4.17: Plaquetas de pacientes com dengue modulam a secreção de citocinas em monócitos. Plaquetas e monócitos de voluntários saudáveis (Controle, C) ou de pacientes com dengue (Dengue, D) foram incubados sozinhos ou um com o outro como descrito. C+C, plaquetas controle incubadas com monócitos controle de doador heterólogo; C+D, plaquetas controle incubadas com monócitos de pacientes com dengue; ou D+C, plaquetas de pacientes com dengue incubadas com monócitos controle. As concentrações de (A) IL-1 β , (B) IL-8, (C) MCP-1, (D) RANTES, (E) TNF- α , e (F) IL10 no sobrenadante de células incubadas em cada condição são mostradas. Barras representam médias \pm erro padrão da média de 7 combinações independentes de plaquetas e monócitos. * significa $p < 0,05$ em relação ao grupo C+C; & significa $p < 0,05$ comparado com monócitos de mesma origem (Controle ou Dengue); # indica $p < 0,05$ entre plaquetas C e D.

4.3 Apoptose plaquetária na dengue

A apoptose de células do hospedeiro é amplamente mostrada na infecção pelo DENV (Courageot et al, 2003; Jaiyen et al, 2009; Torrentes-Carvalho et al, 2009; Levy et al, 2010). Alonzo e colaboradores (2012) demonstraram que plaquetas de pacientes com dengue apresentam características indicativas de apoptose e que estas plaquetas são fagocitadas quando postas em cultura com macrófagos. A exposição de fosfatidilserina na superfície é o principal sinal molecular para a fagocitose de células apoptóticas. O reconhecimento da fosfatidilserina não apenas promove a retirada do corpo apoptótico pelo fagócito, mas também respostas imunoregulatórias que incluem síntese e secreção de IL-10 (Freire-de-Lima et al, 2000; Chung et al, 2007). Nossa hipótese é de que o reconhecimento de plaquetas apoptóticas durante a formação de agregados plaqueta-monócito possa contribuir para a regulação imune dos monócitos, modulando a síntese de IL-10 nestas células. Inicialmente, nós avaliamos as características associadas à ativação da via intrínseca de apoptose em plaquetas de pacientes com dengue, incluindo alterações mitocondriais, exposição de fosfatidilserina, e ativação de caspases apoptóticas. A habilidade do DENV em induzir diretamente a apoptose plaquetária também foi investigada *in vitro*. Em seguida, nós investigamos a participação do reconhecimento de plaquetas apoptóticas na modulação da resposta celular nos agregados plaqueta-monócito.

4.3.1 Disfunção mitocondrial em plaquetas de pacientes com dengue

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi avaliado em plaquetas de pacientes com dengue a partir da fluorescência da sonda catiônica TMRE. Como mostra a Figura 4.18A, o $\Delta\Psi_m$ foi significativamente menor em plaquetas de pacientes com dengue ($15,0\pm 3,7$ IMF) quando comparado a plaquetas de voluntários saudáveis ($23,2\pm 4,6$ IMF). Tratamento com o ionóforo de prótons FCCP reduziu significativamente a fluorescência do TMRE tanto em plaquetas isoladas de voluntários saudáveis quanto de pacientes com dengue, confirmando a especificidade da marcação para a mitocôndria (Figura 4.18B). Como esperado, o $\Delta\Psi_m$ aumentou significativamente quando plaquetas controle foram incubadas com oligomicina (Figura 4.18C), um inibidor da F_1F_0 -ATPase que impede o retorno dos prótons à matriz mitocondrial através da ATP-sintase. Este aumento, no entanto, não foi observado quando plaquetas de pacientes com dengue foram tratadas com

oligomicina (Figura 4.18C), indicando que a despolarização da mitocôndria em plaquetas de pacientes com dengue se deve a um estado de permeabilidade aumentada das membranas mitocondriais a prótons.

Consistente com estes dados, nós não observamos diferenças na atividade de citrato sintase entre plaquetas de pacientes com dengue e controles (Figura 4.18D), confirmando que as diferenças na fluorescência da sonda TMRE não se devem a diferenças na massa mitocondrial entre os dois grupos. Além disso, como anteriormente mostrado (Figura 4.9A e B), plaquetas de pacientes com dengue produzem níveis elevados de ROS de origem mitocondrial, reforçando as evidências de disfunção mitocondrial em plaquetas de pacientes com dengue.

4.3.2 Dengue induz ativação da via intrínseca de apoptose em plaquetas

Despolarização mitocondrial e produção aumentada de ROS pela mitocôndria são alterações mitocondriais comuns à ativação da via intrínseca de apoptose. Outra característica da célula apoptótica é a exposição de fosfatidilserina. Nós observamos um aumento significativo na exposição de fosfatidilserina em plaquetas de pacientes com dengue (Figura 4.18E). Além disso, nós observamos que a exposição de fosfatidilserina em plaquetas de pacientes com dengue se correlaciona negativamente com o $\Delta\Psi_m$ ($r = -0,5205$; $p < 0,001$) (Figura 4.18F). De modo similar, plaquetas expostas ao DENV-2 *in vitro* também apresentaram aumento da exposição de fosfatidilserina associado a uma redução do $\Delta\Psi_m$ ($r = -0,6497$, $p < 0,05$) (Figura 4.18G). De modo interessante, em plaquetas duplamente marcadas com TMRE e Anexina V-FITC, a população de plaquetas que apresenta colapso do $\Delta\Psi_m$ concomitantemente exibe um aumento na exposição de fosfatidilserina, estando esta população (Anexina V⁺ TMRE⁻) aumentada em plaquetas expostas ao DENV quando comparado ao Mock ou vírus inativado (Figura 4.18G).

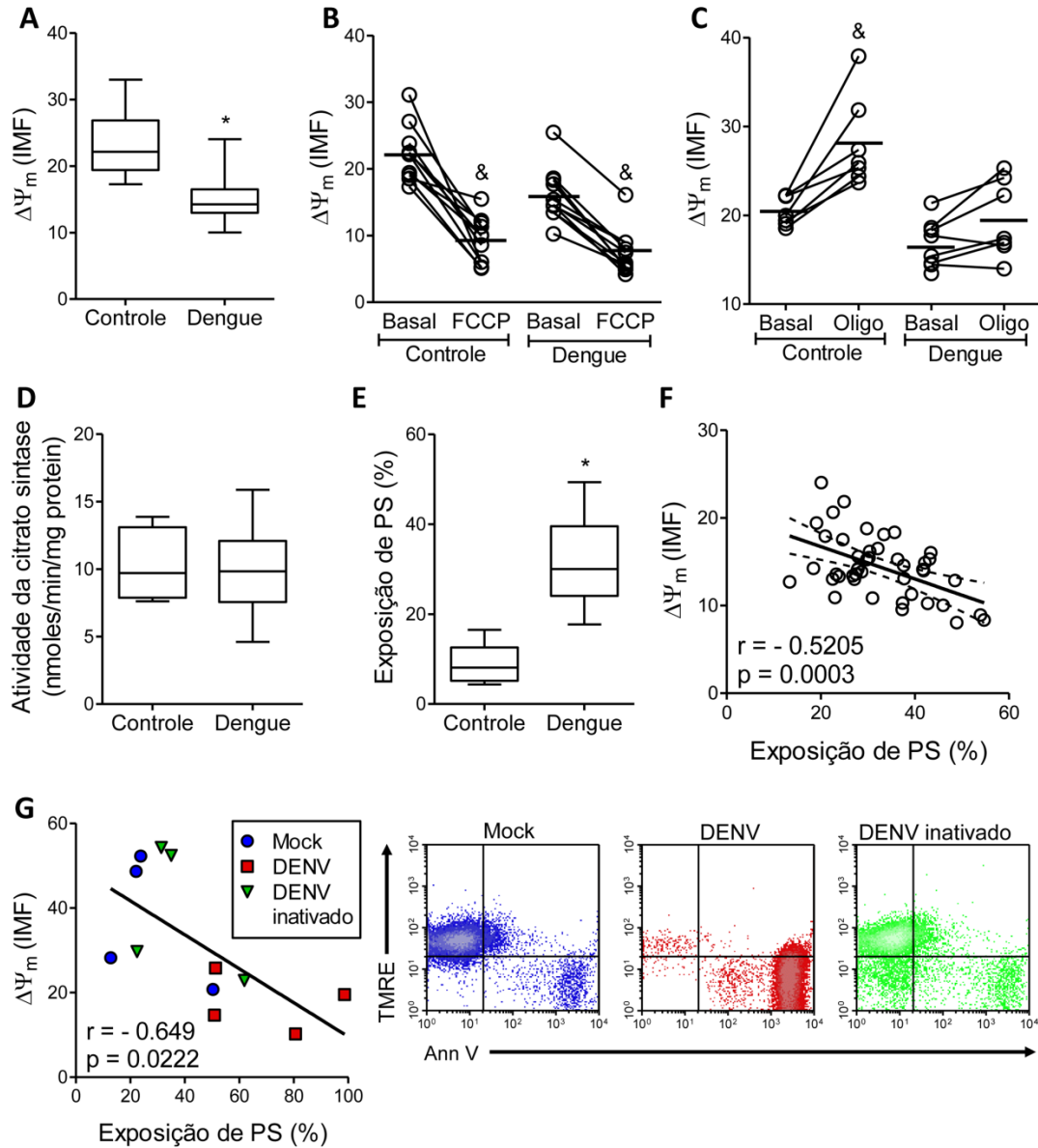


Figura 4.18: Dengue induz disfunção mitocondrial e exposição de fosfatidilserina em plaquetas. (A-C) O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em plaquetas isoladas de voluntários saudáveis (Controle, $n = 31$) ou de pacientes com dengue (Dengue, $n = 39$) indicado pela intensidade média de fluorescência (IMF) da sonda TMRE. (A) O gráfico mostra mediana, interquartis e 5-95 percentis. (B-C) Cada ponto representa plaquetas de um controle ou paciente antes (basal) ou após tratamento com (B) FCCP ou (C) oligomicina (Oligo). As linhas horizontais indicam médias. (D-E) A atividade da citrato sintase indicada pela formação de CoA-TNB2 (D), e a exposição de fosfatidilserina (PS) indicada pela ligação da Anexina V-FITC (E) em plaquetas Controle ($n = 10$) ou Dengue ($n = 36$). (F) A exposição de fosfatidilserina em plaquetas de pacientes com dengue foi plotada contra o $\Delta\Psi_m$. Regressão linear foi traçada de acordo com a distribuição dos pontos. (G) Plaquetas foram expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado e marcadas com TMRE e Anexina V-FITC. *Density plots* representativos mostram o $\Delta\Psi_m$ e a exposição de fosfatidilserina em cada condição.

Para avaliar mais profundamente a ativação da via intrínseca de apoptose em plaquetas de pacientes com dengue, nós avaliamos a presença de caspase-9 e caspase-3 ativadas. A ativação de caspase-9 em plaquetas foi significativamente maior em pacientes com dengue ($15,8 \pm 3,5$) quando comparados com voluntários saudáveis ($8,5 \pm 1,7$) (Figura 4.19A). Níveis aumentados das caspase-9 e caspase-3 clivadas (ativadas) também foram observados em plaquetas de pacientes com dengue por *western blot* (Figura 4.19B). Plaquetas expostas ao DENV-2 *in vitro* também apresentaram aumento na ativação de caspase-9 em relação ao Mock (DENV-2 infectante, $50,4 \pm 11,5$ versus $28,6 \pm 12,3$ ou $29,0 \pm 5,6$ para DENV-2 inativado ou Mock, respectivamente) (Figura 4.19C). Associados aos dados de disfunção mitocondrial, estes resultados indicam que o DENV induz a ativação da cascata de caspases apoptóticas pela via intrínseca em plaquetas.

A exposição de fosfatidilserina ocorre tanto durante o processo de ativação plaquetária quanto de apoptose (Leytin et al, 2008). Para investigar a proporção de fosfatidilserina exposta de modo dependente da ativação ou apoptose plaquetária, plaquetas foram incubadas com o DENV na presença do inibidor pan de caspases ZVAD-fmk. O bloqueio da atividade de caspases não afetou a expressão de P-selectina em plaquetas expostas ao DENV (Figura 4.19D), mas reduziu significativamente a exposição de fosfatidilserina (Figura 4.19E). Estes dados demonstram que a exposição de fosfatidilserina em resposta ao DENV-2 depende principalmente da ativação das vias de apoptose, sendo apenas em menor proporção dependente da ativação plaquetária.

Uma análise cinética em concentrados de plaquetas para transfusão demonstra que as plaquetas se tornam gradativamente ativadas durante a estocagem e, somente após atingirem níveis máximos de ativação, iniciam o processo de morte por apoptose (Leytin et al, 2008). No intuito de investigar se a apoptose em plaquetas expostas ao DENV *in vitro* ocorre em consequência da ativação plaquetária, nós avaliamos a cinética da exposição de fosfatidilserina em plaquetas incubadas com DENV-2. A exposição de fosfatidilserina em plaquetas expostas ao DENV-2 *in vitro* (Figura 4.19F) apresentou uma cinética semelhante à expressão de P-selectina (Figura 4.2A), indicando que plaquetas se tornam apoptóticas por uma ação direta do DENV, e não por efeito secundário à ativação plaquetária induzida pelo vírus.

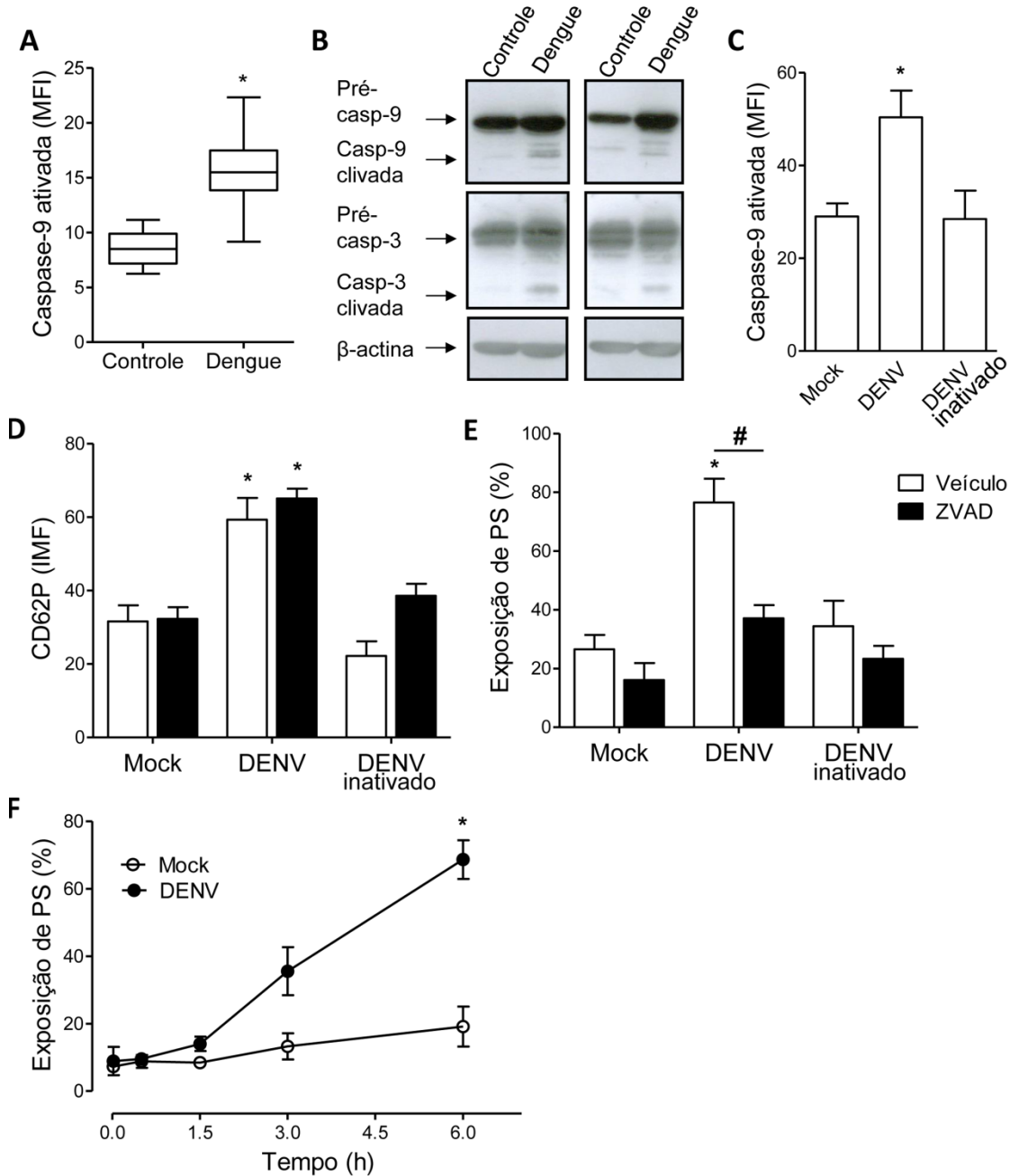


Figura 4.19: **Dengue induz ativação de caspases e apoptose em plaquetas.** (A) A intensidade média de fluorescência (IMF) da sonda FLICA indicando a ativação de caspase-9 em plaquetas de voluntários saudáveis (Controle, n = 6) ou de pacientes com dengue (Dengue, n = 17). O gráfico mostra mediana, interquartis e 5-95 percentis. (B) *Western blot* para caspase-3, caspase-9 e β-actina em plaquetas controle ou dengue. (C-F) Plaquetas foram expostas ao Mock, DENV ou DENV inativado por aquecimento na presença ou ausência do inibidor caspases ZVAD ou DMSO (Veículo) por 6 horas ou o tempo indicado no gráfico. A ativação de caspase-9 (C), a expressão de P-selectina (D), e a exposição de fosfatidilserina (PS) (E-F) foram avaliados em cada condição. Os gráficos mostram média ± erro padrão da média de 4 experimentos. * significa p<0,05 em relação ao controle ou mock; # indica p<0,05 entre ZVAD e veículo.

4.3.3 Associação da disfunção mitocondrial e apoptose plaquetária com plaquetopenia em pacientes com dengue.

Considerando que a apoptose plaquetária é um dos principais mecanismos de retirada de plaquetas da circulação (Mason et al, 2007; Maugeri et al, 2009), a ativação da via intrínseca de apoptose em plaquetas de pacientes com dengue poderia contribuir para o desfecho de plaquetopenia. Consistente com esta hipótese, nós observamos que a contagem de plaquetas dos pacientes com dengue se correlacionou negativamente com a exposição de fosfatidilserina ($r = -0,485$, $p = 0,0007$) e positivamente com o $\Delta\Psi_m$ ($r = 0,4612$, $p < 0,001$) de plaquetas isoladas no mesmo dia em que a plaquetometria foi realizada.

4.3.4 Plaquetas apoptóticas induzem secreção de IL-10 em monócitos de modo dependente da expressão de P-selectina e da exposição de fosfatidilserina

Para determinar a contribuição do reconhecimento de plaquetas apoptóticas na modulação da secreção de citocinas por agregados plaqueta-monócito, nós avaliamos a secreção de IL-8 e IL-10 em monócitos expostos a plaquetas ativadas ou a plaquetas ativadas e apoptóticas. A ativação e a apoptose foram induzidas estimulando plaquetas com agonistas específicos como previamente descrito (Jobe et al, 2008). De modo similar ao descrito por Jobe e colaboradores (2008), plaquetas estimuladas com trombina ou convulxina sozinhas se tornaram ativadas, mas não apoptóticas. No entanto, plaquetas estimuladas com trombina e convulxina simultaneamente se tornaram ativadas e apoptóticas como demonstrado pela expressão de P-selectina, exposição de fosfatidilserina e colapso do $\Delta\Psi_m$ (Figura 4.20A). Como mostra a Figura 4.20B, monócitos incubados (8 h, 37° C) com plaquetas ativadas por trombina secretaram IL-8, mas não IL-10. A exposição de monócitos a plaquetas estimuladas com trombina mais convulxina, por outro lado, induz a secreção tanto de IL-8 quanto de IL-10. De modo importante, os agonistas sozinhos não induziram secreção significativa de citocinas nos monócitos ou nas plaquetas.

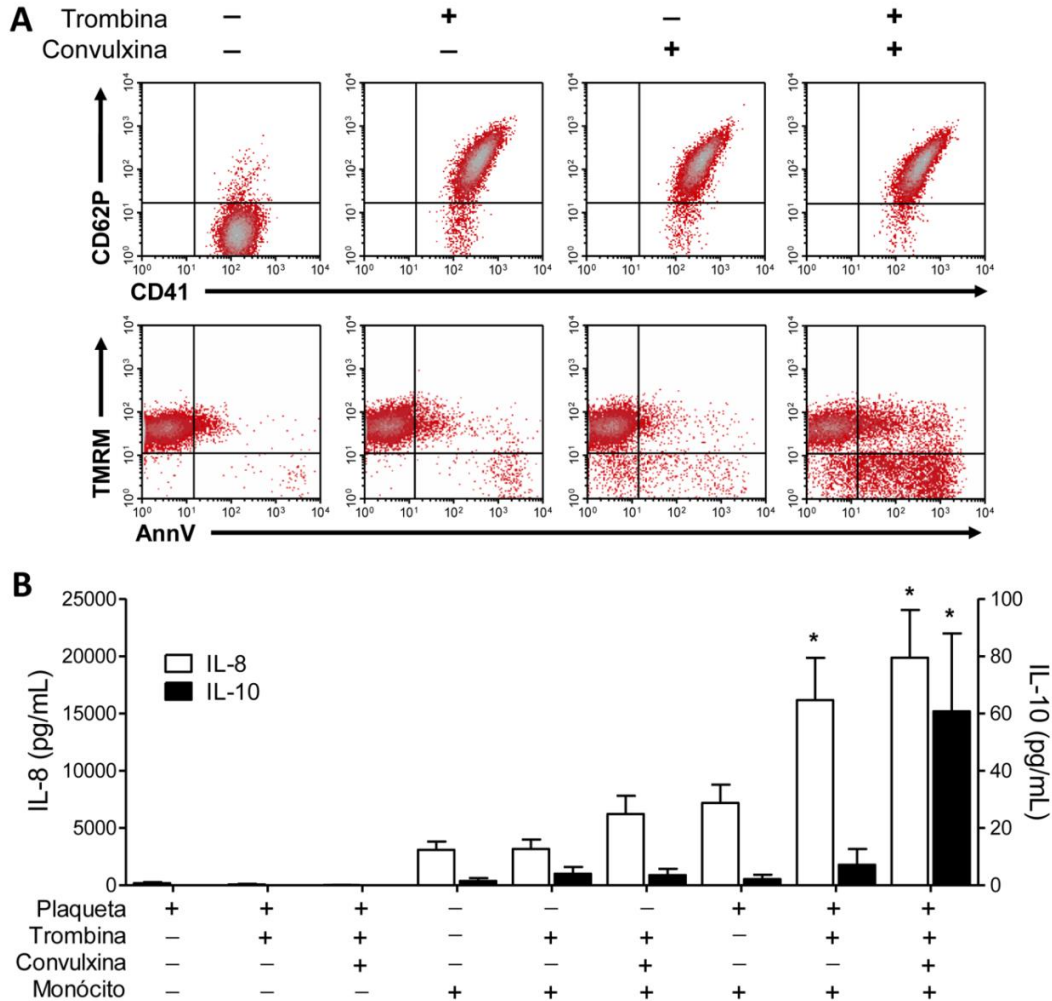


Figura 4.20: Plaquetas apoptóticas induzem secreção de IL-10 em agregados plaqueta-monócito. (A) *Density plots* representativos mostrando a expressão de P-selectina, o $\Delta\psi_m$ e a exposição de fosfatidilserina em plaquetas ativadas com trombina, convulxina ou trombina mais convulxina. (B) Monócitos foram incubados com plaquetas quiescentes, ativadas com trombina ou ativadas com trombina mais convulxina. Os níveis de IL-8 e IL-10 no sobrenadante de plaquetas e monócitos mantidos em cada condição são mostrados. Barras representam médias \pm erro padrão da média de 6 experimentos independentes. * significa $p < 0,05$ em relação a monócitos incubados com plaquetas quiescentes.

Para melhor entender os mecanismos pelos quais os monócitos secretam IL-8 e IL-10 em resposta a plaquetas apoptóticas e/ou ativadas, monócitos foram expostos a plaquetas na presença de anticorpos neutralizantes contra P-selectina ou contra fosfatidilserina. Como previamente descrito (Weyrich et al, 1996), o bloqueio da P-selectina inibiu a secreção de IL-8 em monócitos expostos a plaquetas ativadas, tanto quando estimuladas apenas com trombina quanto com trombina mais convulxina (Figura 4.21A). De modo interessante, a

secreção de IL-10 em monócitos expostos a plaquetas estimuladas com trombina e convulxina também foi dependente de P-selectina (Figura 4.21B). A secreção de IL-8 nos agregados plaqueta-monócito não foi afetada pela presença de anticorpos anti-fosfatidilserina (Figura 4.21C). No entanto, o bloqueio da fosfatidilserina em plaquetas apoptóticas reduziu significativamente a secreção de IL-10 em monócitos expostos a plaquetas estimuladas com trombina mais convulxina (Figura 4.21D). Juntos, estes dados indicam que a secreção de IL-10 em agregados plaqueta-monócito dependem tanto da adesão de plaquetas aos monócitos mediada pela P-selectina quanto do reconhecimento da fosfatidilserina em plaquetas apoptóticas.

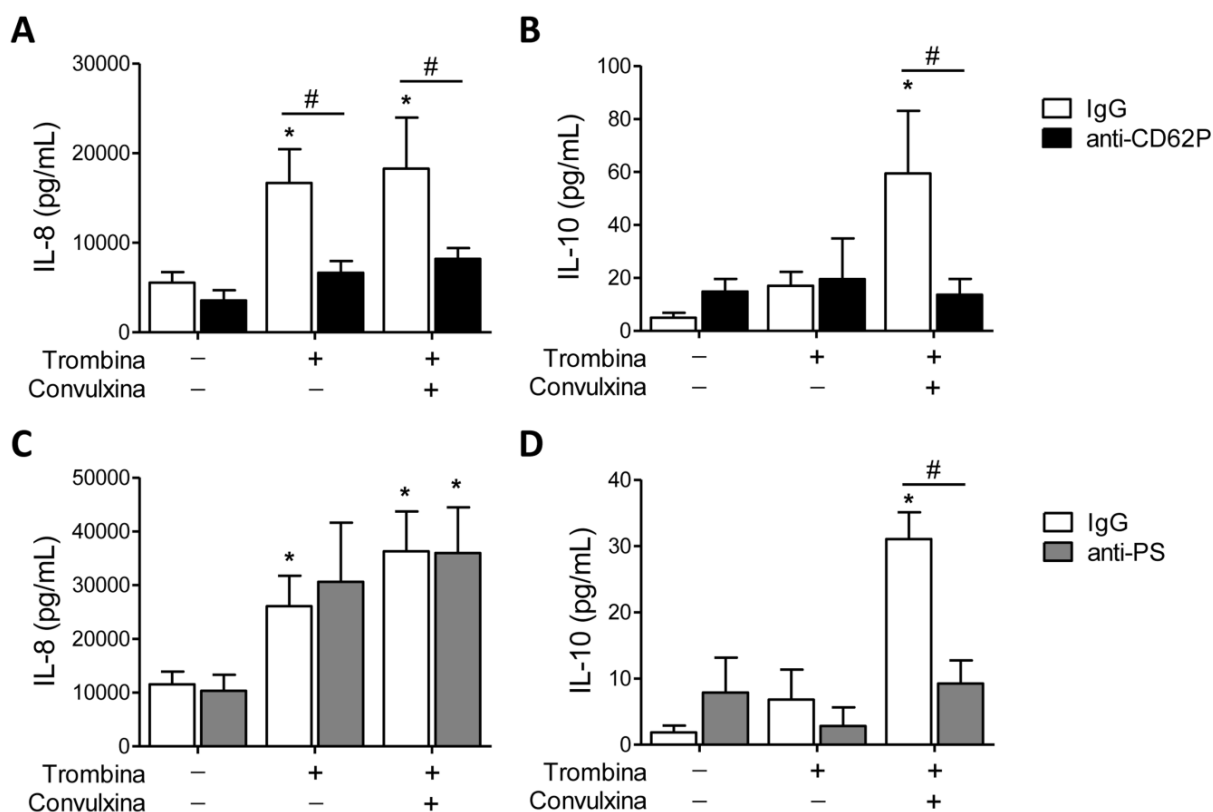


Figura 4.21: Reconhecimento de fosfatidilserina modula secreção de IL-10 em agregados plaqueta-monócito. Monócitos foram incubados com plaquetas quiescentes, ativadas com trombina ou ativadas com trombina mais convulxina na presença ou ausência de anticorpos neutralizantes contra CD62P ou fosfatidilserina (PS). Os níveis de IL-8 (A e C) e IL-10 (B e D) no sobrenadante de plaquetas e monócitos mantidos em cada condição são mostrados. Barras representam médias \pm erro padrão da média de 4-6 experimentos independentes. * significa $p < 0,05$ em relação a monócitos incubados com plaquetas quiescentes; # indica $p < 0,05$ entre IgG e anti-CD62P ou anti-PS.

4.3.5 O reconhecimento da fosfatidilserina é suficiente para a secreção de IL-10 por monócitos

Além de atividades imunomoduladoras, o reconhecimento da fosfatidilserina é o principal sinal para a fagocitose de corpos apoptóticos por células mononucleares. Durante a interação plaqueta-monócito *in vitro*, os níveis de fagocitose de plaquetas foram mais elevados em monócitos que interagiram com plaquetas estimuladas com trombina mais convulxina em comparação a plaquetas não estimuladas (Figura 4.22A e B). De modo importante, o pré-tratamento das plaquetas com anticorpos contra a P-selectina ou contra fosfatidilserina reduziram significativamente a fagocitose de plaquetas apoptóticas (Figura 4.22A e B). Para melhor compreender se a fagocitose de plaquetas é requerida para a síntese de IL-10, os monócitos foram pré-tratados (30 min) com os inibidores da polimerização de actina Citocalasina D (10 µg/mL) e citocalasina B (10 µg/mL) que significativamente afeta a fagocitose de plaquetas apoptóticas (Figura 4.22 A e C). De modo interessante, a fagocitose de plaquetas não foi requerida para a secreção de IL-8 nem de IL10. (Figura 4.22 D e E).

Para investigar se a sinalização sinérgica da P-selectina e fosfatidilserina é requerida para a secreção de IL-10, nós plaqueamos monócitos em superfícies cobertas com P-selectina, fosfatidilserina ou P-selectina mais fosfatidilserina. Nós observamos o aumento da adesão de monócitos em placas cobertas com P-selectina e/ou fosfatidilserina em comparação com albumina de soro humano (HSA) (Figura 4.23 A e B). Monócitos plaqueados sobre P-selectina e/ou fosfatidilserina também secretaram níveis mais elevados de IL-8 em relação a HSA (Figura 4.23 C). A secreção de IL-10, no entanto, foi preferencialmente observada em monócitos aderidos a fosfatidilserina, independente da presença concomitante de P-selectina (Figura 4.23 D). Estes resultados sugerem que o reconhecimento da fosfatidilserina é suficiente para a indução da secreção de IL-10 pelos monócitos, não sendo necessários a fagocitose da plaqueta apoptótica ou o sinal sinérgico da P-selectina com a fosfatidilserina.

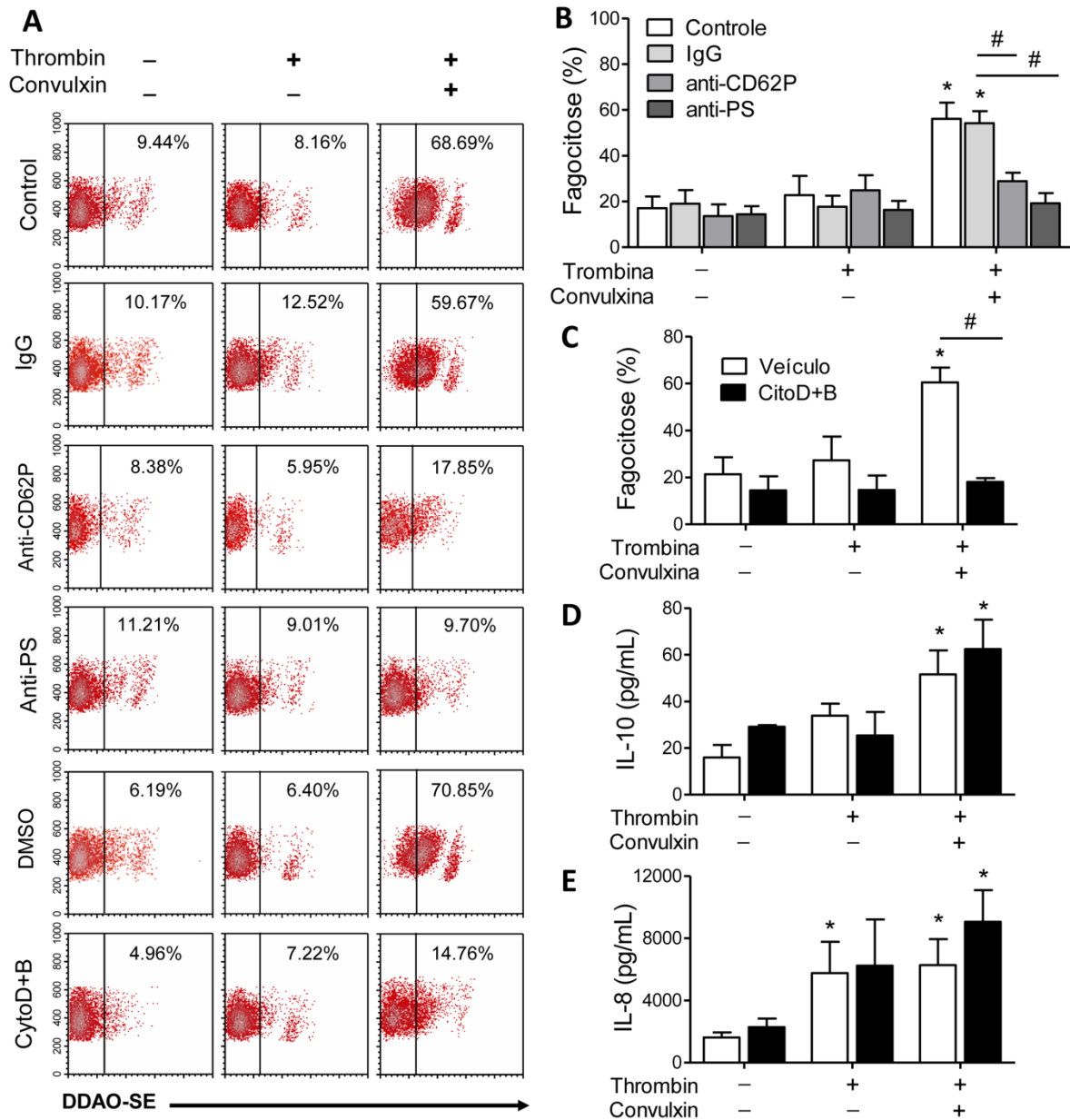


Figura 4.22: A fagocitose de plaquetas apoptóticas depende do reconhecimento de fosfatidilserina (PS) mas é dispensável para a secreção de IL-10. (A-C) O percentual de monócitos fagocitando plaquetas quiescentes ou estimuladas com trombina ou trombina mais convulxina na presença ou ausência de (B) anti-CD62P, anti-PS, ou (C) citocalasina D mais citocalasina B (CitoD+B) ou veículo (DMSO). (D-E) Concentração de IL-10 (D) e IL-8 (E) no sobrenadante de monócitos tratados com CitoD+B. O painel A mostra *density plots* representativos de 4 experimentos independentes. Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes. * significa $p < 0,05$ em relação a plaquetas quiescentes; # indica $p < 0,05$ comparado com IgG ou veículo (DMSO).

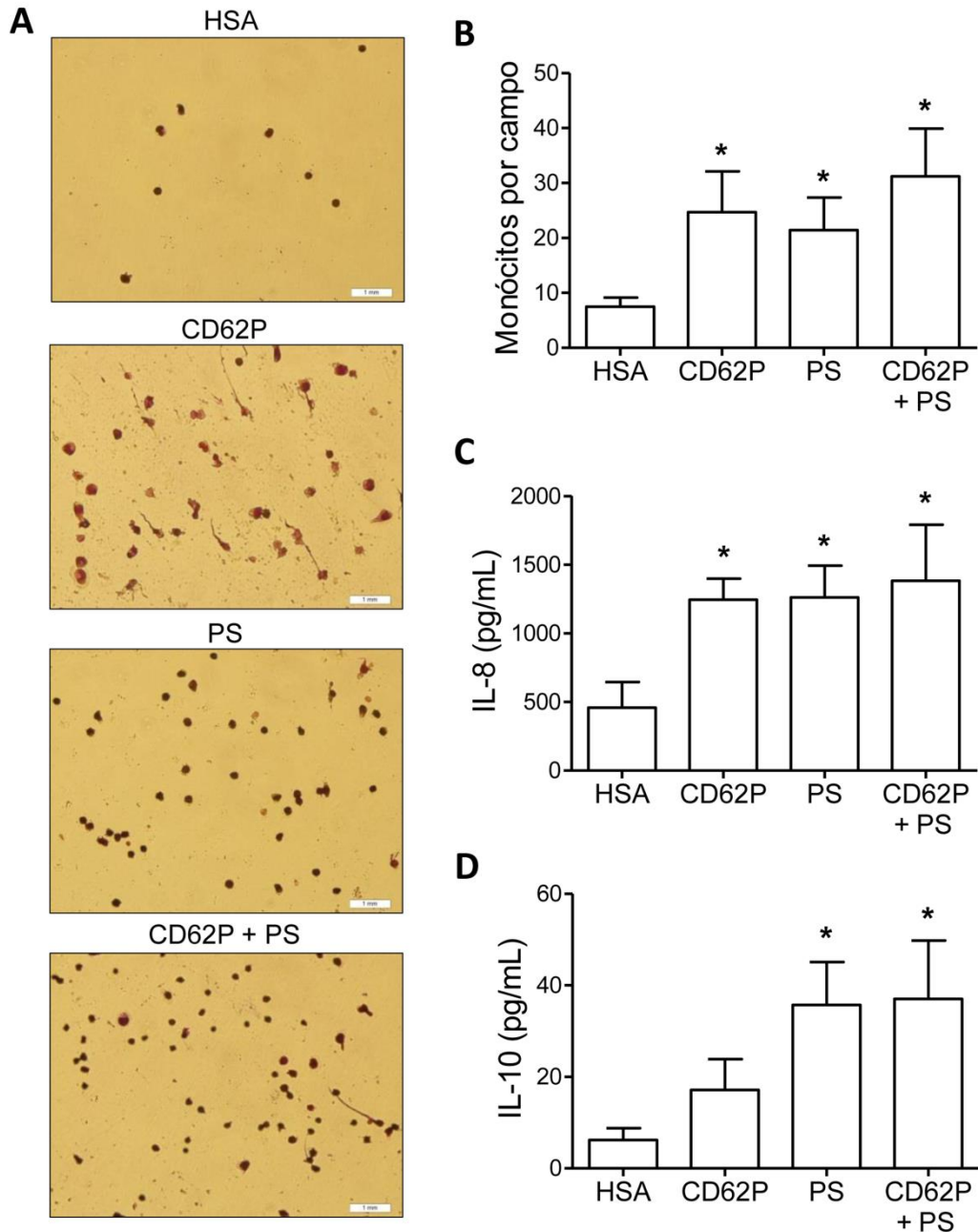


Figura 4.23: A adesão à fosfatidilserina (PS) induz secreção de IL-10 em monócitos independentemente da presença de P-selectina (CD62P). (A-B) Adesão de monócitos sobre placas cobertas com albumina de soro humano (HSA), CD62P, PS, ou CD62P + PS. (C-D) Concentrações de IL-8 (C) e IL-10 (D) no sobrenadante de monócitos aderidos a cada substrato. O painel A mostra imagens representativas de 4 experimentos independentes. Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes. * significa $p < 0,05$ em relação a placas cobertas com HSA.

4.4 Receptores na ativação plaquetária induzida pelo DENV

Tendo em vista que a ativação plaquetária contribui significativamente para os eventos inflamatórios envolvidos na patogênese da dengue, e que o DENV pode ativar diretamente plaquetas, a compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação plaquetária induzida pelo DENV é de suma importância para a identificação de possíveis alvos terapêuticos. Nesse contexto, os receptores que intermedeiam a interação do DENV com plaquetas são alvos interessantes. Nós bloqueamos alguns dos receptores possivelmente envolvidos com a ligação do DENV a plaquetas e avaliamos se o DENV conserva a capacidade de ativar as plaquetas diretamente.

4.4.1 DENV-2 ativa plaquetas por vias que envolvem DC-SIGN

Diversos receptores têm sido descritos para a ligação do DENV a diferentes tipos celulares. Entre eles o DC-SIGN em células dendríticas, a integrina $\alpha_V\beta_3$, em células endoteliais, e as moléculas CD14, TIM e TAM em monócitos e macrófagos, entre outros (Tassaneeritthep et al, 2003; Mukhopadhyay et al, 2005; Zhang et al, 2007; Meertens et al, 2012). Apesar do DC-SIGN e a integrina $\alpha_V\beta_3$ estarem presentes em plaquetas (Paul et al, 2003; Boukour et al, 2006; Flaujac et al, 2010), a participação destes receptores na ativação plaquetária induzida pelo DENV não foi ainda investigada. Para acessar o envolvimento destes receptores na ativação plaquetária induzida pelo DENV, plaquetas foram incubadas com anticorpos contra DC-SIGN ou contra a subunidade α_V da integrina $\alpha_V\beta_3$ antes de serem expostas ao DENV-2. O bloqueio de DC-SIGN, mas não da integrina α_V , preveniu o aumento na expressão de P-selectina em plaquetas expostas ao DENV (Figura 4.24A). O colapso do $\Delta\Psi_m$ induzido pelo DENV-2 também foi inibido pelo bloqueio de DC-SIGN, mas não da integrina α_V (Figura 4.24B).

De modo importante, o tratamento com anti-integrina α_V inibiu a adesão de plaquetas em placas cobertas com osteopontina (Figura 4.24C), substrato para o qual a adesão de plaquetas é mediada pela integrina $\alpha_V\beta_3$, demonstrando a eficácia do anticorpo contra a subunidade α_V em bloquear a integrina $\alpha_V\beta_3$ completa, e confirmando que a ligação a este receptor não está envolvida na ativação plaquetária induzida pelo DENV.

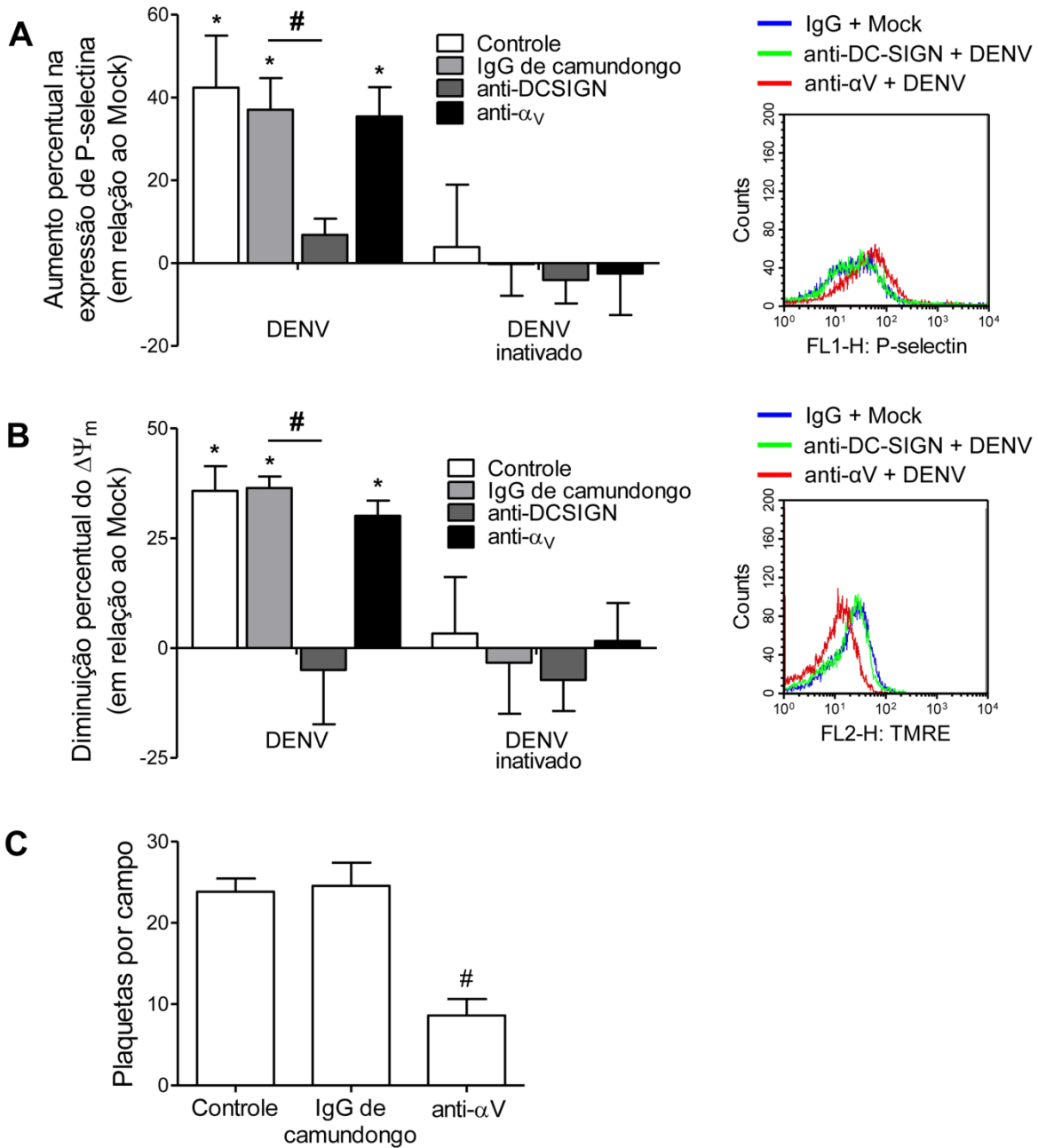


Figura 4.24: DENV-2 ativa plaquetas por mecanismos que envolvem DCSIGN. Plaquetas foram expostas ao Mock, DENV-2 ou o DENV inativado por aquecimento na presença ou ausência de anticorpos neutralizantes anti-DC-SIGN ou anti-integrina α_V . (A) O aumento percentual na intensidade média de fluorescência (IMF) para P-selecina, e (B) a diminuição percentual na IMF para TMRE. (C) Adesão de plaquetas sobre placas cobertas com osteopontina humana na ausência ou na presença de anti-integrina α_V ou controle de isotipo (IgG). Histogramas representativos mostram a expressão de P-selectina (A) e o $\Delta\Psi_m$ (B). Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes. * significa $p < 0,05$ comparado ao Mock; # significa $p < 0,05$ comparado ao controle de isotipo (IgG).

Para esclarecer a relação entre expressão de DC-SIGN em plaquetas e a ativação plaquetária induzida pelo DENV, nós analisamos a expressão de P-selectina em plaquetas marcadas para DC-SIGN. Em média, $21,4 \pm 8,5\%$ das plaquetas foram positivas para DC-SIGN (Figura 4.25A). A exposição de plaquetas ao DENV não afetou a expressão de DC-SIGN na superfície das plaquetas (Figura 4.25B). No entanto, como mostra a Figura 4.25C, plaquetas que foram positivas para DC-SIGN ($CD41^+DC-SIGN^+$) exibiram maior expressão de P-selectina em relação às plaquetas negativas para DC-SIGN ($CD41^+DC-SIGN^-$) ($51,8 \pm 14,6$ para $DC-SIGN^+$ versus $31,4 \pm 3,2$ para $DC-SIGN^-$, $p = 0.0398$).

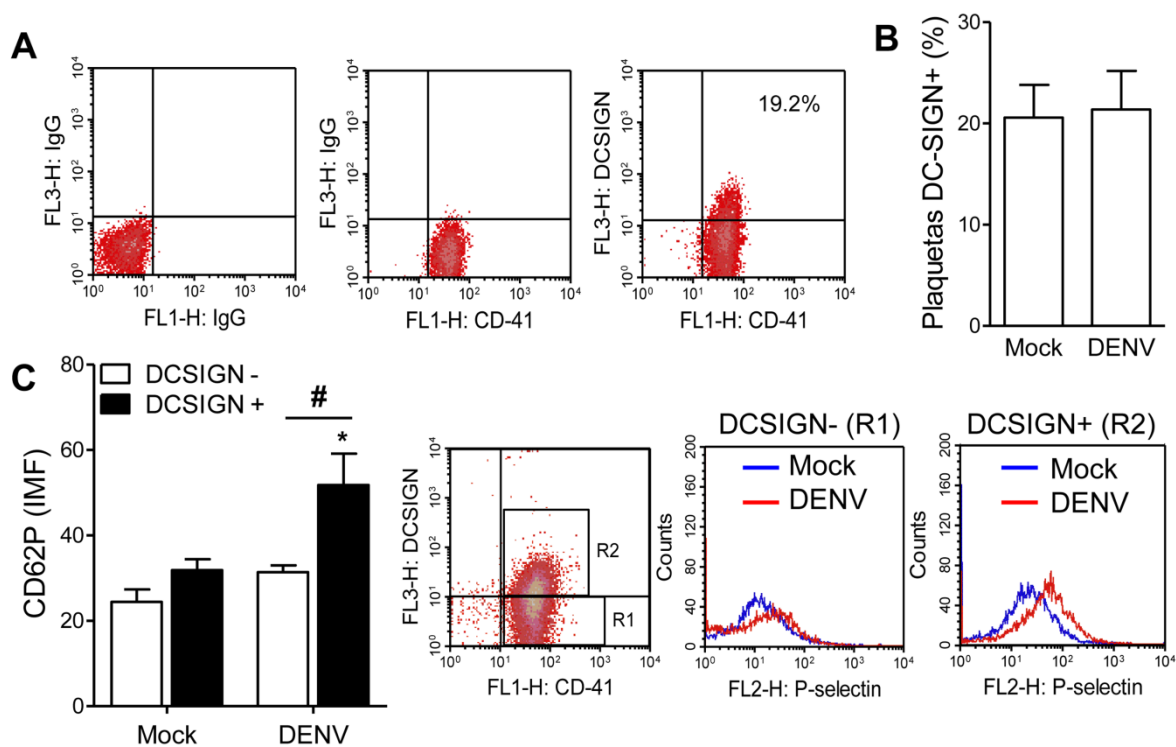


Figura 4.25: Ativação plaquetária induzida pelo DENV-2 correlaciona com a expressão de DC-SIGN. (A) *Density plots* representativos mostrando o percentual (%) de plaquetas expressando DC-SIGN. (B) Expressão de DC-SIGN em plaquetas expostas ao Mock ou DENV-2. (C) A intensidade média de fluorescência (IMF) para P-selectina em plaquetas negativas (DC-SIGN- (R1)) ou positivas (DCSIGN+ (R2)) para DC-SIGN. Histogramas representativos mostram a expressão de P-selectina (C). Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes com doadores saudáveis diferentes. * significa $p < 0,05$ comparado ao Mock; # significa $p < 0,05$ entre plaquetas CDSIGN- e DCSIGN+.

5. Discussão

Plaquetopenia e alterações de permeabilidade vascular são as principais alterações clínicas na infecção pelo DENV, sendo consideradas marcadores importantes da progressão para as formas graves. Embora os mecanismos patogênicos responsáveis por tais desfechos não sejam totalmente compreendidos, nossos resultados mostram que a ativação e a apoptose plaquetária podem contribuir para ambos ao acelerar a depuração das plaquetas e ao modular respostas inflamatórias mediante secreção de citocinas e interações com monócitos. Nós observamos que plaquetas ativadas durante a dengue secretam diversos fatores pró-inflamatórios, inclusive micropartículas carregadas com IL-1 β , cuja secreção é mediada pela ativação do inflamassoma NLRP3. Nossos dados também implicam a interação de plaquetas ativadas e apoptóticas com monócitos como um dos fatores de modulação da resposta imune e inflamatória durante a dengue.

Nós observamos, de modo consistente, que plaquetas se tornam ativadas durante a infecção pelo DENV. Este resultado foi reprodutível em três diferentes epidemias com a circulação de diferentes sorotipos do DENV (DENV-1, -2 e -4). Nós também observamos a indução de ativação em plaquetas diretamente expostas ao DENV-2 *in vitro*. Estudos anteriores demonstraram a ativação *in vitro* de plaquetas expostas ao DENV ou à células endoteliais infectadas (Krishnamurti et al, 2002; Ghosh et al, 2008). Outro estudo recentemente mencionou ativação plaquetária em 19 pacientes com infecção secundária pelo DENV (Alonzo et al, 2012). No entanto, as consequências clínicas da ativação plaquetária e sua participação na patogênese da dengue permaneciam pouco exploradas. No presente estudo a expressão de P-selectina em plaquetas de pacientes com dengue foi consistentemente associada com sinais clínicos e laboratoriais de progressão da doença. Nós observamos uma correlação significativa da expressão de P-selectina em plaquetas com os valores de plaquetometria, hematócrito e albuminemia (Tabela 4.1), enquanto pacientes trombocitopênicos, com sinais clínicos de permeabilidade vascular aumentada, ou com manifestações hemorrágicas mostraram níveis mais elevados de ativação plaquetária (Figura 4.3). De modo importante, a ativação plaquetária foi fortemente associada com a gravidade da dengue de acordo com a classificação de casos da OMS (2009) (Figura 4.3).

5.1 Ativação plaquetária e secreção de citocinas na dengue

A patogênese da dengue ainda não é completamente entendida, no entanto, cada vez mais evidências suportam a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias como evento central para o extravasamento de plasma, hemoconcentração, coagulopatia e choque em pacientes com dengue (Suharti et al, 2002; Pang et al, 2007; Bozza et al, 2008; van de Weg et al, 2013; Yeh et al, 2013). Neste trabalho, nós demonstramos que a ativação de plaquetas durante a infecção pelo DENV pode contribuir para alterações do perfil de citocinas circulantes nos pacientes de dois modos: 1) a partir da secreção de fatores estocados em grânulos (IL-8, MIF, RANTES, MIP-1 α , FGF- β , PDGF e VEGF) e sintetizados *de novo* (IL-1 β); e 2) A partir da agregação com monócitos e modulação das respostas de ativação celular com secreção das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-10 e MCP-1. Alterações dos níveis destas citocinas têm sido amplamente descritas durante a dengue em humanos e em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*.

No que diz respeito aos níveis séricos destas citocinas em pacientes com dengue, muitas vezes resultados contraditórios são observados entre um estudo e outro. As citocinas IL-1 β , RANTES, FGF- β e VEGF, por exemplo, têm sido descritas tanto como aumentadas (Bozza et al, 2008; Rathakrishnan et al, 2012; Kumar et al, 2012; Furuta et al, 2012) quanto como reduzidas (Seet et al, 2009; de-Oliveira-Pinto et al, 2012a; Butthep et al, 2012; Rathakrishnan et al, 2012; van de Weg et al, 2013) em pacientes com dengue. De modo similar, níveis mais elevados de IL-1 β e VEGF, frequentemente descritos em associação com a dengue grave ou FHD (Suharti et al, 2002; Jaiyen et al, 2009; Bozza et al, 2008; Furuta et al, 2012), foram associados com a dengue branda em outro estudo (Kumar et al, 2012). No presente trabalho, nós demonstramos que a ativação plaquetária, que é mais intensa nos pacientes com dengue grave, modula positivamente a secreção destas citocinas, corroborando assim com o aumento de seus níveis em pacientes com dengue grave. Devemos considerar, contudo, que os níveis séricos das citocinas dependem de condições complexas que envolvem a secreção por diferentes tipos celulares, autorregulação das vias de secreção, e a circulação de antagonistas como o IL-1Ra e o sVEGFR-1, que também estão aumentados em pacientes com dengue (Suharti et al, 2002; Seet et al, 2009; Rathakrishnan et al, 2012; Furuta et al, 2012; de-Oliveira-Pinto et al, 2012b).

A secreção dos fatores estocados em grânulos plaquetários ocorre de modo organizado, variando em quantidade, qualidade e cinética de acordo com o tipo e a intensidade do estímulo aplicado (Berthet et al, 2012; Panzer, 2013; Jonnalagadda et al, 2012). No presente estudo, a degranulação das plaquetas estimuladas com o DENV-2 apresentou uma cinética distinta das plaquetas estimuladas com trombina (Figura 4.2A). Nossos dados sugerem que a ativação plaquetária induzida pelo DENV sinaliza para um perfil específico de secreção granular. A secreção da citocina GM-CSF, por exemplo, parece ocorrer espontaneamente em plaquetas mantidas em cultura (Raiden et al, 2003), mas foi negativamente regulada em plaquetas estimuladas com o DENV, enquanto o estímulo com trombina não afetou sua secreção (Figura 4.4 H). Em pacientes com dengue, os níveis séricos de GM-CSF estão aumentados nos casos de dengue grave (Bozza et al, 2008), sugerindo que sua secreção por outras fontes supere a redução de sua secreção por plaquetas. Nós também não excluimos que outros fatores presentes na infecção possam modular a desgranulação plaquetária, alterando o perfil dos fatores secretados *in vitro* observado em nosso estudo (Figura 4.4).

Níveis aumentados da citocina MIF têm sido descritos principalmente na dengue grave (Becquart et al, 2010; Yeh et al, 2013; Assunção-Miranda et al, 2010). A secreção de MIF está relacionada ao aumento de permeabilidade endotelial, alterações de coagulação e inflamação na dengue (Chuang et al, 2011; Yeh et al, 2013), sendo os níveis séricos mais elevados observados nos pacientes que evoluem para o óbito (Chen et al, 2006). Resultados recentes do nosso grupo identificam a citocina MIF como um dos principais indutores de permeabilidade endotelial entre os fatores presentes no plasma de pacientes com dengue (Lopes et al, dados não publicados). A secreção de MIF tem sido mostrada em macrófagos, hepatócitos e células endoteliais infectadas com o DENV (Chuang et al, 2011; Yen et al, 2013). No entanto, apenas recentemente a habilidade de plaquetas em secretar o MIF foi demonstrada (Strüßmann et al, 2013). Nossos resultados apontam as plaquetas como uma fonte até então não identificada de MIF durante a infecção pelo DENV.

Além do MIF, nós demonstramos que plaquetas estimuladas com o DENV-2 secretam MIP-1 α e RANTES. Camundongos *Knockout* para MIF ou para os receptores CCR2 e CCR4, que reconhecem as quimiocinas MIP-1 α e RANTES respectivamente, são protegidos da dengue grave e apresentam uma melhora significativa nas taxas de

sobrevivência. A ausência de MIF e CCR4, especificamente, promovem melhoras nas contagens de plaquetas e no hematócrito. Tanto o MIF quanto os receptores de MIP-1 α e RANTES parecem estar envolvidos na amplificação da resposta imune e inflamatória, visto que a ausência da citocina ou dos receptores reduziu significativamente os níveis de TNF- α , IL-6, KC e IFN- γ nos camundongos infectados (Assunção-Miranda et al, 2010; Guabiraba et al, 2010). Considerando que plaquetas estocam e secretam grandes quantidades de MIF, RANTES e MIP-1 α , a secreção destas citocinas por plaquetas ativadas pelo DENV parece ser um importante mecanismo patogênico na dengue.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem o acúmulo de IL-8 em grânulos plaquetários e sua secreção mediante estímulo por trombina (Su et al, 1996; Jonnalagadda et al, 2012), dados mostrando a secreção de IL-8 por plaquetas devem ser cuidadosamente interpretados, uma vez que contaminações com leucócitos, mesmo que muito baixas, podem contribuir significativamente para os níveis de IL-8 observados. Em nosso estudo, por exemplo, a ativação plaquetária por trombina não induziu secreção de IL-8 após 15 minutos de estímulo (Figura 4.4C) ou em plaquetas mantidas em cultura por 8 horas após o estímulo (Figura 4.20B). A secreção de IL-8 também não foi observada em plaquetas de pacientes com dengue mantidas em cultura por 12 horas (Figura 4.17B). No entanto, níveis aumentados de IL-8 foram observados quando plaquetas foram expostas ao DENV por 6 horas *in vitro* (Figura 4.4C). Não é possível afirmar se a exposição ao DENV é um estímulo mais potente que a trombina para a secreção de IL-8 em plaquetas ou se uma possível contaminação por leucócitos contribuiu para o resultado observado. Porém, nosso estudo ainda suporta a ativação plaquetária como um mediador da secreção de IL-8 na dengue, uma vez que monócitos secretam níveis elevados de IL-8 em resposta à adesão de plaquetas ativadas isoladas de pacientes com dengue (Figura 4.17B).

Em nosso estudo, a interação de monócitos com plaquetas de pacientes com dengue modulou a secreção de IL-1 β , IL-8, IL-10 e MCP-1. Os níveis destas mesmas citocinas foram associados com plaquetopenia em pacientes com dengue em estudos anteriores do nosso grupo e de outros (Azeredo et al, 2001; Bozza et al, 2008; Priyadarshini et al, 2010). Estas associações estão de acordo com a formação de agregados plaqueta-monócito como um mecanismo para ambos, secreção de citocinas e plaquetopenia, como sugerido pela correlação entre agregados plaqueta-monócito e contagem de plaquetas no presente

trabalho (Figura 4.14 A e C). A formação de gregados plaqueta-monócito também se correlaciona com sinais clínicos de permeabilidade vascular aumentada nos pacientes com dengue (Figura 4.14 B e D). O efeito sobre o endotélio das citocinas secretadas em resposta a interação plaqueta-monócito potencialmente explicam esta associação. As citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP-1 possuem uma participação importante em modelos *in vitro* de permeabilidade induzida pelo DENV (Talavera et al, 2004; Lee et al, 2006; Wu et al, 2013) e a IL-1 β tem sido ligada a hipotensão e hemoconcentração na infecção aguda pelo DENV (Bozza et al, 2008). IL-1 β e IL-8 em pacientes com dengue também estão associadas com alterações hemostáticas e presença de manifestações hemorrágicas (Suharti et al, 2002; van de Weg et al, 2013). De modo interessante, plaquetas ativadas contribuem para os níveis de IL-1 β tanto a secretando diretamente, quanto modulando sua secreção por monócitos.

5.2 A síntese e secreção de IL-1 β e a descrição do inflamassoma NLRP3 em plaquetas

Como mencionado acima, a IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória importante na infecção pelo DENV (Suharti et al, 2002; Bozza et al, 2008; Jaiyen et al, 2009) seus níveis se correlacionam com alterações de permeabilidade (Bozza et al, 2008; Houghton-Triviño et al, 2010), trombose e hemostasia descompensada (Suharti et al, 2002). Aqui nós demonstramos a marcação intracelular para IL-1 β em plaquetas e MPs derivadas de plaquetas de pacientes com dengue. Nós também demonstramos que a IL-1 β em MPs de plaquetas ativadas pelo DENV induz alterações de permeabilidade em células endoteliais *in vitro*, reforçando a importância desta citocina para a vasculopatia associada a dengue. Nossos resultados apontam uma fonte celular ainda não identificada para a IL-1 β durante a dengue: as plaquetas.

A capacidade de plaquetas ativadas em processar o pré-RNA contendo *introns* e produzir o RNAm para IL-1 β foi anteriormente demonstrada *in vitro* (Denis et al, 2005; Shashkin et al, 2008; Brown e McIntyre, 2011; Brown et al, 2013). Recentemente, a síntese de IL-1 β por plaquetas foi também demonstrada em modelos *in vivo* (Aggrey et al, 2012; Brown et al, 2013). Em uma modelo murino de trombose, a IL-1 β é detectada em plaquetas agregadas em microvasos poucas horas após a formação de trombos (Brown et al, 2013). Kaplanski e colaboradores (1993) demonstraram que a IL-1 β expressa na membrana plasmática de plaquetas ativadas pode sinalizar células endoteliais de modo justácrino sem

que seja secretada em solução. Estes dados sugerem uma participação da IL-1 β em processos inflamatórios nos locais de agregação plaquetária, conectando resposta pró-coagulante e inflamação. Este fenômeno pode contribuir para os processos inflamatórios na microvasculatura de pacientes com dengue, uma vez que agregados de plaquetas na microvasculatura são observados em análises histológicas de casos de óbito por dengue (Boonpucknavig et al, 1979; Póvoa et al, 2014).

Enquanto a síntese de IL-1 β por plaquetas tem sido amplamente demonstrada (Denis et al, 2005; Shashkin et al, 2008; Brown e McIntyre, 2011; Brown et al, 2013), a presença de componentes do inflamassoma e sua montagem não havia sido mostrado em plaquetas até a publicação do presente trabalho (Hottz et al, 2013a – ANEXO II). Nós apresentamos evidências do recrutamento de ASC por NLRP3 em paralelo a ativação de caspase-1 em plaquetas de pacientes com dengue. Além disso, a secreção de IL-1 β induzida pelo DENV *in vitro* ocorre em plaquetas de modo dependente de caspase-1. Estes dados demonstram a presença do inflamassoma NLRP3 em plaquetas, e sua ativação na infecção pelo DENV. Embora a secreção de IL-1 β em resposta ao DENV é bastante reconhecida, apenas recentemente a ativação do inflamassoma NLRP3 foi demonstrada em macrófagos infectados pelo DENV *in vitro* (Wu et al, 2013), e agora em plaquetas tanto na infecção *in vitro* quanto em pacientes (Hottz et al, 2013a – ANEXO II).

Plaquetas de pacientes com dengue apresentam intensa geração de ROS de origem mitocondrial. Estudos com células mononucleares demonstram que a geração de ROS pela mitocôndria regula a ativação do inflamassoma NLRP3 (Zhou et al, 2011). Além disso, a sinalização dependente de RIP1/RIP3 foi recentemente demonstrada como promotora da produção de ROS mitocondriais em resposta a infecções virais e estímulos pró-inflamatórios (Cho et al, 2009; Vanlangenakker et al, 2011). Nossos dados *in vitro* indicam que as quinases da família RIP induzem a ativação do inflamassoma NLRP3 em plaquetas ao promover a geração de ROS na mitocôndria. Estes dados aliam a sinalização oxidante mitocondrial à secreção de IL-1 β em plaquetas.

Embora as vias envolvidas na ativação do processamento pós-transcricional e consequente síntese da IL-1 β foram anteriormente identificadas em plaquetas (Denis et al, 2005; Brown & McIntyre, 2011), pouco se sabe das vias que conectam a síntese de IL-1 β com seu processamento e secreção em MPs. Nossos dados evidenciam o requerimento do

inflamassoma NLRP3 para a secreção de MPs contendo IL-1 β em plaquetas. De modo similar, o inflamassoma NLRP3 é requerido para a secreção e de MPs contendo IL-1 β por monócitos estimulados com LPS. Neste mesmo estudo, além de MPs carregadas com IL-1 β , MPs carregadas com NLRP3, ASC e caspase-1 ativada foram mais frequentes em monócitos estimulados (Wang et al, 2011). Estes dados corroboram com os níveis aumentados de MPs positivas para NLRP3 observados em amostras de pacientes com dengue em nosso estudo (Figura 4.7B). É possível que MPs carreguem inflamassomas funcionais e o processamento da IL-1 β imatura continue ocorrendo em MPs mesmo após sua secreção. Considerando que MPs entregam proteínas para células alvo via fusão de membranas, MPs também poderiam entregar inflamassomas funcionais para células quiescentes, alterando a resposta inflamatória nestas células.

Além da fusão de membranas, MPs plaquetárias modulam respostas no endotélio vascular ao entregar citocinas para receptores nas células endoteliais. Brown e McIntyre (2011) demonstraram que a IL-1 β em MPs de plaquetas estimuladas por LPS induzem expressão de VCAM-1 em células endoteliais de modo dependente do IL-1R. MPs contendo IL-1 β derivadas de monócitos também ativam o IL-1R na superfície de células endoteliais (Wang et al, 2011). Os mecanismos pelos quais MPs contendo IL-1 β induzem ativação do IL-1R na célula alvo não são claros. É possível que a IL-1 β associada à membrana das MPs sinalize células endoteliais de modo justácrino assim como a IL-1 β expressa na membrana de plaquetas ativadas (Kaplanski et al, 1993). Mause e colaboradores (2005) demonstraram que MPs derivadas de plaquetas depositam RANTES sobre células endoteliais durante interações transientes. É possível que um processo similar também contribua para a entrega de IL-1 β ao endotélio. Nós observamos que MPs recuperadas de plaquetas ativadas pelo DENV induzem aumento de permeabilidade em células endoteliais humanas de modo dependente de IL-1R (Figura 4.12). Consistente com estes dados *in vitro*, a síntese de IL-1 β , ativação de caspase-1 e a secreção de MPs contendo IL-1 β por plaquetas de pacientes com dengue foram associadas com sinais clínicos de permeabilidade endotelial aumentada (Figura 4.11 e Tabela 4.2), sugerindo que estes eventos podem contribuir para a vasculopatia associada a dengue.

Nossos dados demonstram que uma ação direta do DENV sobre plaquetas é capaz de induzir a síntese e secreção de IL-1 β , nós não podemos descartar, contudo, que outros

fatores também contribuam para este processo. O LPS, por exemplo, é um potente indutor da síntese de IL-1 β em plaquetas e da sua secreção via MPs (Brown e McIntyre, 2011), e níveis elevados de LPS são observados em pacientes com dengue (van de Weg et al, 2012 e 2013). Nós também não podemos excluir a síntese de IL-1 β por megacariócitos infectados. Consistente com esta possibilidade, os megacariócitos são os principais alvos do DENV na medula óssea (Noisakran, 2012; Clark, 2012). Nossos resultados preliminares com o sequenciamento do RNAm de megacariócitos mostram um aumento dos transcritos para IL-1 β e componentes do inflamassoma em megacariócitos infectados com o DENV-2 *in vitro* (Tabela 5.1). Apesar de ainda preliminares, estes dados sugerem duas possibilidades bastante interessantes. A primeira seria a síntese da IL-1 β e montagem do inflamassoma ainda nos megacariócitos, seguida da produção de plaquetas já carregadas com IL-1 β e inflamassomas ativos. A segunda possibilidade seria a produção de plaquetas com um conteúdo aumentado de transcritos para IL-1 β e componentes do inflamassoma, plaquetas estas mais propensas a sintetizar e secretar IL-1 β em resposta ao DENV.

Tabela 5.1: Análise de sequências de RNAm de megacariócitos infectados com o DENV-2 ou Mock indica aumento de transcritos para componentes do inflamassoma nas células infectadas:

Gene	Proteína	Mock (RPKM*)	DENV (RPKM)	Aumento (DENV/mock)
<i>AIM2</i>	AIM2	0,24	4,32	18,28
<i>CASP1</i>	Caspase-1	3,78	20,39	5,46
<i>IL1B</i>	IL-1 β	2,24	8,84	3,94
<i>PYCARD</i>	ASC	9,77	25,37	2,60
<i>NLRP3</i>	NLRP3	2,12	4,19	1,99
<i>ACTB</i> **	β -actina	1854,43	1513,60	0,82

* A quantidade de RNAm foi representada em leituras por kilobase de exons por milhões de leituras mapeadas (RPKM – do inglês *reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) como anteriormente descrito (Rowley et al, 2011).

** O gene para β -actina (constitutivo) foi usado como controle de carregamento.

Apesar de nossos resultados suportarem a IL-1 β sintetizada e secretada por plaquetas como um evento importante na indução de permeabilidade durante a dengue, nós não podemos descartar a contribuição da IL-1 β secretada por outras fontes celulares. Células mononucleares são fontes importantes de IL-1 β , inclusive de MPs contendo IL-1 β

(Wang et al, 2011), e a secreção de IL-1 β por monócitos e macrófagos tem sido demonstrada em resposta a infecção pelo DENV *in vitro* (Wong et al, 2012; Wu et al, 2013). Além disso, nós demonstramos que monócitos secretam altos níveis de IL-1 β ao formar agregados com plaquetas de pacientes com dengue (Figura 4.17A). No entanto, enquanto células nucleadas como monócitos requerem várias horas para produção do RNAm e síntese da IL-1 β (Schindler et al, 1990), a síntese de IL-1 β por plaquetas, que já possuem os transcritos, pode ser observada poucas horas após o estímulo (Brown et al, 2013), sugerindo uma maior relevância das plaquetas para respostas iniciais na infecção. Em suporte às plaquetas e agregados plaqueta-monócitos como fontes importantes de IL-1 β em doenças infecciosas, os níveis séricos de IL-1 β são completamente reduzidos pela depleção de plaquetas em camundongos com malária cerebral (Agrey et al, 2013).

5.3 Interações plaqueta-monócito na dengue

Ainda que pouco estudadas, algumas interações entre plaquetas e leucócitos, principalmente monócitos, foram anteriormente observadas na dengue. Em um modelo de hemorragia induzida pelo DENV em macacos *rhesus* (Onlamoon et al, 2010), observaram-se níveis aumentados de agregados plaqueta-monócito e plaqueta-neutrófilos. Este mesmo estudo mostrou plaquetas internalizadas por células mononucleares em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Em outro estudo do mesmo grupo, o aumento na formação de agregados plaqueta-monócito também foi observado em pacientes com FD (Tsai et al, 2011). No presente estudo, nós observamos níveis aumentados de agregados plaqueta-monócitos em pacientes com dengue branda (Figura 4.13A). Nossos dados demonstram que a adesão de plaquetas aos monócitos modula respostas de ativação celular e de secreção de citocinas na infecção pelo DENV.

Durante interações heterólogas *ex vivo*, o contato com plaquetas de pacientes com dengue incitou monócitos de voluntários saudáveis à secreção de IL-1 β , IL-8, IL-10 e MCP-1 (Figura 4.17), citocinas frequentemente associadas às formas mais graves da dengue (Raghupathy et al, 1998; Chen et al, 2006; Lee et al, 2006; Bozza et al, 2008). Não foi possível, contudo, obter uma associação direta da formação de agregados plaqueta-monócitos com a gravidade da dengue, uma vez que não incluímos pacientes com dengue grave nesta etapa do estudo (25 pacientes com dengue clássica dos quais 48% apresentaram

sinais de alarme). Os níveis de agregados plaqueta-monócito foram, no entanto, associados à plaquetopenia e evidências clínicas de permeabilidade endotelial aumentada (Figura 4.14). Além disso, os níveis de agregados plaqueta-monócito correlacionam positivamente com a expressão de P-selectina em plaquetas (Figura 4.13B), e a expressão de P-selectina foi fortemente associada com a gravidade da dengue em uma análise com número maior de pacientes, incluindo pacientes com dengue grave (Figura 4.3). A correlação entre expressão de P-selectina e formação de agregados plaqueta-monócito é consistente com a P-selectina como principal molécula na superfície de plaquetas que intermedeia a adesão a leucócitos e sinaliza para a transcrição gênica e síntese de citocinas (Larsen et al, 1989; Weyrich et al, 1996).

É sabido que a sinalização proveniente da ligação P-selectina-PSGL1 é integrada e amplificada por fatores secretados pelas plaquetas como a quimiocina RANTES (Weyrich et al, 1996). No presente estudo, plaquetas de pacientes com dengue secretaram níveis menores de RANTES *ex vivo* comparado a plaquetas de voluntários saudáveis (Figura 4.17D). Isso provavelmente aconteceu devido à extensa secreção do conteúdo granular plaquetário *in vivo* anteriormente ao isolamento das plaquetas, uma vez que as plaquetas de pacientes se encontravam ativadas. De modo consistente, plaquetas secretam RANTES em resposta a exposição ao DENV-2 *in vitro* (Figura 4.4A). Como a síntese de MCP-1 por monócitos em resposta à adesão de plaquetas depende da sinalização concomitante de RANTES (Weyrich et al, 1996), o esgotamento do RANTES em plaquetas de pacientes com dengue explica por que estas plaquetas não induziram níveis mais elevados de MCP-1 em monócitos do que plaquetas controle, apesar de expressarem mais P-selectina. A formação de agregados plaqueta-monócito provavelmente contribui para a secreção de MCP-1 *in vivo*, uma vez que ambos, agregados plaqueta-monócito e RANTES, estão aumentados na infecção pelo DENV.

A ativação plaquetária e a formação de agregados plaqueta-monócito estão associadas com populações de monócitos inflamatórios em voluntários vacinados para influenza. A agregação com plaquetas aumentou a expressão de CD16, CD11b e CD11c nos monócitos, aumentando sua adesão a células endoteliais (Passacuale et al, 2011). Monócitos inflamatórios circulantes expressando CD16 e CD11c também foram mostrados em pacientes com dengue (Durbin et al, 2008; Azeredo et al, 2010), assim como monócitos

expressando a molécula co-estimulatória CD86 (Durbin et al, 2008). No presente estudo, nós observamos níveis aumentados das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em monócitos de pacientes com dengue (Figura 4.15). De modo interessante, a expressão de CD80 foi predominantemente observada em monócitos que estavam agregados com plaquetas (Figura 4.15E). A ausência da proteína CD80 em plaquetas (Chapman et al, 2012) confirma que o CD80 foi expresso por monócitos durante as interações plaqueta-monócito. Além disso, monócitos aderidos à P-selectina apresentaram alterações morfológicas sugestivas de ativação celular (Figura 4.23A). Estes resultados sugerem que interações com plaquetas podem contribuir para a ativação dos monócitos e sua maturação em DC ou macrófagos. Consistente com esta hipótese, a interação de DC imaturas com plaquetas ativadas induz a maturação das DC e aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (Hagihara et al, 2004). Estudos futuros com marcadores adicionais devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Nós mostramos pela primeira vez que, além dos eventos associados à ativação plaquetária como a expressão de P-selectina, a exposição de fosfatidilserina mediante apoptose plaquetária também promove imunomodulação em agregados plaqueta-monócito, induzindo a secreção de IL-10 (Hottz e Medeiros-de-Moraes et al, 2014 – ANEXO V). Alonzo e colaboradores (2012) demonstraram que macrófagos em cultura fagocitam plaquetas de pacientes com dengue de modo dependente do reconhecimento da fosfatidilserina. Em nosso modelo de interação plaqueta-monócito, o reconhecimento da fosfatidilserina induziu não apenas a fagocitose das plaquetas apoptóticas, mas também a secreção de IL-10 pelos monócitos. Gudbrandsdottir e colaboradores (2013), após estimular PBMC com LPS na presença de plaquetas, reportaram maior síntese de IL-10 em monócitos agregados com plaquetas em comparação aos monócitos não agregados. Consistente com estes dados, a secreção de IL-10 também dependeu da adesão mediada por P-selectina em nosso modelo (Figura 4.21B). Apesar do bloqueio da P-selectina reduzir a secreção de IL-10 em agregados plaqueta-monócito, nossos resultados com monócitos plaqueados sobre P-selectina e/ou fosfatidilserina indicam que o reconhecimento da fosfatidilserina é suficiente para a indução de IL-10 (Figura 4.23). A adesão via P-selectina provavelmente contribui para a secreção de IL-10 e fagocitose de plaquetas por facilitar o reconhecimento da fosfatidilserina ao manter as células próximas. Estes resultados

corroboram com outros que demonstram que a fagocitose de plaquetas apoptóticas por neutrófilos é um evento bifásico que depende primeiramente da adesão via P-selectina, seguida da internalização mediada pelo reconhecimento de fosfatidilserina (Maugeri et al, 2009). É possível que um processo similar ocorra no reconhecimento de plaquetas apoptóticas por monócitos. Enquanto nosso estudo sugere que monócitos secretam IL-10 a partir do reconhecimento de plaquetas apoptóticas na dengue, nós não podemos excluir que o mesmo ocorra em resposta a apoptose de outras células. De acordo com esta afirmação, os níveis de IL-10 estão associados com a presença de linfócitos apoptóticos em pacientes com dengue (Malavige et al, 2012).

5.4 Apoptose plaquetária e plaquetopenia na dengue

A apoptose induzida pelo DENV tem sido amplamente mostrada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Courageot et al, 2003; El-Bacha et al, 2007; Jaiyen et al, 2009; Levy et al, 2010; Torrentes-Carvalho et al, 2014). Estudos com a infecção de hepatócitos *in vitro* demonstraram que alterações bioenergéticas decorrentes de um processo de disfunção mitocondrial precedem a morte celular por apoptose (El Bacha et al, 2007). De modo similar, nós observamos disfunção mitocondrial e ativação da via intrínseca da apoptose, com ativação de caspase-9 e caspase-3, em plaquetas de pacientes com dengue. Plaquetas expostas ao DENV-2 *in vitro* também apresentaram colapso do $\Delta\Psi_m$, ativação de caspases e exposição de fosfatidilserina. A exposição de fosfatidilserina induzida pelo DENV-2 ocorreu por vias dependentes de caspases (Figura 4.19). Ativação de caspases e exposição de fosfatidilserina em plaquetas expostas ao DENV também foram mostradas por Alonzo e colaboradores (2012), que demonstraram a apoptose plaquetária induzida pelos 4 sorotipos do DENV. De modo importante, a disfunção mitocondrial e apoptose em plaquetas de pacientes com dengue correlacionaram negativamente com as contagens de plaquetas dos pacientes incluídos em nosso estudo (Hottz et al, 2013b – ANEXO III).

Níveis elevados de linfócitos e monócitos apoptóticos têm sido descritos em pacientes com dengue, principalmente nos casos graves (Myint et al, 2006; Jaiyen et al, 2009; Torrentes-Carvalho et al, 2014). Estas células apresentam maior expressão do receptor de morte Fas (CD95) (Myint et al, 2006; Torrentes-Carvalho et al, 2014), enquanto os níveis séricos de fatores associados com a ativação da via extrínseca da apoptose como

TNF- α , o ligante de Fas (FasL) e o ligante indutor de apoptose associado ao TNF (TRAIL) estão elevados nos pacientes com dengue (Jaiyen et al, 2009; Limonta et al, 2014). A ativação da via extrínseca da apoptose também é observada em monócitos e hepatócitos infectados pelo DENV *in vitro* (Torrentes-Carvalho et al, 2009; Nagila et al, 2013). Embora não existam ainda evidências suficientes para a ativação da via extrínseca da apoptose em plaquetas (Leytin, 2012), e os nossos dados indiquem a ativação da apoptose em plaquetas de pacientes com dengue pela via intrínseca, nós não podemos excluir uma possível participação da via extrínseca na apoptose de plaquetas em nosso estudo, principalmente considerando os níveis elevados de TNF α , IL-1 β , FasL e TRAIL durante a infecção (Suharti et al. 2002; Jaiyen et al, 2009; Levy et al, 2010; Limonta et al, 2014).

Em conjunto, os dados de disfunção mitocondrial, ativação de caspases apoptóticas e exposição de fosfatidilserina indicam a apoptose de plaquetas na infecção pelo DENV. No entanto, nós também demonstramos ativação do inflamassoma e participação das quinases RIP1/RIP3, que podem iniciar outros programas de morte celular denominados piroptose e necroptose, respectivamente. Apesar da morte de plaquetas por necroptose ou piroptose não ter sido até então descrita, nós não podemos descartar uma possível contribuição da ativação destas vias para a morte de plaquetas e, conseqüentemente, para a plaquetopenia durante a infecção pelo DENV. Consistente com esta possibilidade, a ativação de caspase-1 e morte celular por piroptose foram mostradas em monócitos e macrófagos infectados com o DENV *in vitro* (Wu et al, 2013; Tan e Chu, 2013).

Nossos dados e de outros (Alonzo et al, 2012; Hottz et al, 2013b – ANEXO III) indicam que a ativação de vias de apoptose em plaquetas de pacientes com dengue é um dos principais mecanismo de trombocitopenia na infecção. Estes resultados são consistentes com um estudo anterior que identificou redução da meia-vida de plaquetas durante a dengue (Mitrakul et al, 1977). Este mesmo estudo mostrou intensa retenção de plaquetas no sistema reticulendotelial (fígado e baço) de pacientes com dengue, provavelmente via captação por macrófagos residentes. O reconhecimento da fosfatidilserina parece ser o principal fator relacionado à fagocitose de plaquetas por macrófagos durante a dengue (Alonzo et al, 2012). Segundo os nossos dados, no entanto, a fagocitose de plaquetas apoptóticas estaria acoplada a formação de agregados plaqueta-leucócito, dependendo também da expressão de P-selectina (Figura 4.22A e B). A formação de agregados

plaqueta-monócito, a fagocitose de plaquetas apoptóticas, e a retenção de plaquetas por fagócitos no sistema reticulendotelial parecem ser mecanismos chaves para a trombocitopenia na dengue.

5.5 Ativação plaquetária como alvo para intervenção terapêutica na dengue

Uma vez que a compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos nas apresentações clínicas da dengue grave é de grande importância para o estabelecimento de novos alvos terapêuticos, o presente trabalho contribui para a identificação de vias associadas à ativação plaquetária como possíveis alvos para intervenção terapêutica na dengue. Os mecanismos pelos quais a dengue induz ativação plaquetária não são completamente conhecidos. Em condições de exposição *in vitro*, o DC-SIGN suporta a ativação plaquetária e disfunção mitocondrial induzidas pelo DENV (Figura 4.24). O quanto isso ocorre via sinalização cascata abaixo de DC-SIGN ou internalização do DENV, nós não sabemos. É sabido, contudo, que o DC-SIGN intermedeia a entrada do HIV em plaquetas (Boukour et al, 2006), e partículas semelhantes ao DENV tem sido detectadas em plaquetas de pacientes com dengue (Noisakran et al, 2009a e b). Compostos que ligam ao DC-SIGN ou ao sítio de ligação ao DC-SIGN na proteína E do DENV são capazes de inibir a infecção de células dendríticas *in vitro* (Varga et al, 2014; Allen et al, 2011; Ichiyama et al, 2013). Drogas baseadas nestes compostos potencialmente apresentariam efeitos benéficos também sobre a ativação plaquetária.

Nossos dados suportam a IL-1 β secretada em MPs plaquetárias como um importante mediador das alterações de permeabilidade em pacientes com dengue. Nesse contexto, o bloqueio da atividade da IL-1 (tanto α quanto β) resulta na redução da gravidade em uma série de síndromes inflamatórias como artrite e doenças cardiovasculares (Dinarello e van der Meer, 2013). Atualmente, três bloqueadores de IL-1 estão aprovados para uso em humanos, incluindo o IL-1Ra anakinra, o receptor solúvel rilonacept, e o anticorpo neutralizante contra IL-1 β canakinumab (Dinarello e van der Meer, 2013). No presente trabalho, o tratamento com o IL-1Ra anakinra protegeu células endotelis em cultura do aumento de permeabilidade induzido por MPs isoladas de plaquetas ativadas pelo DENV (Figura 4.12).

No que diz respeito às interações de plaquetas ativadas e apoptóticas com monócitos, estudos clínicos com o anticorpo anti-P-selecina inclacumab e o anti-fosfatidilserina bavituximab encontram-se em andamento (Gerber et al, 2011; Kling et al, 2013). O estudo de fase I com o bavituximab demonstrou segurança para uso em humanos (Gerber et al, 2011), enquanto um estudo placebo-controlado com o inclacumab apresentou resultados promissores em pacientes com doenças cardiovasculares (Tardif et al, 2013).

Estas drogas são candidatos interessantes para futuros estudos clínicos em dengue.

5.6 Perspectivas

Nossos dados mostram que uma ação direta do DENV sobre plaquetas pode induzir ativação plaquetária, disfunção mitocondrial, apoptose, e a secreção de MPs contendo IL-1 β . Nós não descartamos, contudo, que outros fatores estejam envolvidos na ativação destas vias em plaquetas de pacientes com dengue.

O DC-SIGN está presente em cerca de 20% das plaquetas circulantes (Figura 4.25A e Caipan et al, 2006), sugerindo haver uma subpopulação de plaquetas susceptíveis a ativação direta pelo DENV. No entanto, os níveis elevados de ativação plaquetária em pacientes com dengue indicam que mecanismos adicionais contribuam para a ativação plaquetária durante a infecção. Entre 60 e 90% dos pacientes incluídos neste estudo apresentavam infecção secundária. Wang e colaboradores (1995) demonstraram que a ligação do DENV a plaquetas pode ser potencializada na presença de anticorpos específicos para o DENV. É possível, portanto, que o DENV associado a imunoglobulinas nas infecções secundárias contribua para a ativação plaquetária. Imunocomplexos formados com o *Staphylococcus aureus* ativam plaquetas via FC γ RIIa (Fitzgerald et al, 2006). Considerando que o FC γ RIIa pode mediar a entrada do DENV em macrófagos via ADE (Wahala et al, 2011), a ligação de imunocomplexos DENV+IgG ao FC γ RIIa em plaquetas poderia contribuir para a ativação plaquetária nas infecções secundárias. Contudo, não observamos diferenças na expressão de P-selectina entre pacientes com infecção primária ou secundária (Figura 4.1B). A participação de imunocomplexos na ativação de plaquetas e da cascata do complemento na dengue, e a interação entre estes dois componentes da resposta imune, são questões interessantes a serem investigadas futuramente, e foram recentemente discutidas por nosso grupo (Nascimento e Hottz et al, 2014 – ANEXO IV).

Enquanto os dados apresentados nesta tese associam a ativação plaquetária com mecanismos patogênicos da dengue, a ativação das plaquetas também pode estar associada com mecanismos de defesa do hospedeiro (Kraemer et al, 2011; Engelmann e Massberg, 2013). As respostas inflamatórias e angiogênicas mediadas pela ativação plaquetária com secreção de citocinas e fatores de crescimento, podem tanto estar envolvidas em mecanismos patogênicos como mostrado em nosso estudo, quanto com mecanismos de defesa. Em um estudo de Kraemer e colaboradores (2011) foi demonstrado que plaquetas impedem o crescimento de *Staphylococcus aureus* via secreção de β -defensinas. No que diz respeito a infecções virais, o HIV capturado por plaquetas é degradado em regiões de contato do vírus com grânulos α (Boukour et al, 2006), enquanto a quimiocina CXCL4/PF4 derivada dos grânulos α plaquetários foi identificada como um potente inibidor do HIV (Auerbach et al, 2012). Nossos resultados preliminares com o sequenciamento do RNA de plaquetas de três pacientes com dengue e três voluntários saudáveis mostram um aumento de cerca de dez vezes em transcritos para as proteínas transmembrana induzidas por interferon (IFITM) 1 e 3 (Tabela 5.2). Estas proteínas têm reconhecida atividade antiviral na infecção pelo vírus influenza e pelo DENV (Brass et al, 2009; John et al, 2013). A participação de plaquetas na resposta antiviral induzida por interferon durante a dengue, especificamente a participação de IFITM1 e IFITM3, são alvos para futuras investigações.

Tabela 5.2: Análise de sequencias de RNA de plaquetas isoladas de voluntários saudáveis e pacientes com dengue:

Gene	Proteína	Controle (RPKM*)	Dengue (RPKM)	Aumento (dengue/controle)
<i>IFITM3</i>	IFITM3	101,48	1058,72	10,43
<i>IFITM1</i>	IFITM1	36,91	339,94	9,21
<i>ACTB</i> **	β -actina	1115,19	969,48	0,87
<i>PTPRC</i> ***	CD45	8,63	7,94	0,92

* A quantidade de RNAm foi representada em leituras por kilobase de exons por milhões de leituras mapeadas (RPKM – do inglês *reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) como anteriormente descrito (Rowley et al, 2011).

** O gene para β -actina (constitutivo) foi usado como controle de carregamento.

*** O gene para CD45 foi usado como controle da contaminação por leucócitos.

5.7 Considerações finais

Nós demonstramos intensa ativação plaquetária na infecção pelo DENV. Nossos dados sugerem que a ativação plaquetária, a formação de agregados plaqueta-monócito, e a apoptose de plaquetas parecem ser mecanismos importantes de plaquetopenia durante a dengue. Nossos dados também indicam que plaquetas ativadas podem contribuir para o aumento da permeabilidade endotelial em pacientes com dengue via síntese de IL-1 β e secreção de MPs carregadas com IL-1 β . Além disso, outros fatores como RANTES, MIF e VEGF, secretados por plaquetas expostas ao DENV *in vitro*, ou IL-1 β , IL-8 e MCP-1, secretadas por monócitos diante da adesão de plaquetas ativadas, potencialmente participam do aumento de permeabilidade endotelial na dengue (Figura 5.1A). No que diz respeito aos mecanismos envolvidos em tais processos (Figura 5.1B), nossos dados demonstram que o DENV induz ativação plaquetária e disfunção mitocondrial via o receptor DC-SIGN. Não é sabido, contudo, se a ligação do DENV ao DC-SIGN promove a internalização do vírus, nem se esta é necessária à ativação plaquetária induzida pelo DENV. A disfunção mitocondrial está associada à ativação da via intrínseca de apoptose em plaquetas de pacientes com dengue e em plaquetas expostas ao DENV *in vitro*. A secreção de MPs contendo IL-1 β é mediada pela ativação do inflamassoma NLRP3, que também requer sinalização mitocondrial, nesse caso envolvendo a produção de ROS. Finalmente, a interação de plaquetas com monócitos é mediada pela adesão dependente de P-selectina e pelo reconhecimento da fosfatidilserina exposta em plaquetas apoptóticas. Estas interações modulam respostas de ativação celular e secreção de citocinas nos monócitos. Nós também não podemos descartar uma participação dos fatores secretados por plaquetas como RANTES, MIF e IL-1 β na modulação da resposta dos monócitos (Figura 5.1 B).

Diante do crescente portfólio de ações imunes e inflamatórias das plaquetas, é grande o interesse na participação destes efetores nos processos patogênicos e de defesa em doenças infecciosas e inflamatórias. Nós demonstramos uma forte correlação da gravidade dos casos de dengue com a ativação e resposta plaquetária, estando a secreção de citocinas, a apoptose plaquetária, e a agregação com monócitos associados à plaquetopenia e aumento de permeabilidade endotelial. Contudo, novos estudos ainda serão necessários para entender mais profundamente a participação das plaquetas na resposta imune e inflamatória

durante a dengue, bem como para compreender quais os mecanismos reguladores destes processos e como estes mecanismos se manifestam nas diferentes apresentações clínicas da dengue.

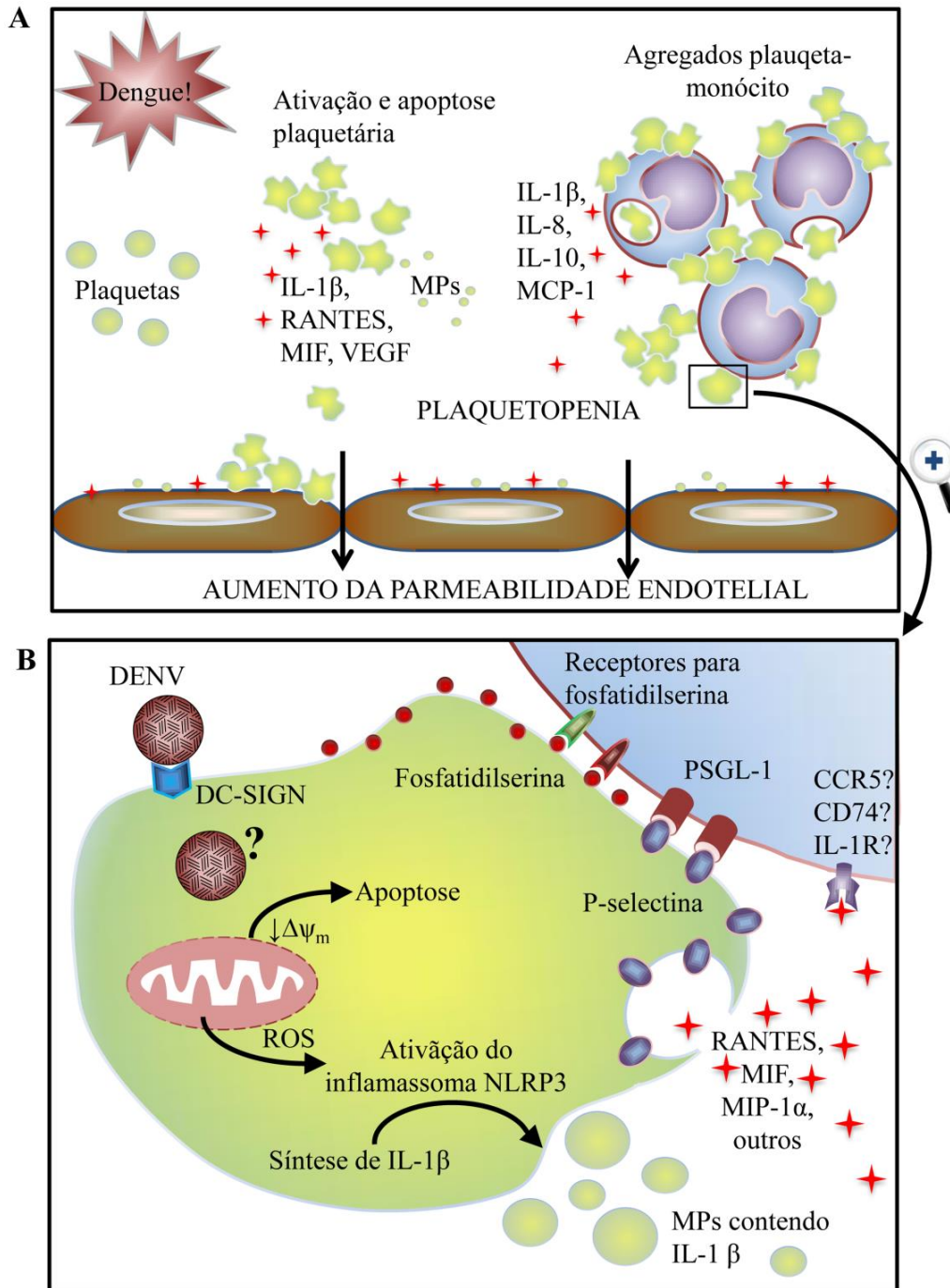


Figura 5.1: Representação esquemática da ativação plaquetária na dengue, mostrando (A) sua relação com a patogênia e; (B) os mecanismos moleculares envolvidos.

6 Conclusões

- Nós observamos importante ativação plaquetária em pacientes com dengue nas fases febril e de defervescência, com retorno aos níveis dos controles na fase de convalescência. Esta ativação foi reproduzida pela exposição de plaquetas ao DENV *in vitro* demonstrando a capacidade do DENV de ativar plaquetas diretamente;

- Plaquetas participam ativamente como efetoras da resposta inflamatória na dengue, seja secretando citocinas com ações sobre o endotélio, seja formando agregados com monócitos;

- Plaquetas possuem componentes do inflamassoma NLRP3 e montam inflamassomas funcionais em resposta a infecção pelo DENV. A ativação do inflamassoma é essencial para a secreção de IL-1 β , que é secretada principalmente via MPs;

- Plaquetas são susceptíveis a apoptose na infecção pelo DENV via mecanismos intrínsecos envolvendo disfunção mitocondrial e ativação de caspase-9 e caspase-3;

- A plaquetopenia em pacientes com dengue foi associada com a disfunção mitocondrial e ativação da via intrínseca de apoptose em plaquetas;

- O DENV induz ativação e disfunção mitocondrial em plaquetas por mecanismos dependentes da expressão de DC-SIGN;

- A formação de agregados plaqueta-monócito via adesão mediada por CD62P modula respostas de ativação celular e secreção das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-10 e MCP-1 em monócitos;

- A secreção de IL-10 por agregados plaqueta-monócito depende do reconhecimento da fosfatidilserina em plaquetas apoptóticas, que também intermedeia a fagocitose de plaquetas apoptóticas por monócitos;

- Nossos dados indicam que a plaquetopenia e alterações de permeabilidade vascular observadas nos quadros mais graves de dengue estão correlacionadas com ativação plaquetária, secreção de MPs contendo IL-1 β e formação de agregados plaqueta-monócito.

Referências:

Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2013 May 1;190(9):4685-91.

Alagarasu K, Mulay AP, Singh R, Gavade VB, Shah PS, Cecilia D. Association of HLA-DRB1 and TNF genotypes with dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol*. 2013a May;74(5):610-7.

Alagarasu K, Damle IM, Bachal RV, Mulay AP, Shah PS, Dayaraj C. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. *Infect Genet Evol*. 2013b Jul;17:239-42.

Alen MM, De Burghgraeve T, Kaptein SJ, Balzarini J, Neyts J, Schols D. Broad antiviral activity of carbohydrate-binding agents against the four serotypes of dengue virus in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e21658.

Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 ;93(9):4102-7.

Alonzo MT, Lacuesta TL, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LA, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis*. 2012 Apr 15;205(8):1321-9.

Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol*. 1997 Jun;71(6):4226-32.

Aslam R, Kim M, Speck ER, Seetanah AC, Molinski S, Freedman J, Semple JW. Platelet and red blood cell phagocytosis kinetics are differentially controlled by phosphatase activity within mononuclear cells. *Transfusion*. 2007 Nov;47(11):2161-8.

Assunção-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, Pacheco P, Barbosa-Lima G, Gomes RN, Bozza PT, Da Poian AT, Teixeira MM, Bozza MT. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J*. 2010 Jan;24(1):218-28.

Auerbach DJ, Lin Y, Miao H, Cimbrow R, Difiore MJ, Gianolini ME, Furci L, Biswas P, Fauci AS, Lusso P. Identification of the platelet-derived chemokine CXCL4/PF-4 as a broad-spectrum HIV-1 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 12;109(24):9569-74.

Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, Nogueira RM, Miagostovich MP, Kubelka CF. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 2001 Dec;204(4):494-507.

Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, Nogueira RM, Oliveira-Pinto LM, Kubelka CF. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*. 2010 Jun;130(2):202-16.

Balmaseda A, Hammond SN, Pérez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, Harris E. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Dec;73(6):1059-62.

Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*. 2006 Aug;11(8):1238-55.

Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg*. 1974 May;23(3):495-506.

Basu A, Jain P, Gangodkar SV, Shetty S, Ghosh K. Dengue 2 virus inhibits in vitro megakaryocytic colony formation and induces apoptosis in thrombopoietin-inducible megakaryocytic differentiation from cord blood CD34+ cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jun;53(1):46-51.

Becquart P, Wauquier N, Nkoghe D, Ndjoi-Mbiguino A, Padilla C, Souris M, Leroy EM. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BMC Infect Dis*. 2010 Dec 17;10:356.

Bente DA, Rico-Hesse R. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models*. 2006;3(1):97-103.

Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, Arthaud CA, Eyraud MA, Zéni F, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O, Cognasse F. Human platelets can discriminate between

various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol.* 2012 Dec;145(3):189-200.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):504-7.

Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews.* 2009;23(4):177-89.

Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science.* 2010 Jan 29;327(5965):580-3.

Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P, Porter K, Rudiman IF, Yuwono D, Puthavathana P, Marovich MA. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 2008 Apr;82(8):3939-51.

Boonpucknavig S, Boonpucknavig V, Bhamarapravati N, Nimmannitya S. Immunofluorescence study of skin rash in patients with dengue hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med.* 1979 Aug;103(9):463-6.

Boukour S, Massé JM, Bénit L, Dubart-Kupperschmitt A, Cramer EM. Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost.* 2006 Feb;4(2):426-35.

Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008 Jun 25;8:86.

Brasier AR, Ju H, Garcia J, Spratt HM, Victor SS, Forshey BM, Halsey ES, Comach G, Sierra G, Blair PJ, Rocha C, Morrison AC, Scott TW, Bazan I, Kochel TJ. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Feb;86(2):341-8.

Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell.* 2009 Dec 24;139(7):1243-54.

Brinton, MA. Replication of flavivirus. In: Schlesinger, S.; Schlesinger, M. *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press, 1986, p327-65.

Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J Immunol*. 2011 May 1;186(9):5489-96.

Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1 β autocrine loop. *J Immunol*. 2013 Nov 15;191(10):5196-203.

Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1 β via caspase-1-inflammasome complex. *J Gen Virol*. 2012 Feb;93(Pt 2):235-46.

Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. 2009;101(3):439-451.

Butthep P, Chunchakan S, Yoksan S, Tangnararatchakit K, Chuansumrit A. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Dec;31(12):e232-8.

Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho AL, de Paula SC, Fontes CJ, Brito CF, Carvalho LH. Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. *Malar J*. 2010 Nov 16;9:327.

Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, Geier M, Stewart EA, Eisemann J, Steinkasserer A, Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Pearce AC, Watson SP, Hoxie JA, Baribaud F, Pöhlmann S. DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol*. 2006 Sep;80(18):8951-60.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:649-88.

Chapman LM, Aggrey AA, Field DJ, Srivastava K, Ture S, Yui K, Topham DJ, Baldwin WM 3rd, Morrell CN. Platelets present antigen in the context of MHC class I. *J Immunol*. 2012 Jul 15;189(2):916-23.

Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol*. 2007 Feb;88(Pt 2):365-75.

Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jan;74(1):142-7.

Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, Cheng JT. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Nov;101(11):1106-13.

Chiewsilp P, Scott RM, Bhamarapavati N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1981 Sep;30(5):1100-5.

Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell.* 2009 Jun 12;137(6):1112-23.

Chua MN, Molanida R, de Guzman M, Laberiza F. Prothrombin time and partial thromboplastin time as a predictor of bleeding in patients with dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1993;24 Suppl 1:141-3.

Chuang YC, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Fu TF, Yeh TM. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. *Cytokine.* 2011 May;54(2):222-31.

Chung EY, Liu J, Homma Y, Zhang Y, Brendolan A, Saggese M, Han J, Silverstein R, Selleri L, Ma X. Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity.* 2007 Dec;27(6):952-64.

Clark KB, Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Roback J, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. Multiploid CD61+ cells are the pre-dominant cell lineage infected during acute dengue virus infection in bone marrow. *PLoS One.* 2012;7(12):e52902.

Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005 Jan;79(2):853-9.

Conceição TM, El-Bacha T, Villas-Bôas CS, Coello G, Ramírez J, Montero-Lomeli M, Da Poian AT. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect.* 2010 Jan;60(1):65-75.

Courageot MP, Catteau A, Desprès P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv Virus Res.* 2003;60:157-86.

Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:707-35.

de Araújo JM, de Filippis AM, Schatzmayr HG, de Araújo ES, Britto C, Cardoso MA, Camacho LA, Nogueira RM. Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009a Sep;103(9):952-4.

de Araújo JM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, Coelho JM, Nogueira RM. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods*. 2009b Jan;155(1):34-8.

de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Povoá TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LD, Motta-Castro AR, Alves AM, Ávila CA, de Souza LJ, da Cunha RV, Damasco PV, Paes MV, Kubelka CF. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS One*. 2012a;7(7):e38527.

de-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setúbal S, Kubelka CF, Cruz OG, Oliveira SA. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1 β and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012b Feb;107(1):48-56.

Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 2006 Jul 8;368(9530):170-3.

Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005 Aug 12;122(3):379-91.

Dimaano EM, Saito M, Honda S, Miranda EA, Alonzo MT, Valerio MD, Mapua CA, Inoue S, Kumaori A, Matias R, Natividad FF, Oishi K. Lack of efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin treatment of severe thrombocytopenia in patients with secondary dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6):1135-8.

Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol*. 2013 Dec 15;25(6):469-84.

Dixon DA, Tolley ND, Bemis-Standoli K, Martinez ML, Weyrich AS, Morrow JD, Prescott SM, Zimmerman GA. Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2727-38.

Dung NT, Duyen HT, Thuy NT, Ngoc TV, Chau NV, Hien TT, Rowland-Jones SL, Dong T, Farrar J, Wills B, Simmons CP. Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue. *J Immunol*. 2010 Jun 15;184(12):7281-7.

Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, Balmaseda A, Harris E. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008;376(2):429-35.

El-Bacha T, Midlej V, Pereira da Silva AP, Silva da Costa L, Benchimol M, Galina A, Da Poian AT. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Oct;1772(10):1158-66.

Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jan;13(1):34-45.

Fagundes CT, Costa VV, Cisalpino D, Amaral FA, Souza PR, Souza RS, Ryffel B, Vieira LQ, Silva TA, Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Sousa LP, Souza DG, Teixeira MM. IFN- γ production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Dec;5(12):e1449.

Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Sep;13(9):1044-51.

Fernández-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens*. 2004 Oct;64(4):469-72.

Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the Fc γ RIIIa receptor. *Mol Microbiol*. 2006 Jan;59(1):212-30.

Flaujac C, Boukour S, Cramer-Bordé E. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Feb;67(4):545-56.

Flaumenhaft, R. Capítulo 18: Platelet Secretion In: Michelson, AD. *Platelets*, 3ª edição. Elsevier, 2013, p.343-366.

Franks Z, Campbell RA, Vieira de Abreu A, Holloway JT, Marvin JE, Kraemer BF, Zimmerman GA, Weyrich AS, Rondina MT. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced thrombo-inflammatory response is reduced with timely antibiotic administration. *Thromb Haemost.* 2013 Apr;109(4):684-95.

Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, DosReis GA, Lopes MF. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 2000 Jan 13;403(6766):199-203.

Furuta T, Murao LA, Lan NT, Huy NT, Huong VT, Thuy TT, Tham VD, Nga CT, Ha TT, Ohmoto Y, Kikuchi M, Morita K, Yasunami M, Hirayama K, Watanabe N. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1505.

Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Pinto LM, Smith N, Despres P, da Cunha RV, de Souza LJ, Kubelka CF, Herbeuval JP. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN- α production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jun 6;7(6):e2257.

Gerber DE, Stopeck AT, Wong L, Rosen LS, Thorpe PE, Shan JS, Ibrahim NK. Phase I safety and pharmacokinetic study of bavituximab, a chimeric phosphatidylserine-targeting monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov 1;17(21):6888-96.

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. *J Electron Microscop* (Tokyo). 2008 Jun;57(3):113-8.

Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai CJ. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 29;104(22):9422-7.

Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol.* 2014 Mar 20;426(6):1148-60.

Guabiraba R, Marques RE, Besnard AG, Fagundes CT, Souza DG, Ryffel B, Teixeira MM. Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLoS One.* 2010 Dec 29;5(12):e15680.

Guabiraba R, Ryffel B. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology.* 2014 Feb;141(2):143-56.

Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1995 Apr-Jun;1(2):55-7.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.

Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002 Feb;10(2):100-3.

Gudbrandsdottir S, Hasselbalch HC, Nielsen CH. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *J Immunol*. 2013 Oct 15;191(8):4059-67.

Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002 Jan;2(1):33-42.

Hagihara M, Higuchi A, Tamura N, Ueda Y, Hirabayashi K, Ikeda Y, Kato S, Sakamoto S, Hotta T, Handa S, Goto S. Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL-10-producing, mature dendritic cells in vitro. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5297-303.

Halstead SB, Scanlon JE, Umpaivit P, Udomsakdi S. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *Am J Trop Med Hyg*. 1969 Nov;18(6):997-1021.

Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med*. 1970 Apr;42(5):350-62.

Halstead SB. The Alexander D. Langmuir Lecture. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. *Am J Epidemiol*. 1981 Nov;114(5):632-48.

Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):476-81.

Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003;60:421-67.

Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica*. 2006 Dec;20(6):407-15.

Halstead SB. Antibodies determine virulence in dengue. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1171 Suppl 1:E48-56.

Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*. 1990 Feb 1;75(3):550-4.

Heinz FX, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol*. 2001 Aug;4(4):450-5.

Honda S, Saito M, Dimaano EM, Morales PA, Alonzo MT, Suarez LA, Koike N, Inoue S, Kumatori A, Matias RR, Natividad FF, Oishi K. Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary dengue virus infection by human macrophages. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 May;80(5):841-5.

Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: A wide-angle perspective. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1999;30(2):111-142.

Hottz E, Toley N, Zimmerman G, Weyrich A, Bozza F. Platelets in Dengue Infection. *Drug Discov Today: Dis Mech*. 2011;8(1-2):e33-e38.

Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. 2013a Nov 14;122(20):3405-14.

Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza PT, Bozza FA. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost*. 2013b May;11(5):951-62.

Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, de Assis EF, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue. *J Immunol*. 2014 (no prelo).

Houghton-Triviño N, Martín K, Giaya K, Rodríguez JA, Bosch I, Castellanos JE. Comparison of the transcriptional profiles of patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever reveals differences in the immune response and clues in immunopathogenesis. *Biomedica*. 2010 Oct-Dec;30(4):587-97.

Ichiyama K, Gopala Reddy SB, Zhang LF, Chin WX, Muschin T, Heinig L, Suzuki Y, Nanjundappa H, Yoshinaka Y, Ryo A, Nomura N, Ooi EE, Vasudevan SG, Yoshida T, Yamamoto N. Sulfated polysaccharide, curdlan sulfate, efficiently prevents entry/fusion and restricts antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro: a possible candidate for clinical application. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Apr 25;7(4):e2188.

Ismail N, Wang Y, Dakhllallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, Shah P, Wisler J, Eubank TD, Tridandapani S, Paulaitis ME, Piper MG, Marsh CB. Macrophage

microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*. 2013 Feb 7;121(6):984-95.

Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanarooj S, Pulmanusahakul R, Ubol S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol*. 2009 Aug;53(8):442-50.

Jobe SM, Wilson KM, Leo L, Raimondi A, Molkentin JD, Lentz SR, Di Paola J. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1257-65.

John SP, Chin CR, Perreira JM, Feeley EM, Aker AM, Savidis G, Smith SE, Elia AE, Everitt AR, Vora M, Pertel T, Elledge SJ, Kellam P, Brass AL. The CD225 domain of IFITM3 is required for both IFITM protein association and inhibition of influenza A virus and dengue virus replication. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):7837-52.

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2005 Oct;43(10):4977-83.

Jonnalagadda D, Izu LT, Whiteheart SW. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5209-16.

Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, Thijs LG. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jul;65(1):70-5.

Kaplanski G, Porat R, Aiura K, Erban JK, Gelfand JA, Dinarello CA. Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin-8 in vitro via an interleukin-1-mediated event. *Blood*. 1993 May 15;81(10):2492-5.

Kaushik DK, Gupta M, Kumawat KL, Basu A. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis. *PLoS One*. 2012;7(2):e32270.

Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1989 Apr;40(4):444-51.

Kling D, Stucki C, Kronenberg S, Tuerck D, Rhéaume E, Tardif JC, Gaudreault J, Schmitt C. Pharmacological control of platelet-leukocyte interactions by the human anti-P-

selectin antibody inclacumab--preclinical and clinical studies. *Thromb Res.* 2013 May;131(5):401-10.

Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ.* 1989;67(4):375-80.

Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, Kahr WH, Lindemann S, Seizer P, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Novel anti-bacterial activities of β -defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog.* 2011 Nov;7(11):e1002355.

Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, Green S, Nisalak A, Endy TP, Vaughn DW, Nimmannitya S, Innis BL. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Dec;65(6):840-7.

Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Apr;66(4):435-41.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002 Mar 8;108(5):717-25.

Kumar Y, Liang C, Bo Z, Rajapakse JC, Ooi EE, Tannenbaum SR. Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(11):e1887.

Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods.* 1991 Jun;33(1-2):101-13.

La Russa VF, Innis BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillieres Clin Haematol.* 1995 Mar;8(1):249-70.

Laffont B, Corduan A, Plé H, Duchez AC, Cloutier N, Boilard E, Provost P. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood.* 2013 Jul 11;122(2):253-61.

LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruíz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, Hernández-Pacheco G, Cutiño-Moguel T, Rangel H, Figueroa R, Acosta M, Lazcano E, Ramos C. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus

infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2002 Nov;63(11):1039-44.

Lamkanfi M, Dixit VM. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. *J Immunol.* 2011 Jul 15;187(2):597-602.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Mar;30(3):545-51.

Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell.* 1989 Oct 20;59(2):305-12.

Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, Lin YS, Yeh TM, Chen SH, Liu HS. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol.* 2006 Dec;87(Pt 12):3623-30.

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4738-47.

Levy A, Valero N, Espina LM, Añez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010 Jan;104(1):16-23.

Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *J Thromb Haemost.* 2006 Dec;4(12):2656-63.

Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. *Br J Haematol.* 2008 Jul;142(3):494-7.

Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhaylov S, Freedman J. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest.* 2009 Apr;89(4):374-84.

Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev.* 2012 Mar;26(2):51-63.

Limonta D, Torrentes-Carvalho A, Marinho CF, de Azeredo EL, de Souza LJ, Motta-Castro AR, da Cunha RV, Kubelka CF, Nogueira RM, de-Oliveira-Pinto LM.

Apoptotic mediators in patients with severe and non-severe dengue from Brazil. *J Med Virol.* 2014; (no prelo).

Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol.* 2001 Feb;63(2):143-9.

Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol.* 2006 Summer;19(2):127-32.

Lindenbach, BD; Thiel, HJ; Rice, CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In Knipe, D.M.; Howley, P.M. *Fields Virology*, 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007, p.1101-1252.

Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, Hill A. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jul;67(1):102-6.

Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Thrombin induces activation and translocation of Bid, Bax and Bak to the mitochondria in human platelets. *J Thromb Haemost.* 2008 Oct;6(10):1780-8.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004 Dec;10(12 Suppl):S98-109.

Malavige GN, Huang LC, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. *PLoS One.* 2012; 7(11):e50387

Malavige GN, Gomes L, Alles L, Chang T, Salimi M, Fernando S, Nanayakkara KD, Jayaratne S, Ogg GS. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC Infect Dis.* 2013 Jul 24;13(1):341.

Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006 Mar 9;440(7081):237-41.

Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DC, Kile BT. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell.* 2007 Mar 23;128(6):1173-86.

Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Covino C, Capobianco A, Bertilaccio MT, Piccoli A, Totani L, Cianflone D, Maseri A, Manfredi AA. Neutrophils phagocytose

activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and β 2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5254-65.

Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 2005;25(7):1512-1518.

Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*. 2010;107(9):1047-1057

Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe*. 2012 Oct 18;12(4):544-57.

Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos e Notificações - SINAN. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/dengue/bases/denguebrnet.de>>. Acesso em 29/01/2014

Mitrakul C, Poshyachinda M, Futrakul P, Sangkawibha N, Ahandrik S. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1977 Sep;26(5 Pt 1):975-84.

Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 29;91(7):2395-400.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenchitsomanus PT, McMichael A, Malasit P, Screaton G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):921-7.

Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, Khemnu N, Tangthawornchaikul N, Chotiyarnwong P, Sae-Jang K, Koch M, Jones Y, McMichael A, Xu X, Malasit P, Screaton G. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3821-9.

Monteiro SP, Brasil PE, Cabello GM, Souza RV, Brasil P, Georg I, Cabello PH, De Castro L. HLA-A*01 allele: a risk factor for dengue haemorrhagic fever in Brazil's population. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Mar;107(2):224-30.

Mourão MP, Lacerda MV, Macedo VO, Santos JB. Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets*. 2007 Dec;18(8):605-12.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Jan;3(1):13-22.

Murgue B, Cassar O, Guigon M, Chungue E. Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *J Infect Dis.* 1997 Jun;175(6):1497-501.

Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nisalak A, Green S, Rothman AL, Ennis FA, Libraty DH. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis.* 2006 Sep 1;194(5):600-7.

Nagila A, Netsawang J, Suttitheptumrong A, Morchang A, Khunchai S, Srisawat C, Puttikhunt C, Noisakran S, Yenchitsomanus PT, Limjindaporn T. Inhibition of p38MAPK and CD137 signaling reduce dengue virus-induced TNF- α secretion and apoptosis. *Virol J.* 2013 Apr 4;10:105.

Nakao S, Lai CJ, Young NS. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood.* 1989 Sep;74(4):1235-40.

Nascimento EJM, Hottz ED, Garcia-Bates TM, Bozza FA, Marques Jr ETA, Barratt-Boyes SM. Emerging Concepts in Dengue Pathogenesis: Interplay between Plasmablasts, Platelets and Complement in Triggering Vasculopathy. *Crit Rev Immunol.* 2014, 34(3):227–240.

Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisayakorn U, Scott RM, Burke DS, Hoke CH, Innis BL, Vaughn DW. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Feb;68(2):191-202.

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Oechara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich BG, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood.* 2012 Feb 23;119(8):e45-56.

Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, Jarman RG, Malasit P, Chokephaibulkit K, Perng GC. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009a Mar;40(2):253-62.

Noisakran S, Chokephaibulkit K, Songprakhon P, Onlamoon N, Hsiao HM, Villinger F, Ansari A, Perng GC. A re-evaluation of the mechanisms leading to dengue hemorrhagic fever. *Ann N Y Acad Sci.* 2009b Sep;1171 Suppl 1:E24-35.

Noisakran S, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Hsiao HM, Songprakhon P, Angkasekwinai N, Chokephaibulkit K, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. Role of CD61+ cells in thrombocytopenia of dengue patients. *Int J Hematol*. 2012 Nov;96(5):600-10.

Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1823-34.

Ooi EE, Gubler DJ. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. *Cad Saude Publica*. 2008;25 Suppl 1:S115-24.

Organização Mundial de Saúde. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: WHO: 1997.

Organização Mundial de Saúde. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Geneva: WHO: 2009.

Organização Mundial de Saúde. Dengue and Severe Dengue. WHO, Fact Sheet n 117, updated Sept 2013. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em 14/01/2014.

Organização Panamericana de Saúde: Dados da dengue no Brasil, 2013. Disponível em <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3159&Itemid=1>. Acesso em 29/01/2014.

Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 2007 Jan;85(1):43-5.

Panzer S. Differential response to LPS isotypes induced platelet activation mediated by Toll-like receptor (TLR)-4. *Clin Immunol*. 2013 Jan;146(1):13-4.

Parimon T, Li Z, Bolz DD, McIndoo ER, Bayer CR, Stevens DL, Bryant AE. Staphylococcus aureus α -hemolysin promotes platelet-neutrophil aggregate formation. *J Infect Dis*. 2013 Sep 1;208(5):761-70.

Passacquale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigan V, Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One*. 2011;6(10):e25595.

Paul BZ, Vilaire G, Kunapuli SP, Bennett JS. Concurrent signaling from Galphaq- and Galphai-coupled pathways is essential for agonist-induced alphavbeta3 activation on human platelets. *J Thromb Haemost.* 2003 Apr;1(4):814-20.

Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, Sanchez L, Valdes L, Volk HD, Guzman MG. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2010 Nov;71(11):1135-40.

Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA, Figler R, Gear AR, Linden J. P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2392-9.

Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, Dalalio MM, Coimbra MT, Moliterno RA. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 Oct;99(6):559-62.

Póvoa TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One.* 2014 Apr 15;9(4):e83386.

Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, Cecilia D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One.* 2010 Jan 14;5(1):e8709.

Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov;65(5):427-34.

Puerta-Guardo H, Raya-Sandino A, González-Mariscal L, Rosales VH, Ayala-Dávila J, Chávez-Mungía B, Martínez-Fong D, Medina F, Ludert JE, del Angel RM. The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability. *J Virol.* 2013 Jul;87(13):7486-501.

Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, Kapoor S, Misra A, Mathur A, Nusrat H, Azizieh F, Khan MA, Mustafa AS. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 1998 Nov;56(3):280-5.

Raiden S, Schettini J, Salamone G, Trevani A, Vermeulen M, Gamberale R, Giordano M, Geffner J. Human platelets produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and delay eosinophil apoptosis. *Lab Invest*. 2003 Apr;83(4):589-98.

Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, Manikam R, Sekaran SD. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One*. 2012;7(12):e52215.

Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhalawon B, Devue C, Duflaut D, Vion AC, Nalbône G, Castier Y, Leseche G, Lehoux S, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ Res*. 2011 Feb 4;108(3):335-43

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997 Apr 14;230(2):244-51.

Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis*. 2007 Jun 1;44(11):1462-6.

Rigau-Pérez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis*. 2006 May;6(5):297-302.

Rondina MT, Schwertz H, Harris ES, Kraemer BF, Campbell RA, Mackman N, Grissom CK, Weyrich AS, Zimmerman GA. The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human platelets. *J Thromb Haemost*. 2011 Apr;9(4):748-58.

Rothwell SW, Putnak R, La Russa VF. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 May;54(5):503-10.

Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):e101-11.

Russell, PK; Brandt, WE; Dalrymple, JM. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In Schlesinger, R.W. *The Togaviruses. Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press, 1980; p.503-529.

Sa-Ngasang A, Ohashi J, Naka I, Anantapreecha S, Sawanpanyalert P, Patarapotikul J. Association of IL1B -31C/T and IL1RA variable number of an 86-bp tandem repeat with Dengue Shock Syndrome in Thailand. *J Infect Dis*. 2014 (no prelo).

Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckennooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2012 Nov 3;380(9853):1559-67.

Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, Estrella BD Jr, Kumatori A, Moji K, Alonzo MT, Buerano CC, Matias RR, Morita K, Natividad FF, Nagatake T. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol*. 2004 Nov;138(2):299-303.

Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanaroj SM, Tangnararatchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, Chaiyaratana W, Yenchitsomanus PT, Suriyaphol P, Avirutnan P, Chokephaibulkit K, Matsuda F, Yoksan S, Jacob Y, Lathrop GM, Malasit P, Desprès P, Julier C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):507-13.

Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem*. 1990 Jun 25;265(18):10232-7.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):821-32.

Schwartz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*. 2006 Oct 30;203(11):2433-40

Seet RC, Chow AW, Quek AM, Chan YH, Lim EC. Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in adults with dengue virus infection: a case-control study. *Int J Infect Dis*. 2009 Sep;13(5):e248-53.

Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011 Apr;11(4):264-74.

Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol*. 2008 Sep 1;181(5):3495-502.

Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul;10(4):622-30.

Sierra B, Alegre R, Pérez AB, García G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, Aguirre E, Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Valdés L, Kanki P, Guzmán MG. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol.* 2007 Jun;68(6):531-40.

Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral FA, Souza RS, Souza AL, Kroon EG, Sachs D, Cunha FQ, Bukin E, Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Teixeira MM. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 18;106(33):14138-43.

Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000 Jun;13(2):261-76.

Sridharan A, Chen Q, Tang KF, Ooi EE, Hibberd ML, Chen J. Inhibition of megakaryocyte development in the bone marrow underlies dengue virus-induced thrombocytopenia in humanized mice. *J Virol.* 2013 Nov;87(21):11648-58.

Strüßmann T, Tillmann S, Wirtz T, Bucala R, von Hundelshausen P, Bernhagen J. Platelets are a previously unrecognised source of MIF. *Thromb Haemost.* 2013 Oct 31;110(5):1004-13.

Su SB, Mukaida N, Matsushima K. Rapid secretion of intracellularly pre-stored interleukin-8 from rabbit platelets upon activation. *J Leukoc Biol.* 1996 Mar;59(3):420-6.

Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, ten CH, van der Meer JW. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost.* 2002 Jan;87(1):42-6.

Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, Yu CC, Chang HH. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost.* 2007 Nov;5(11):2291-9.

Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol.* 2004 Jul;85(Pt 7):1801-13.

Tan TY, Chu JJ. Dengue virus-infected human monocytes trigger late activation of caspase-1, which mediates pro-inflammatory IL-1 β secretion and pyroptosis. *J Gen Virol*. 2013 Oct;94(Pt 10):2215-20.

Tang Y, Kou Z, Zhang F, Yao X, Liu S, Ma J, Zhou Y, Zhao W, Tang X, Jin X. Both viremia and cytokine levels associate with the lack of severe disease in secondary dengue 1 infection among adult Chinese patients. *PLoS One*. 2010 Dec 29;5(12):e15631.

Tardif JC, Tanguay JF, Wright SS, Duchatelle V, Petroni T, Grégoire JC, Ibrahim R, Heinonen TM, Robb S, Bertrand OF, Cournoyer D, Johnson D, Mann J, Guertin MC, L'Allier PL. Effects of the P-selectin antagonist inclacumab on myocardial damage after percutaneous coronary intervention for non-ST-segment elevation myocardial infarction: results of the SELECT-ACS trial. *J Am Coll Cardiol*. 2013 May 21;61(20):2048-55.

Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Apr 7;197(7):823-9.

Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S7-18.

Teixeira MG, Siqueira JB Jr, Ferreira GL, Bricks L, Joint G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Dec 19;7(12):e2520.

Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, Kubelka CF. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Dec;104(8):1091-9.

Torrentes-Carvalho A, Marinho CF, de Oliveira-Pinto LM, de Oliveira DB, Damasco PV, Cunha RV, de Souza LJ, de Azeredo EL, Kubelka CF. Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue. *Immunobiology*. 2014 Jan 9. pii: S0171-2985(13)00204-0.

Tsai JJ, Jen YH, Chang JS, Hsiao HM, Noisakran S, Perng GC. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun*. 2011;3(5):530-40.

Tseng CS, Lo HW, Teng HC, Lo WC, Ker CG. Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 Jan 1;43(1):99-102.

van de Weg CA, Koraka P, van Gorp EC, Mairuhu AT, Supriatna M, Soemantri A, van de Vijver DA, Osterhaus AD, Martina BE. Lipopolysaccharide levels are elevated in dengue virus infected patients and correlate with disease severity. *J Clin Virol*. 2012 Jan;53(1):38-42.

van de Weg CA, Pannuti CS, de Araújo ES, van den Ham HJ, Andeweg AC, Boas LS, Felix AC, Carvalho KI, de Matos AM, Levi JE, Romano CM, Centrone CC, de Lima Rodrigues CL, Luna E, van Gorp EC, Osterhaus AD, Martina BE, Kallas EG. Microbial translocation is associated with extensive immune activation in dengue virus infected patients with severe disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 May 23;7(5):e2236.

Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Bogaert P, Laukens B, Zobel K, Deshayes K, Vucic D, Fulda S, Vandenabeele P, Bertrand MJ. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death Differ*. 2011 Apr;18(4):656-65.

Varga N, Sutkeviciute I, Ribeiro-Viana R, Berzi A, Ramdasi R, Daggetti A, Vettoretti G, Amara A, Clerici M, Rojo J, Fieschi F, Bernardi A. A multivalent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus. *Biomaterials*. 2014 Apr;35(13):4175-84.

Vaughn DW, Green S, Kalayanaraj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J Infect Dis*. 1997 Aug;176(2):322-30.

Vaughn DW, Green S, Kalayanaraj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000 Jan;181(1):2-9.

Verhoeven AJ, Verhaar R, Gouwerok EG, de Korte D. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*. 2005 Jan;45(1):82-9.

Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*. 2012 Jan;34(1):5-30

Vieira-de-Abreu, A. Rondina, M T. Weyrich, AS. Zimmerman, GA. Capítulo 36: Inflammation. In: Michelson, AD. *Platelets*, 3ª edição. Elsevier, 2013, p.733-766.

Vince JE, Wong WW, Gentle I, Lawlor KE, Allam R, O'Reilly L, Mason K, Gross O, Ma S, Guarda G, Anderton H, Castillo R, Häcker G, Silke J, Tschopp J. Inhibitor of

apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity*. 2012 Feb 24;36(2):215-27.

Wahala WM, Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*. 2011 Dec;3(12):2374-95.

Wang JG, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting JP, Mackman N. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2366-74.

Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology*. 1995 Oct 20;213(1):254-7.

Wang Z, Shi Q, Li S, Du J, Liu J, Dai K. Hyperthermia induces platelet apoptosis and glycoprotein Iba ectodomain shedding. *Platelets*. 2010;21(3):229-37.

Wang Z, Cai F, Chen X, Luo M, Hu L, Lu Y. The role of mitochondria-derived reactive oxygen species in hyperthermia-induced platelet apoptosis. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e75044.

Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest*. 1996 Mar 15;97(6):1525-34.

Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003 Sep;1(9):1897-905.

Weyrich AS, Denis MM, Kuhlmann-Eyre JR, Spencer ED, Dixon DA, Marathe GK, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Dipyridamole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates. *Circulation*. 2005 Feb 8;111(5):633-42.

Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009 Feb;7(2):241-6.

White, JG. Capítulo 7: Platelet structure. In: Michelson, AD. *Platelets*, 3ª edição. Elsevier, 2013, p. 117-144.

Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, Daramola OA, Dung NM, Loan HT, Chau NV, Chambers M, Stepniewska K, Farrar JJ, Levin M. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome. *Clin Infect Dis*. 2002 Aug 1;35(3):277-85.

Wong KL, Chen W, Balakrishnan T, Toh YX, Fink K, Wong SC. Susceptibility and response of human blood monocyte subsets to primary dengue virus infection. *PLoS One*. 2012;7(5):e36435.

Wu MF, Chen ST, Yang AH, Lin WW, Lin YL, Chen NJ, Tsai IS, Li L, Hsieh SL. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood*. 2013 Jan 3;121(1):95-106.

Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, de Souza Santos R, Gonçalves Cruz O, de Oliveira SA, de Sá Carvalho M, Pacheco AG, Kubelka CF, Moraes MO. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: a case-control, functional and meta-analysis study. *Infect Genet Evol*. 2013 Dec;20:197-205

Yang KD, Lee CS, Shiao MF. A higher production of platelet activating factor in ex vivo heterologously secondary dengue-2 virus infections. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 1995;42(4):403-7

Yeh TM, Liu SH, Lin KC, Kuo C, Kuo SY, Huang TY, Yen YR, Wen RK, Chen LC, Fu TF. Dengue virus enhances thrombomodulin and ICAM-1 expression through the macrophage migration inhibitory factor induction of the MAPK and PI3K signaling pathways. *PLoS One*. 2013;8(1):e55018.

Zellweger RM, Shresta S. Mouse Models to Study Dengue Virus Immunology and Pathogenesis. *Front Immunol*. 2014 Apr 10;5:151.

Zhang JL, Wang JL, Gao N, Chen ZT, Tian YP, An J. Up-regulated expression of beta3 integrin induced by dengue virus serotype 2 infection associated with virus entry into human dermal microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 11;356(3):763-8.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011 Jan 13;469(7329):221-5

Editors-in-Chief

Toren Finkel – National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, USA
 Charles Lowenstein – University of Rochester Medical Center, Rochester, NY.

Haematology

Platelets in dengue infection

Eugenio Hottz¹, Neal D. Tolley², Guy A. Zimmerman³, Andrew S. Weyrich^{2,3,*},
 Fernando A. Bozza^{1,*}

¹Laboratório de Immunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Molecular Medicine Program, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, United States

³Department of Internal Medicine, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, United States

Dengue has established itself as one of the world's most common mosquito-borne viral diseases. Although it prevails in tropical areas, sustained transmission of dengue has recently occurred in Florida. Dengue viruses can induce a spectrum of symptoms and, in severe cases, mortality in approximately 1–5% of infected individuals. A hallmark of dengue infection is thrombocytopenia that associates with abnormal platelet function, which is the focus of this review.

Introduction

Dengue is an endemic disease that occurs throughout the world; over 2.5 billion people live in high-risk tropical or subtropical transmission areas [1]. It is the most common human arbovirus infection and is responsible for thousands of deaths every year. Estimates suggest that 50 million dengue infections occur annually with up to 500,000 cases of dengue hemorrhagic fever (DHF) and at least 22,000 reported deaths [2].

The dengue virus (DV) induces a spectrum of clinical manifestations that range from a self-limited fever to a severe form (DHF), which may progress to shock and death. Although not fully elucidated, recent evidence indicates that severe DV infections increase vascular permeability that leads to decreased intravascular fluid volume and consequent hemoconcentration and hypotension in infected patients. Another feature of DV infection is thrombocytopenia, which is common in both mild and severe diseases (Table 1) [3–7].

Section editor:

Craig Morrell – University of Rochester School of Medicine,
 New York, United States.

Molecular mechanisms of thrombocytopenia in dengue infection

DV is transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, usually *Aedes aegypti*, a synanthropic species associated with human habitation that is expanding rapidly in many areas of the world [8]. The DV belongs to the family Flaviviridae and comprises four (DV-1–DV-4) antigenically distinct serotypes [9]. The DV is composed of a nucleocapsid that is surrounded by a lipid membrane and covered by glycoproteins (Fig. 1). Its genome consists of a positive-sense, single-stranded RNA that encodes a polyprotein precursor of viral proteins [10]. This precursor is cleaved by host and viral proteases, which generates three structural (C, capsid; prM, premembrane; and E, envelope) and seven nonstructural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4A, NS4B and NS5) proteins [11]. The structural proteins are incorporated into the mature infective virion, while the non-structural proteins are involved in the replication and assembly of the virus [8–11].

DV has been isolated from polymorphonuclear leukocytes, monocyte/macrophages, dendritic cells and others [12]. It has also been detected in megakaryocyte progenitors and circulating platelets [13–15]. These findings suggest that DV may induce thrombocytopenia via direct interactions with megakaryocytes and platelets. DV has also been shown to reduce circulating platelet counts independent of virus attachment or entry into platelets or their precursors. Thus, two mechanisms

*Corresponding authors: A.S. Weyrich (andy.weyrich@u2m2.utah.edu),
 F.A. Bozza (fernando.bozza@ipec.fiocruz.br)

Table 1. Thrombocytopenia (<100,000 platelets/mm³) during DENV infection in hospital-based studies.

Study location	DF	DHF	DSS	Authors
Percent of thrombocytopenic patients				
Children's Hospital, Bangkok	50.2%	93.8%	92.1%	Kalayanaroop <i>et al.</i> [4]
Tropical Medicine Foundation of Amazonas, Brazil	21.1% ^a	45.5% ^a	NR	Mourao <i>et al.</i> [5]
Hospitals in Niterói (Rio de Janeiro), Brazil	63%	72%	NR	Bozza <i>et al.</i> [6] ^b
Mean platelet count (×1000/mm³)				
Children's Hospital, Bangkok	123.599	63.855	53.452	Kalayanaroop <i>et al.</i> [4]
San Lazaro Hospital, Manila	60.0 (±24.3)	39.3 (±30.8)	NR	Honda <i>et al.</i> [7]

Abbreviations: DF, dengue fever; DHF, dengue hemorrhagic fever; DSS, dengue shock syndrome.

^a Percent of patients with severe thrombocytopenia (<50,000 platelets/mm³).

^b In this paper patients were classified as classic dengue or severe dengue.

are probably involved in dengue-induced thrombocytopenia: impaired thrombopoiesis and peripheral platelet destruction (Fig. 2).

Impaired thrombopoiesis

Marrow suppression within 2–4 days of DV infection can contribute to thrombocytopenia (Fig. 3). Viral RNA has been isolated from bone marrow specimens of infected individuals, suggesting that dengue targets the marrow and hematopoietic system [16]. Bone marrow studies also reveal diminished megakaryopoiesis during the onset of dengue infection and clinical recovery is associated with normal megakaryocyte topography and platelet counts [17].

Suppression of megakaryopoiesis occurs either directly, due to infection and suppression of hematopoietic progenitor cells or indirectly, via impairment of stromal cells that function by altering the repertoire of cytokines in the bone marrow microenvironment. In regard to direct effects, Nakao *et al.* [13] demonstrated that DV-4 propagates in human bone marrow progenitors *in vitro* and alters their proliferative capacity. DV infection suppresses proliferation of human cord blood progenitors and DV-2 inhibits the differentiation of CD34⁺ progenitors into megakaryocytes,

presumably by inducing apoptosis in infected cells [18,19]. Together, these data support that DV is able to directly infect hematopoietic progenitors and suppress megakaryopoiesis and thrombopoiesis.

DV can also infect stromal cells, which in turn suppresses hematopoiesis. Rothwell *et al.* [20] infected long-term marrow cultures with DV-2 and characterized the viral antigen-positive cells. This investigation demonstrated two types of stromal cells that were positive for viral antigens: adventitial reticular cells and bone marrow dendritic cells. Moreover, DV infected stroma did not support colony-forming cells either in coculture or as a feeder layer separated from highly purified CD34⁺ progenitor cells. The cytokine profile was different among infected and uninfected stromal cells, suggesting that altered cytokine production by infected stroma is the most probable mechanism of marrow suppression during DV infection.

The *in vitro* findings described above and the hematological findings of leukopenia in conjunction with thrombocytopenia in dengue patients are used as argument in favor of dengue globally suppressing bone marrow hematopoiesis [17]. However, emerging evidence indicates that dengue infection also has extramedullary effects on circulating platelets.

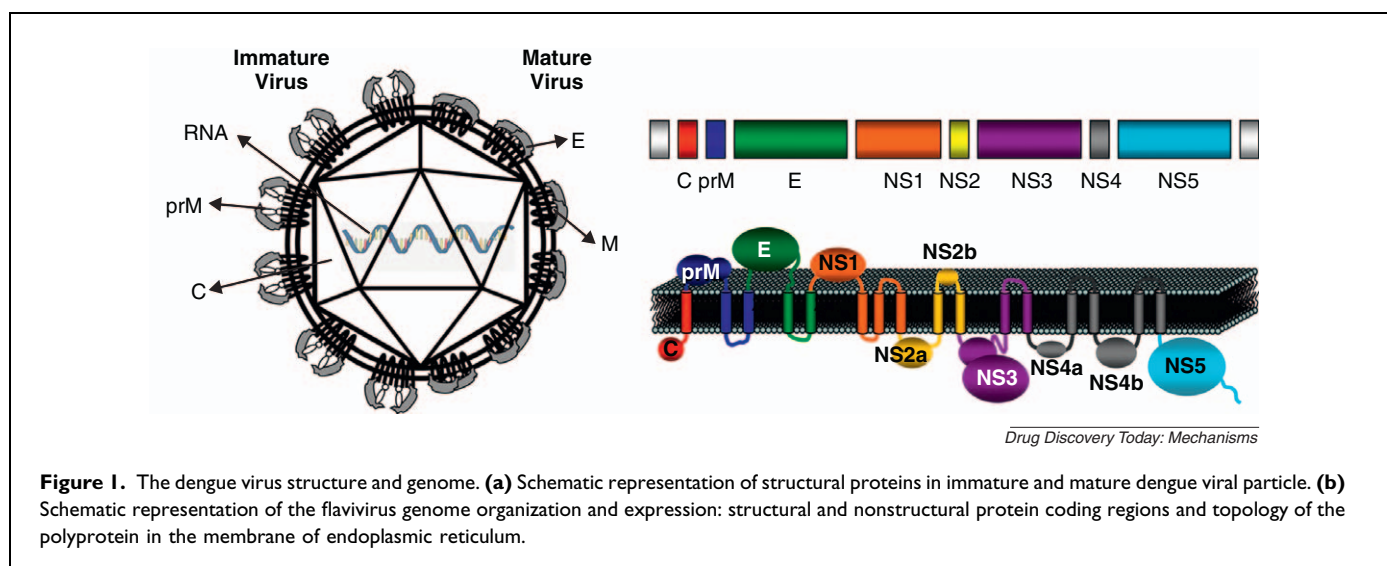


Figure 1. The dengue virus structure and genome. (a) Schematic representation of structural proteins in immature and mature dengue viral particle. (b) Schematic representation of the flavivirus genome organization and expression: structural and nonstructural protein coding regions and topology of the polyprotein in the membrane of endoplasmic reticulum.

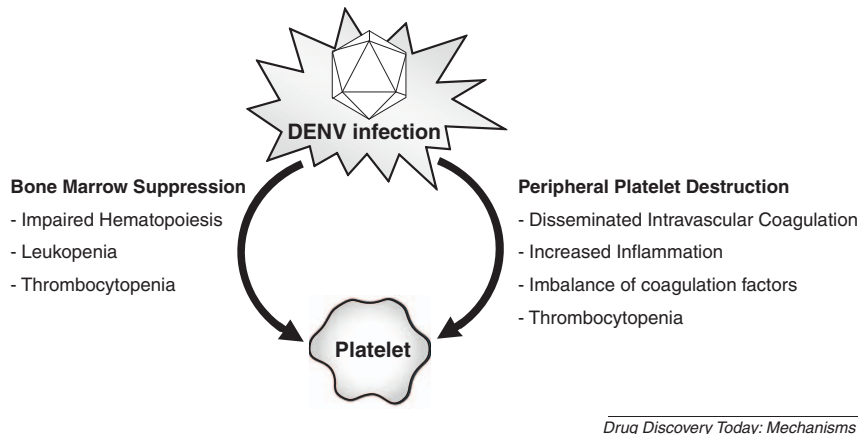


Figure 2. Schematic of bone marrow suppression and peripheral platelet destruction elicited by the dengue virus (DV). Schematic representation of two major mechanisms involved in dengue-induced thrombocytopenia: bone marrow suppression and peripheral platelet destruction. Text boxes describe findings that support each mechanism.

Increased peripheral destruction

Autoimmune-induced platelet activation and clearance

Several groups have put forth the autoimmune hypothesis, which postulates that host-generated anti-DV antibodies crossreact with platelets and facilitate their clearance [21]. In support of this concept, serum from dengue patients can bind platelets and higher levels of antiplatelet IgM are observed in severe DV infections when compared to classical dengue fever [22]. Moreover, dengue patient serum or rabbit antinonstructural protein-1 (NS1) induce complement-mediated lysis in platelets [22,23], which may contribute to the loss of circulating platelets during dengue illness. Autoantibodies directed against NS1 target human platelets and fibrinogen and induce thrombocytopenia in mice [23,24]. A molecular mimicry mechanism has been proposed in which the C-terminal region of NS1 shows sequence homology with integrins on the surface of platelets [25]. Similarly, different regions of the C, prM and E proteins of dengue display sequence homology with coagulatory molecules such as thrombin, plasminogen and tissue plasminogen activator [25].

In clinical settings, increased levels of platelet-associated immunoglobulin (PAIgM or PAIgG) and phagocytosis of platelets by macrophages correlates with thrombocytopenia during the acute phase of secondary dengue infection [7,15]. Similarly, anti-NS1 autoantibodies or pooled sera from dengue patients enhance the engagement of immunoglobulin-opsonized platelets by macrophages [23]. Nevertheless, administration of intravenous immunoglobulin, which is commonly used to treat patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, does not increase platelet counts in dengue-infected patients [26]. This suggests that dengue-induced thrombocytopenia may not rely on Fc receptor mediated phagocytosis of platelets.

Platelet-leukocyte and platelet-endothelial cell interactions

Similar to platelets, antibodies directed against DV NS1 crossreact and activate endothelial cells [27]. Additionally, productive DV infection and activation of endothelial cells has also been reported [28,29]. Endothelial cells infected with DV display high expression of E-selectin and support the adherence of platelets [30].

Platelets that adhere to dengue-infected endothelial cells express surface P-selectin [31]. P-selectin expressing platelets are known to interact with leukocytes and DV-induced hemorrhage elicits platelet-monocyte and platelet-neutrophil aggregates in a primate model system [12]. Platelet-monocyte aggregates are also frequently observed in humans infected with dengue [32]. Increased interactions of platelets with leukocytes and endothelium are probably contributors to the pathogenesis of dengue disease, including thrombocytopenia.

Platelet dysfunction

There are a few studies examining platelet function in dengue disease. Among these, it has been shown that dengue serum abnormally activates platelets and inhibits platelet aggregation [22,23]. One mechanism for attenuated platelet aggregation involves recognition of protein disulfide isomerase (PDI) on the surface of platelets by anti-DV NS1 antibodies [33]. Specifically, anti-DV NS1 antibodies from hyperimmunized mouse sera inhibit PDI activity and platelet aggregation, a response that is alleviated when the antibodies are preabsorbed by PDI. Inhibition of platelet aggregation is induced by antibodies generated against full-length NS1, but not antibodies lacking the C-terminal region of NS1, which exhibit higher platelet binding and inactivate integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ [34]. Decreased platelet aggregation has also been attributed to increased L-arginine transport and nitric oxide generation in platelets from dengue patients [35]. Whether altered platelet

Bone Marrow Suppression	Infection of Hematopoietic Progenitors		
		<ul style="list-style-type: none"> - Altered proliferative capacity - Inhibit differentiation - Megakaryocytic progenitor apoptosis - Reduced megakaryopoiesis 	[13] [18] [19]
Increased Peripheral Platelet Destruction	Infection of Stromal Cells		
		<ul style="list-style-type: none"> - Altered cytokine profile - Inability to support colony forming cells - Impaired megakaryopoiesis 	[17] [20]
	Anti-platelet Autoantibodies		
		<ul style="list-style-type: none"> - Platelet associated immunoglobulins - Complement-mediated platelet lysis - Platelet phagocytosis through FC receptor - Retention of platelets in reticuloendothelial system 	[21 - 24]
	Platelet-Endothelial Cell and Platelet-Leukocyte Interactions		
		<ul style="list-style-type: none"> - Endothelial Activation - Platelet-endothelial cell aggregates - Platelet activation - Platelet-leukocyte aggregates - Platelet-monocyte and platelet-neutrophil interactions 	[30] [12] [32]
	Platelet-DENV Interaction		
		<ul style="list-style-type: none"> -DENV-induced platelet activation -Presence of DENV antigens in platelets -Infection of platelets by DENV 	[31] [14] [36]
Soluble Factors			
	<ul style="list-style-type: none"> -Increased cytokine production -Imbalanced coagulation/ fibrinolytic factors -Lipid mediators (Platelet Activating Factor, others) 	[37 - 41]	

Drug Discovery Today: Mechanisms

Figure 3. Overview of molecular mechanisms that contribute to dengue-induced thrombocytopenia.

function occurs *in vivo* and contributes to dengue-induced thrombocytopenia is not known.

Direct infection

Recent studies indicate that DV directly interacts and activates platelets. DV induces morphological changes in normal platelets typical of activation, including the presence of filopodia and degranulation [31]. In parallel, DV increases

the expression of surface P-selectin and fibrinogen binding [31]. Dengue viral RNA and viral-like particles have also been detected in platelets of affected patients [14]. The same group also demonstrated a low level of DV production in platelets [36], suggesting that DV may be capable of replicating in anucleate platelets through mechanisms that are yet to be established. Whether or not DV is harbored and/or propagates in platelets, contributing to platelet dysfunction and

thrombocytopenia, deserves further consideration. New studies are also required to determine if active receptor-mediated DV entry occurs in platelets. These studies, and others, will go a long way in dissecting the functional role of dengue uptake into platelets and determine the contribution of platelets to organism defense or DV transport and dissemination of infection.

Soluble mediators

Key mediators that activate platelets and induce thrombocytopenia are often present in dengue infection. Monocytes from a donor infected with DV-1 respond to a second hit of DV-2 by generating Platelet Activating Factor (PAF) [37], a lipid mediator that augments platelet aggregation [38]. This observation is in agreement with others demonstrating that thrombocytopenia and disease severity is reduced in mice lacking the PAF receptor (PAFr) [39].

Fibrin degradation products (D-dimers) and thrombin/antithrombin complexes are typically increased after dengue infection [12,40]. von Willebrand factor is likewise increased [29,41], creating a milieu for enhanced platelet activation. An array of cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) are also produced during dengue infection. These cytokines have been linked to the onset and regulation of thrombosis and hemostasis [40] and work from our group demonstrates that increased TNF- α and IL-1 β in dengue patients correlates with thrombocytopenia [6].

Targeting platelets in the treatment of dengue infection

Although thrombocytopenia is frequently observed in patients with dengue, severe bleeding is rare. When it occurs, however, excessive bleeding is associated with a high lethality. It is controversial as to whether the intensity of thrombocytopenia predicts bleeding risk in dengue patients; nonetheless, it is well accepted that severe thrombocytopenia associates with hemorrhagic manifestations. In addition, it is probable that other factors, such as disseminated intravascular coagulation (DIC), hepatic impairment and/or vascular dysfunction, act in concert with thrombocytopenia to induce bleeding.

Platelet transfusion has been used as a strategy for the prevention or treatment of severe bleeding in patients with dengue. However, recent WHO guidelines [2] do not recommend platelet transfusion for hemodynamically stable patients with thrombocytopenia. Even in patients who exhibit severe bleeding and hemodynamic instability, transfusion of platelets is only considered with restrictions. Importantly, these recommendations are based solely on the opinions of experts or small observational studies rather than randomized clinical trials.

Other treatments considered for dengue-induced thrombocytopenia include immunoglobulin (IVIg), intravenous

anti-D immune globulin (anti-D) and PAFr antagonists [26,39,42]. Of these, anti-D has shown promise in the treatment of severe thrombocytopenia in DHF patients while a PAFr antagonist relieved thrombocytopenia in a mouse model of dengue infection [42]. By contrast, IVIg did not hasten the recovery of thrombocytopenia in dengue patients with secondary DV infection [26].

Moving forward, it will be important to consider nontraditional roles of platelets in the treatment of dengue. This includes their role in regulating viral infection and replication, inflammation and vascular integrity, which may identify new molecular targets for the treatment of dengue infection.

Conclusions

Dengue is the most common vector-borne viral disease in the world. It has also been recently reported in Florida [43,44] indicating that sustained transmission of dengue within the United States is a possibility. Although mitigating and controlling dengue outbreaks remains a high priority, an increased understanding of the disease is of paramount importance. One area of investigation involves understanding dengue pathogenesis in more detail, including the mechanisms by which dengue alters platelet behavior and, as a result, induces thrombocytopenia in the clinic. This review highlights our basic knowledge base regarding dengue and platelets, which is arguably scant in nature and deserving of more in-depth investigation. Commitment to this investigative front will undoubtedly identify new hemostatic and nonhemostatic roles of platelets in dengue infection.

References

- Schmidt, A.C. (2010) Response to dengue fever – the good, the bad, and the ugly? *New Engl. J. Med.* 363, 484–487
- Organization, W.H. (2009) *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. WHO
- Schexneider, K.I. and Reedy, E.A. (2005) Thrombocytopenia in dengue fever. *Curr. Hematol. Rep.* 4, 145–148
- Kalayanarooj, S. *et al.* (2002) Dengue patients at the children's hospital, Bangkok: 1995–1999. Review. *Dengue Bull.* 26, 33–43
- Mourao, M.P. *et al.* (2007) Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets* 18, 605–612
- Bozza, F.A. *et al.* (2008) Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect. Dis.* 8, 86
- Honda, S. *et al.* (2009) Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary dengue virus infection by human macrophages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 841–845
- Whitehorn, J. and Farrar, J. (2010) Dengue. *Br. Med. Bull.* 95, 161–173
- Murphy, B.R. and Whitehead, S.S. (2011) Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 587–619
- Fink, J. *et al.* (2007) Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, e86
- Kurane, I. *et al.* (1995) Flavivirus-cross-reactive, HLA-DR15-restricted epitope on NS3 recognized by human CD4+ CD8- cytotoxic T lymphocyte clones. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 9), 2243–2249
- Lamamoon, N. *et al.* (2010) Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood* 115, 1823–1834

- 13 Nakao, S. *et al.* (1989) Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood* 74, 1235–1240
- 14 Noisakran, S. *et al.* (2009) Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 40, 253–262
- 15 Saito, M. *et al.* (2004) Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 299–303
- 16 de Araujo, J.M. *et al.* (2009) A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J. Virol. Methods* 155, 34–38
- 17 La Russa, V.F. and Innis, B.L. (2008) Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillieres Clin. Haematol.* 8, 249–270
- 18 Murgue, B. *et al.* (1997) Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *J. Infect. Dis.* 175, 1497–1501
- 19 Basu, A. *et al.* (2008) Dengue 2 virus inhibits in vitro megakaryocytic colony formation and induces apoptosis in thrombopoietin-inducible megakaryocytic differentiation from cord blood CD34+ cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 46–51
- 20 Rothwell, S.W. *et al.* (1996) Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 503–510
- 21 Lin, C.F. *et al.* (2006) Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol.* 19, 127–132
- 22 Lin, C.F. *et al.* (2001) Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J. Med. Virol.* 63, 143–149
- 23 Sun, D.S. *et al.* (2007) Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J. Thromb. Haemost.* 5, 2291–2299
- 24 Falconar, A.K. (2007) 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. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 493–504
- 25 Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy – I: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ* 308, 81–106
- 26 Dimaano, E.M. *et al.* (2007) Lack of efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin treatment of severe thrombocytopenia in patients with secondary dengue virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 1135–1138
- 27 Lin, Y.S. *et al.* (2011) Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 236, 515–523
- 28 Dalrymple, N. and Mackow, E.R. (2011) Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *J. Virol.* 85, 9478–9485
- 29 Sosothikul, D. *et al.* (2007) Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thromb. Haemost.* 97, 627–634
- 30 Krishnamurti, C. *et al.* (2002) Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 435–441
- 31 Ghosh, K. *et al.* (2008) Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* 57, 113–118
- 32 Tsai, J.J. *et al.* (2011) Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J. Innate Immun.* 3, 530–540
- 33 Cheng, H.J. *et al.* (2009) Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Mol. Immunol.* 47, 398–406
- 34 Chen, M.C. *et al.* (2009) Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J. Immunol.* 183, 1797–1803
- 35 Mendes-Ribeiro, A.C. *et al.* (2008) Dengue fever activates the L-arginine-nitric oxide pathway: an explanation for reduced aggregation of human platelets. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35, 1143–1146
- 36 Noisakran, S. *et al.* (2010) Cells in dengue virus infection in vivo. *Adv. Virol.* 1–15
- 37 Yang, K.D. *et al.* (1995) A higher production of platelet activating factor in ex vivo heterologously secondary dengue-2 virus infections. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 42, 403–407
- 38 Zimmerman, G.A. *et al.* (1996) Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell–cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416, 297–304
- 39 Souza, D.G. *et al.* (2009) Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14138–14143
- 40 Suharti, C. *et al.* (2002) The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb. Haemost.* 87, 42–46
- 41 Basuki, P.S. (2003) A glance at the von Willebrand factor in dengue virus infection. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34, 559–563
- 42 de Castro, R.A. *et al.* (2007) Thrombocytopenia associated with dengue hemorrhagic fever responds to intravenous administration of anti-D (Rh(0)-D) immune globulin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 737–742
- 43 Franco, C. *et al.* (2010) The dengue threat to the United States. *Biosecur. Bioterror.* 8, 273–276
- 44 Locally acquired Dengue – Key West, Florida, 2009–2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59, 577–581

PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation

Eugenio D. Hottz,^{1,2} Juliana F. Lopes,¹ Carla Freitas,¹ Rogério Valls-de-Souza,² Marcus F. Oliveira,³ Marcelo T. Bozza,⁴ Andrea T. Da Poian,³ Andrew S. Weyrich,^{5,6} Guy A. Zimmerman,^{1,5} Fernando A. Bozza,² and Patricia T. Bozza¹

¹Laboratório de Immunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, and ²Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; ³Instituto de Bioquímica Médica and ⁴Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; and ⁵Department of Medicine and ⁶Molecular Medicine Program, University of Utah, Salt Lake City, UT

Key Points

- Dengue infection triggers functional inflammasome assembly in platelets.
- Platelets may contribute to increased vascular permeability in dengue virus infection by synthesis and release of IL-1 β .

Dengue is the most frequent hemorrhagic viral disease and re-emergent infection in the world. Although thrombocytopenia is characteristically observed in mild and severe forms of dengue, the role of platelet activation in dengue pathogenesis has not been fully elucidated. We hypothesize that platelets have major roles in inflammatory amplification and increased vascular permeability during severe forms of dengue. Here we investigate interleukin (IL)-1 β synthesis, processing, and secretion in platelets during dengue virus (DV) infection and potential contribution of these events to endothelial permeability during infection. We observed increased expression of IL-1 β in platelets and platelet-derived microparticles from patients with dengue or after platelet exposure to DV in vitro. We demonstrated that DV infection leads to assembly of nucleotide-binding domain leucine rich repeat containing protein (NLRP3) inflammasomes, activation of caspase-1, and caspase-1-dependent IL-1 β secretion. Our findings also indicate that platelet-

derived IL-1 β is chiefly released in microparticles through mechanisms dependent on mitochondrial reactive oxygen species-triggered NLRP3 inflammasomes. Inflammasome activation and platelet shedding of IL-1 β -rich microparticles correlated with signs of increased vascular permeability. Moreover, microparticles from DV-stimulated platelets induced enhanced permeability in vitro in an IL-1-dependent manner. Our findings provide new evidence that platelets contribute to increased vascular permeability in DV infection by inflammasome-dependent release of IL-1 β . (*Blood*. 2013;122(20):3405-3414)

Introduction

Dengue is a tropical infectious disease caused by 1 of 4 dengue virus serotypes (DV-1 to DV-4). According to the World Health Organization (WHO), >2.5 billion people are at risk for contracting dengue, and >50 million individuals are annually infected.^{1,2} A progressive global expansion of dengue, including a higher frequency of severe dengue, has been recently reported, with an incidence >3 times the previously estimated by WHO.³ Dengue induces a spectrum of clinical manifestations that range from a self-limited fever to severe dengue, which is associated with life-threatening increases in vascular permeability, hypovolemia, hypotension, and shock.^{2,4} Thrombocytopenia is also commonly observed in mild and severe dengue syndromes and correlates with clinical outcome.^{2,5,6} Although thrombocytopenia is a hallmark of dengue, the role of platelet activation in the pathogenesis of dengue has not been elucidated.

Platelets are highly specialized and essential effector cells in hemostasis. Besides the hemostatic activities of platelets, it is increasingly recognized that platelets are also major inflammatory cells with key roles in innate and adaptive immune responses.^{7,8}

Platelets express, store, and/or synthesize and rapidly release a variety of factors, including cytokines that regulate interactions with endothelium and may alter endothelial functions in pathological conditions. Nevertheless the roles of platelets in inflammatory amplification and altered vascular barrier integrity in dengue have not been addressed.

Interleukin-1 β (IL-1 β) is an important proinflammatory cytokine increased during DV infection.^{5,9-11} This cytokine has been linked to increased endothelial permeability,^{5,11} thrombosis, and dysregulated hemostasis in dengue.⁹ IL-1 β is synthesized as a larger precursor protein that is cleaved into the active cytokine by inflammasomes, intracellular multimolecular complexes that control caspase-1 activity in the innate immune system. The best-characterized inflammasome contains the nucleotide-binding domain leucine rich repeat containing protein (NLRP3), an adaptor molecule known as apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC), and activated caspase-1.¹² The NLRP3-caspase-1 inflammasome responds to activation by bacterial and viral components,¹³ ATP, asbestos, monosodium urate crystals,¹⁴ and

Submitted May 27, 2013; accepted August 25, 2013. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, September 5, 2013; DOI 10.1182/blood-2013-05-504449.

F.A.B. and P.T.B. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2013 by The American Society of Hematology

production of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria.¹⁵ Increased IL-1 β has been shown in patients with dengue,⁵ and in vitro DV infection of macrophages causes inflammasome activation.¹⁶

The ability of activated platelets to splice constitutive intron-containing IL-1 β pre-RNA to produce mature IL-1 β mRNA and synthesize IL-1 β has been previously demonstrated.¹⁷⁻¹⁹ Nevertheless, the mechanisms involved in IL-1 β processing and secretion by platelets remains elusive. It has been previously shown that lipopolysaccharide (LPS)-stimulated platelets release IL-1 β packaged into microparticles (MPs).²⁰ MPs are small (0.1-1.0 μm) membrane-bound bodies that are released from cells during activation and cell death.²¹ We have previously shown that platelets from dengue patients have characteristics indicating increased activation and apoptosis,²² but whether these activated platelets synthesize IL-1 β and shed IL-1 β -containing MPs is unknown. Here we demonstrate increased expression of IL-1 β in platelets and platelet-derived MPs from patients with dengue or after platelet exposure to DV in vitro. In exploring the mechanisms involved in IL-1 β secretion from platelets, we describe for the first time the presence of inflammasome components in platelets and inflammasome activity during DV infection. Specifically, our data strongly suggest that assembly of the NLRP3-caspase-1 inflammasomes mediates IL-1 β secretion in MPs during DV infection. In addition, receptor-interacting protein (RIP) kinases and generation of ROS by mitochondria are required for caspase-1 inflammasome activation. Our results also implicate platelet synthesis of IL-1 β , caspase-1 activation, and shedding of IL-1 β -rich MPs as key effectors in vascular permeability during dengue illness.

Patients and methods

Human subjects

Peripheral vein blood samples were obtained from 36 serologically/molecularly confirmed DV-infected patients from the Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, whose characteristics are presented in Table 1. The average day of sample collection after onset of illness was 4.5 ± 1.7 . Peripheral vein blood was also collected from 22 aged-matched healthy subjects. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas #016/2010), and the experiments were performed in compliance with this protocol. Written informed consent was obtained from all volunteers prior to any study-related procedure in accordance with the Declaration of Helsinki.

The cohort was comprised of patients with mild to severe dengue. Specifically, 33.3% of the patients presented warning signs and 5.5% presented with severe dengue according to WHO guidelines² (Table 1). Levels of immunoglobulin M (IgM) and IgG specific to DV E protein were measured using a standard capture enzyme-linked immunosorbent assay kit according to the manufacturer's instructions (E-Den01M and E-Den01G; PanBio). Primary and secondary infections were distinguished using the IgM/IgG antibody ratio as previously described.²³⁻²⁵ Sixty-four percent of patients were found to have secondary DV infection.

Platelet isolation

Platelets were isolated using the methods of Hamburger and McEver.²⁶ Briefly, the peripheral blood samples were drawn into acid-citrate-dextrose and centrifuged at 200g for 20 minutes to obtain platelet-rich plasma. Platelet-rich plasma was re-centrifuged at 500g for 20 min in the presence of 100 nM Prostaglandin E1 (PGE₁) (Cayman Chemicals). The supernatant was discarded, and the platelet pellet was resuspended in 2.5 mL of phosphate-buffered saline containing 2 mM EDTA, 0.5% human albumin serum, and 100 nM PGE₁ and incubated with 10 μL of anti-CD45 tetrameric

Table 1. Characteristics of DV-infected patients

Characteristic	Control (n = 22)	Dengue (n = 36)
Age, years	30 (27-34)	38 (27-45)
Gender, male	9 (41%)	20 (55.55%)
Platelet count, $\times 1000/\text{mm}^3$	—	113.5 (81.2-162.5)
Hematocrit, %	—	43.5 (40.7-45.3)
Albumin, g/dL	—	3.7 (3.5-4.0)
TGO/AST, IU/L	—	68.5 (34.7-114.3)
TGP/ALT, IU/L	—	72 (49-105.5)
Hemorrhagic manifestations*	—	14 (38.88%)
Venous hydration	—	9 (25%)
Secondary Infection	—	23 (64%)
Mild dengue	—	22 (61.11%)
Mild dengue with warning signs†	—	12 (33.33%)
Severe dengue‡	—	2 (5.55%)
PCR positive		21
DV-1		12 (57%)
DV-2		1 (5%)
DV-4		8 (38%)

Data are expressed as median (interquartile range) or number (%).

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; TGO, glutamic-oxalacetic transaminase; TGP, glutamic-pyruvic transaminase.

*Gingival, vaginal, and/or gastrointestinal bleeding, petechiae, and purpura.

†Abdominal pain or tenderness, persistent vomiting, clinical fluid accumulation, mucosal bleed, and/or increased hematocrit concurrent with rapid decrease in platelet count; according to WHO criteria.²

‡Severe plasma leakage, fluid accumulation with ascites (evidenced by ultrasonography), and/or severe bleeding (vaginal bleed and/or gastrointestinal bleed); according to WHO criteria.²

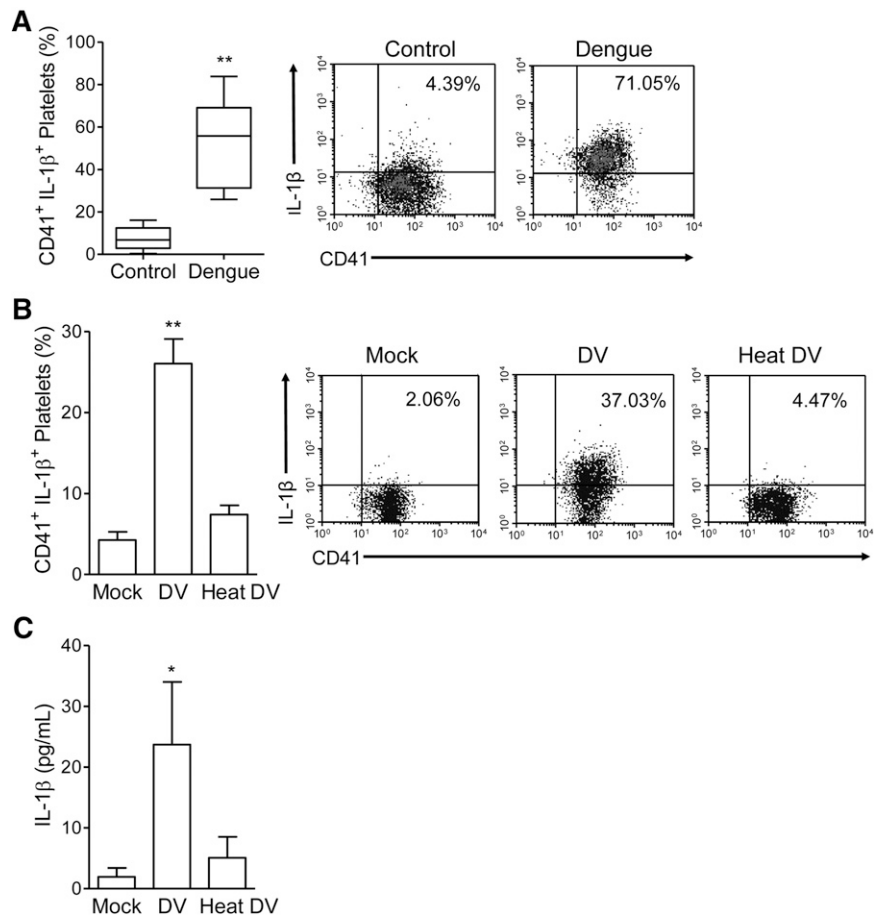
antibody complexes for 10 minutes and with 20 μL of dextran-coated magnetic beads for an additional 15 minutes before purification in a magnet (Human CD45 depletion kit; StemCell, Easy Sep Technology). Recovered platelets were resuspended in 25 mL of piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)/saline/glucose (5 mM piperazine-*N,N'*-bis[2-ethanesulfonic acid], 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 50 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂-6 H₂O, and 5.5 mM glucose) containing 100 nM of PGE₁. The platelet suspension was re-centrifuged at 500g for 20 minutes, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in medium 199 (M199; Lonza Biologics). The purity of the platelet preparations (>99% CD41⁺) was confirmed by flow cytometry.

Flow cytometric analyses

Freshly isolated platelets (10^6 - 10^7) were resuspended in 500 μL of modified Tyrode's (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 5 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, 1 mM MgCl₂, 11.9 mM NaHCO₃, 0.42 mM NaH₂PO₄, 4.7 mM glucose; pH 7.4). A minimum of 10 000 events per gate was acquired using a FACScalibur flow cytometer (BD Bioscience). The following indices were assessed: CD41 surface expression was determined by incubating (37°C for 30 minutes) platelets with a phycoerythrin- or fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies that target CD41 (eBioscience) (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); mitochondrial-derived ROS (ROS_m) was detected using the cationic probe MitoSOX Red (Molecular Probes) (2.5 μM at 37°C for 10 minutes); and activation of caspase-1 was assessed by incubating platelets with the fluorescent probe green Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspase-1 (FLICA), which irreversibly binds to activated caspase-1, according to the manufacturer's instructions (Immunochemistry Technologies). For intracellular IL-1 β determination, CD41-stained platelets were fixed with paraformaldehyde 4% for 20 minutes, washed once, and permeabilized with Triton 0.1% for 10 minutes. Platelets were then incubated for 30 minutes with anti-IL-1 β antibody (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Santa Cruz Biotechnology), followed by an additional 30-minute incubation with secondary Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit IgG. Isotype-matched antibodies were used to control nonspecific binding of antibodies. Platelets were distinguished by specific binding of anti-CD41 and characteristic forward and side scattering. MPs size was determined using 0.989- μm latex beads. Additional details regarding MPs detection and isolation are presented in supplemental Materials on the *Blood* Web site.

Figure 1. IL-1 β synthesis in DV-infected platelets and platelets from healthy volunteers.

(A) The percentage of IL-1 β -expressing platelets was assessed in platelets that were isolated from healthy subjects (control) or patients with dengue (dengue). The boxes indicate the median and interquartile ranges and the whiskers indicate 5 to 95 percentile. (B-C) Washed platelets from healthy volunteers were exposed to mock, infective DV-2 (DV) or heat-inactivated DV-2 (heat DV) as described in Patients and methods. Panel B shows the percentage of IL-1 β -expressing platelets, and panel C shows the concentration of IL-1 β in supernatants of platelets incubated in each condition. The bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM) of 8 experiments performed using samples from independent healthy donors. * $P < .05$ and ** $P < .01$ compared with healthy volunteers or mock exposed platelets. (Insets) Representative density plots of (A) IL-1 β -expressing platelets from 1 healthy volunteer and 1 dengue patient or (B) platelets from 1 healthy volunteer that were exposed to mock, DV, or heat DV. The values in each region of the quadrants indicate the cell frequencies in the respective quadrant.



Western blotting

Western blotting was performed as described in supplemental Methods. The primary antibodies used for this work were rabbit anti-human IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology) and mouse anti-human β -actin (Sigma-Aldrich).

Confocal fluorescence microscopy

Immunofluorescence for NLRP3 and ASC was performed as described in supplemental Methods. Preparations were analyzed on a FV10i-O (Olympus) confocal scanning microscope. Olympus Fluoview-FV1000 5.0 image acquisition software was used for recording.

In vitro platelet stimulation

DV serotype 2 strain 16881 was propagated in C6/36 *Aedes albopictus* mosquito cells as indicated in supplemental Methods. Platelets from healthy, uninfected donors were incubated (6 hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere) with DV-2 at a multiplicity of infection of 1 plaque forming unit per platelet. To characterize the pathways involved in platelet inflammasome activation, we preincubated platelets with the caspase-1 inhibitor YVAD-fmk (MBL International) (10 μ M), or the RIP-1 inhibitor necrostatin-1 (Nec-1; Calbiochem) (50 μ g/mL) for 30 minutes or with the mitochondrial targeted antioxidant mitoTEMPO (Enzo Life Sciences) (500 μ M) for 1 hour before DV exposure.

Cytokine measurement

The content of IL-1 β and regulated on activation normal T expressed and secreted (RANTES) in supernatants from DV-exposed platelets was measured by Luminex using a Multiplex cytokine immunoassay according to the manufacturer's instructions (Bio-Plex Human Cytokine Assay; Bio-Rad).

Transwell assay of endothelial permeability

Permeability changes in endothelial cells were determined by measuring the passage of fluorescein isothiocyanate-conjugated albumin across human dermal microvascular endothelial cell (HMEC-1) monolayers after incubation with MPs recovered from DV or mock exposed platelets. To characterize the role played by IL-1 β , we incubated HMEC-1 monolayers with the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) (10 μ g/mL). Details are given in supplemental Materials.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine whether samples followed a normal distribution. A nonparametric Mann-Whitney test was used to determine whether differences were present between 2 experimental groups. A paired 2-tailed *t* test was used to compare stimulated and nonstimulated platelets from the same healthy donor. Correlations were assessed using the Pearson test.

Results

Platelets from dengue-infected patients express IL-1 β

Activated platelets can mediate inflammatory and immune responses using a variety of mechanisms, including release of stored cytokines and newly synthesis of others.^{8,27} The ability of platelets to splice pre-mRNA and synthesize IL-1 β by translating the mature mRNA transcript has been well demonstrated in vitro.^{17,18} Most recently, synthesis of IL-1 β by platelets in vivo has been reported in mice with

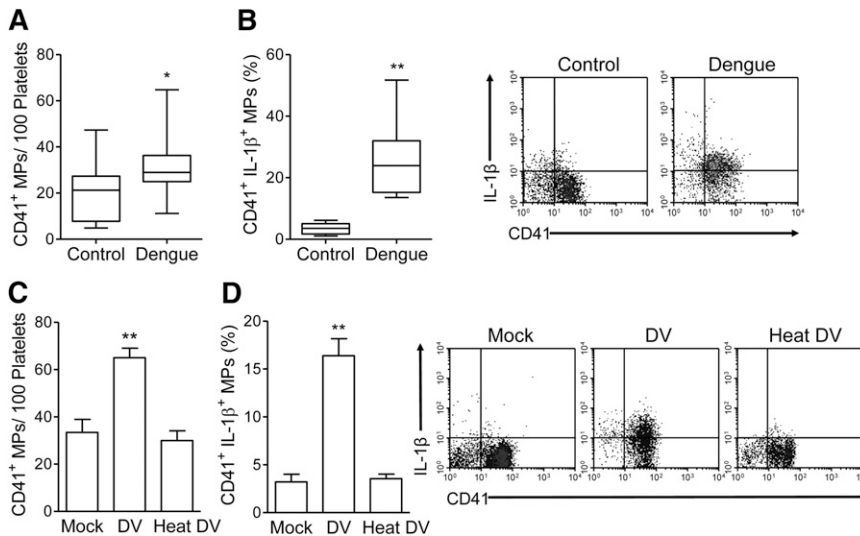


Figure 2. Dengue induces shedding of IL-1 β -rich microparticles in platelets. (A) The proportion of MPs per 100 platelets was assessed in samples from healthy subjects (control) or dengue-infected patients (dengue). (B) The percentage of IL-1 β -positive MPs in samples obtained from control participants or dengue patients. The boxes indicate the median and interquartile ranges and the whiskers indicate 5 to 95 percentile. (C-D) Washed platelets from healthy volunteers were exposed to mock, infective DV-2 (DV), or heat-inactivated DV-2 (heat DV) as described in Patients and methods. (C) The levels of platelet-derived MPs and (D) the percentage of IL-1 β -containing MPs for each condition are shown. The bars represent mean \pm SEM of 8 experiments performed using samples from independent healthy donors. * $P < .05$ and ** $P < .01$ compared with healthy volunteers or mock exposed platelets. (Insets) Representative density plots showing (B) IL-1 β -expressing MPs from 1 healthy volunteer and 1 dengue patient or (D) platelets from 1 healthy volunteer that were exposed to mock, DV, or heat DV. The values in each region of the quadrants indicate the cell frequencies in the respective quadrant.

experimental cerebral malaria.¹⁹ To assess whether platelets synthesize IL-1 β during dengue illness, platelets from healthy volunteers or DV-infected patients were labeled with an antibody that recognizes both full-length (pro) and cleaved (active) IL-1 β . The percentage of IL-1 β -expressing platelets was significantly higher ($P < .01$) in samples from patients with dengue ($53.1 \pm 20.4\%$) compared with samples from healthy volunteers ($7.5 \pm 5.7\%$) (Figure 1A).

DV induces synthesis and secretion of IL-1 β in platelets

Next we examined whether DV-2 directly induces IL-1 β synthesis in platelets from healthy volunteers yielding an expression pattern similar to that of platelets from dengue patients. Platelets from healthy donors were incubated for 6 hours with infectious DV-2, heat-inactivated DV-2, or mock. Exposure of platelets to DV significantly increased ($P < .05$) the percent of IL-1 β -positive platelets (infectious DV-2, $26.0 \pm 8.6\%$ vs $7.4 \pm 3.2\%$ or $4.2 \pm 2.8\%$ for heat-inactivated DV-2 and mock, respectively) (Figure 1B). The amounts of secreted IL-1 β were also increased in the supernatants of DV-exposed platelets compared with those exposed to mock or to heat-inactivated DV (Figure 1C). Platelet exposure to purified DV similarly increased IL-1 β synthesis. Virus purification was obtained using a Centricon YM-100 Centrifugal Filter (Merck Millipore), and platelets were exposed separately to the filtrate or to the retentate (purified virus). Exposure to purified DV-2 significantly increased ($P < .05$) the percentage of IL-1 β -positive platelets compared with the virus filtrate or to mock sample processed in parallel (purified DV-2, $31.2 \pm 12.5\%$ vs 5.9 ± 3.2 or $2.9 \pm 1.5\%$ for virus filtrate and mock retentate, respectively; data not shown). These results indicate that human platelets synthesize, accumulate, and secrete IL-1 β on DV infection.

Dengue induces shedding of IL-1 β -rich MPs in platelets

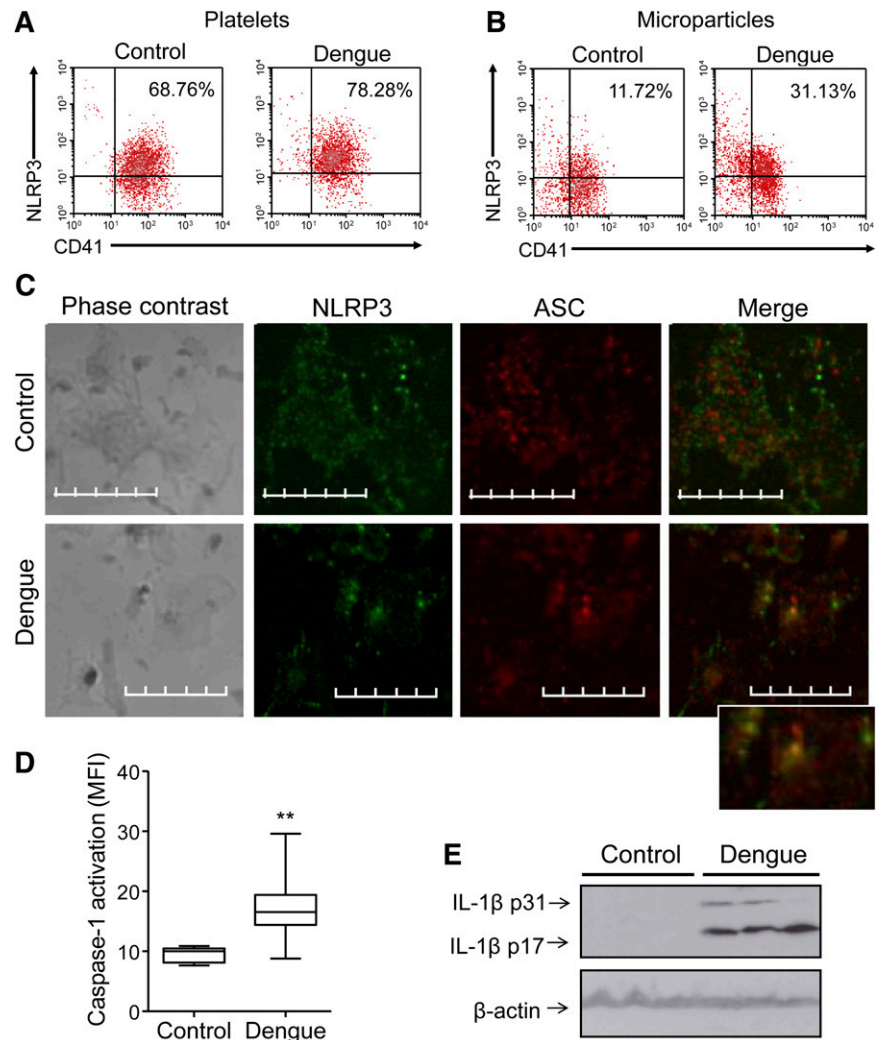
We observed higher quantities of platelet-derived MPs in samples from dengue patients compared with control participants (Figure 2A). As it was previously described that IL-1 β can be released in MPs,^{20,28} we examined platelet-derived MPs for IL-1 β . IL-1 β was detected in an average $25.3 \pm 11.2\%$ of MPs in samples from dengue patients and $3.5 \pm 1.9\%$ in controls (Figure 2B). In addition, exposure of platelets from healthy volunteers to DV-2, but not to heat-inactivated DV-2 or mock, significantly ($P < .01$) increased the shedding of MPs

(Figure 2C). The amounts of IL-1 β -containing MPs were also increased when platelets were exposed to DV-2 compared with heat-inactivated DV-2 or mock (16.4 ± 5.0 vs 3.5 ± 1.4 or 3.2 ± 2.3 , respectively, $P < .01$) (Figure 2D). Similarly, platelet exposure to purified DV increased the number of IL-1 β -rich MPs (purified DV-2, 21.9 ± 6.9 vs 3.9 ± 2.4 or 1.4 ± 0.6 for virus filtrate and mock retentate, respectively, $P < .05$; data not shown).

Activation of NLRP3 inflammasome in platelets from patients with dengue

Inflammasomes are intracellular multimolecular complexes that control caspase-1 activity in the innate immune system and are critical for IL-1 β processing and secretion. NLRP3, along with the adaptor protein ASC, mediates caspase-1 activation via assembly of the inflammasome in response to various infectious and tissue damage stimuli.¹² Inflammasome components and assembly have not been previously shown in platelets. Our preliminary RNA sequencing analyses indicate that megakaryocytes and platelets have components of the inflammasome (data not shown). Flow cytometric analysis of intracellular NLRP3 demonstrated that this key component protein is present in platelets from both patients and controls (Figure 3A). Furthermore, levels of NLRP3 were enriched in MPs from DV-infected patients compared with those from control participants (Figure 3B). To assess activation of the NLRP3 inflammasome in more depth, we examined the assembly of the NLRP3-inflammasome complex using confocal microscopy. Platelets isolated from dengue-infected patients or healthy volunteers were stained with antibodies against NLRP3 and ASC. We observed cytoplasmic colocalization of NLRP3 and ASC in platelets from dengue patients but not in platelets from healthy volunteers, in which both proteins were present but did not colocalize (Figure 3C). Consistent with these data, the intensity of caspase-1 activation was increased ($P < .01$) in platelets from dengue patients (17.11 ± 4.74 mean fluorescence intensity [MFI]) compared with controls (9.53 ± 1.28 MFI) (Figure 3D). Moreover, higher amounts of cleaved IL-1 β were observed in platelets from DV-infected patients compared with platelets from healthy volunteers by western blot (Figure 3E). Together, these results indicate the presence of the NLRP3 inflammasome components in platelets and assembly of the NLRP3 inflammasome with caspase-1 activation on DV infection.

Figure 3. Activation of the NLRP3 inflammasome in platelets from DV-infected patients. (A-B) Representative density plots showing the expression of NLRP3 in (A) platelets and (B) MPs from healthy subjects (control) or patients with dengue (dengue). The values in each region of the quadrants indicate the cell frequencies in the respective quadrant. (C) Platelets obtained from healthy subjects and patients with dengue were stained with anti-NLRP3 (green) and anti-ASC (red) and examined by confocal microscopy using an Olympus FV10i-O with a 240 \times lens. The images were processed using FLUOVIEW FV1000 MPE software version 5.0 and further analyzed using Adobe Photoshop CS Version 8.0. Bars represent 10 μ m. (D) Caspase-1 activation in platelets isolated from control participants and dengue patients was assessed by the MFI of the fluorescent probe FLICA. The boxes indicate the median and interquartile ranges and the whiskers indicate 5 to 95 percentile. ** $P < .01$ compared with healthy volunteers. (E) Western blot analysis of pro (p31) and cleaved (p17) IL-1 β and of β -actin in platelets that were isolated from 3 healthy volunteers and 3 dengue patients.



Platelet shedding of IL-1 β -containing MPs depends on caspase-1 activation

Exposure of platelets from healthy volunteers to DV-2 significantly increased ($P < .05$) the intensity of caspase-1 activation (infectious DV-2, 47.4 ± 10.6 vs 26.1 ± 9.8 or 25.8 ± 9.7 MFI for heat-inactivated DV-2 and mock, respectively) (Figure 4A), consistent with the pattern of increased activity in platelets from patients with dengue (Figure 3D). To clarify the role played by caspase-1 in platelet shedding of IL-1 β -rich MPs, we treated platelets with the caspase-1 inhibitor YVAD prior to DV exposure. As expected, pretreatment of platelets with YVAD did not affect platelet synthesis of IL-1 β (Figure 4B) but significantly reduced ($P < .05$) IL-1 β secretion by DV-exposed platelets (Figure 4C). Interestingly, platelet exposure to DV-2 in the presence of YVAD partially impaired the shedding of MPs (data not shown) and completely impaired ($P < .05$) DV-induced shedding of IL-1 β -containing MPs (Figure 4D), indicating that DV-triggered IL-1 β packaging and release into MPs depend on caspase-1 inflammasome activation.

Mitochondrial oxidant signaling induces inflammasome activation in DV-exposed platelets

Excess production of ROS by mitochondria activates the NLRP3-inflammasome assembly in monocytic cells.¹⁵ We recently reported increased generation of mitochondrial-derived ROS in platelets from

patients with dengue.²² To investigate the role played by mitochondrial-derived ROS in platelet inflammasome activation, platelets were treated with the mitochondrial targeted antioxidant mitoTEMPO prior to being exposed to DV-2. As previously demonstrated,²² generation of mitochondrial ROS was significantly higher in platelets exposed to DV-2 compared with mock or to heat inactivated DV-2. As expected, exposure of platelets to DV-2 in the presence of mitoTEMPO significantly ($P < .05$) reduced mitochondria-generated ROS (Figure 5A). Increase in caspase-1 activation and IL-1 β secretion elicited by DV-2 were similarly impaired ($P < .05$) by treatment with mitoTEMPO (Figure 5B-C), indicating that DV-triggered platelet inflammasome activation depends on mitochondrial signaling.

To determine whether antioxidant treatment impaired inflammasome activity in a selective fashion, we evaluated the effects of mitoTEMPO on DV-triggered release of the chemokine RANTES/chemokine ligand 5, which is reformed and stored in platelet granules.⁸ As shown in Figure 5D, treatment with mitoTEMPO did not inhibit the secretion of RANTES in platelets exposed to DV-2, suggesting specificity of the ROS signaling to the NLRP3 inflammasome.

Essential role for RIP proteins in DV-induced inflammasome activation in platelets

RIP-1/RIP-3 kinases have been shown to activate NLRP3-dependent caspase-1 activity by promoting mitochondrial ROS production.²⁹

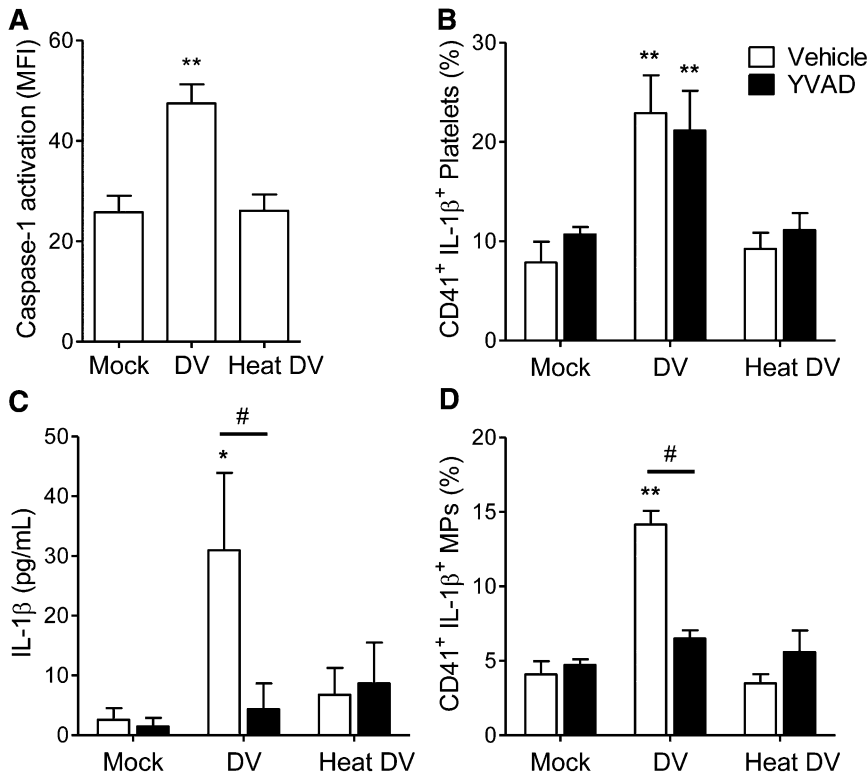


Figure 4. Platelet shedding of IL-1 β -rich MPs depends on caspase-1 activation. (A) Platelets from healthy subjects were exposed to mock, infective DV-2 (DV), or heat-inactivated DV-2 (heat DV), and caspase-1 activation was evaluated through the MFI of the fluorescent probe FLICA. (B-D) Platelets were exposed to mock, DV, or heat DV in the presence or absence of the caspase-1 inhibitor YVAD. B depicts the percentage of IL-1 β -expressing platelets, and panel C shows the concentration of IL-1 β in the supernatant of platelets incubated in each condition. Panel D shows the percentage of IL-1 β -containing MPs for each condition. The bars represent the mean \pm SEM of 6 to 8 independent experiments using samples from different healthy donors. * $P < .05$ and ** $P < .01$ compared with mock exposed platelets that received the same treatment (dimethylsulfoxide [DMSO] or YVAD). # $P < .05$ between DV-2-treated platelets that were incubated with YVAD or DMSO.

Considering the critical role for mitochondrial ROS in DV-induced activation of the inflammasome in platelets, we tested whether the RIP-1/RIP-3 inhibitor Nec-1 influences the generation of mitochondrial-derived ROS in platelets exposed to DV. As shown in Figure 5A, exposure of platelets to DV-2 in the presence of Nec-1 prevented mitochondrial generation of ROS. Consistent with inhibition of the inflammasome by mitoTEMPO and ROS being an effector in RIP signaling, activation of caspase-1 and secretion of IL-1 β elicited by DV-2 were also impaired ($P < .05$) by treatment of platelets with Nec-1 (Figure 5B-C). Similar to mitoTEMPO, treatment with Nec-1 did not affect the release of preformed RANTES by DV-stimulated platelets (Figure 5D).

Platelet IL-1 β synthesis and processing is associated to vascular permeability in dengue

Increased vascular permeability in dengue patients was evidenced by ≥ 1 of the following signs: increase in hematocrit $> 20\%$, hypoalbuminemia, postural hypotension, ascites, and/or oliguria.² According to the presence or absence of these signs, 45% of patients were classified as positive and the remaining 55% as negative for signs of increased vascular permeability. Characteristics of dengue-infected patients positive for signs of increased vascular permeability are presented in supplemental Table 1. The percentage of IL-1 β -positive platelets and IL-1 β -rich platelet-derived MPs was significantly higher ($P < .05$) in patients who had signs of increased vascular permeability ($65.4 \pm 16.4\%$ and $32.4 \pm 11.4\%$ for platelets and platelet-derived MPs, respectively) compared with patients who did not have evidence for altered vascular barrier function ($38.9 \pm 16.2\%$ and $17.3 \pm 5.2\%$ for platelets and platelet-derived MPs, respectively) (Figure 6A-B). Similar results were observed for caspase-1 activation (20.1 ± 5.2 vs 14.8 ± 2.8 for patients who were positive or negative for signs of increased vascular permeability, respectively, $P < .05$) (Figure 6C).

Moreover, we found that hematocrit values in DV-infected patients positively correlated with the percentage of IL-1 β -positive platelets, platelet-derived MPs, and IL-1 β -containing platelet-derived MPs. Further, patient serum albumin levels negatively correlated with IL-1 β -positive platelets and caspase-1 activation. There was no significant association between inflammasome activation and platelet counts (Table 2).

IL-1 β in MPs from DV-activated platelets induces increased endothelial permeability

To examine the effects of IL-1 β -containing platelet-derived MPs on endothelial permeability, we treated cultured human microvascular endothelial cells with MPs recovered from DV-2- or mock-exposed platelets before measuring permeability in a transwell assay. MPs from DV-2-exposed platelets caused an increase ($P < .05$) in permeability of HMEC-1 cells that was blocked by IL-1Ra (Figure 6D). These results indicate that IL-1 β -rich platelet-derived MPs may activate endothelium, increasing its permeability during dengue illness.

Discussion

Thrombocytopenia and hemoconcentration are hallmarks of dengue illness. Although dengue pathogenesis is not fully elucidated, recent evidence supports a central role for proinflammatory cytokines in endothelial activation and plasma leakage during DV infection.^{5,9,30} Here we show that platelets from DV-infected patients contain both pro- and mature IL-1 β (Figures 1A and 3E), which are also found in platelet-derived MPs in samples from infected patients (Figure 2B). Moreover, DV-activated platelets use caspase-1-dependent pathways to release IL-1 β -bearing MPs, which also require RIP kinases and generation of ROS by mitochondria (Figures 3-5; summarized

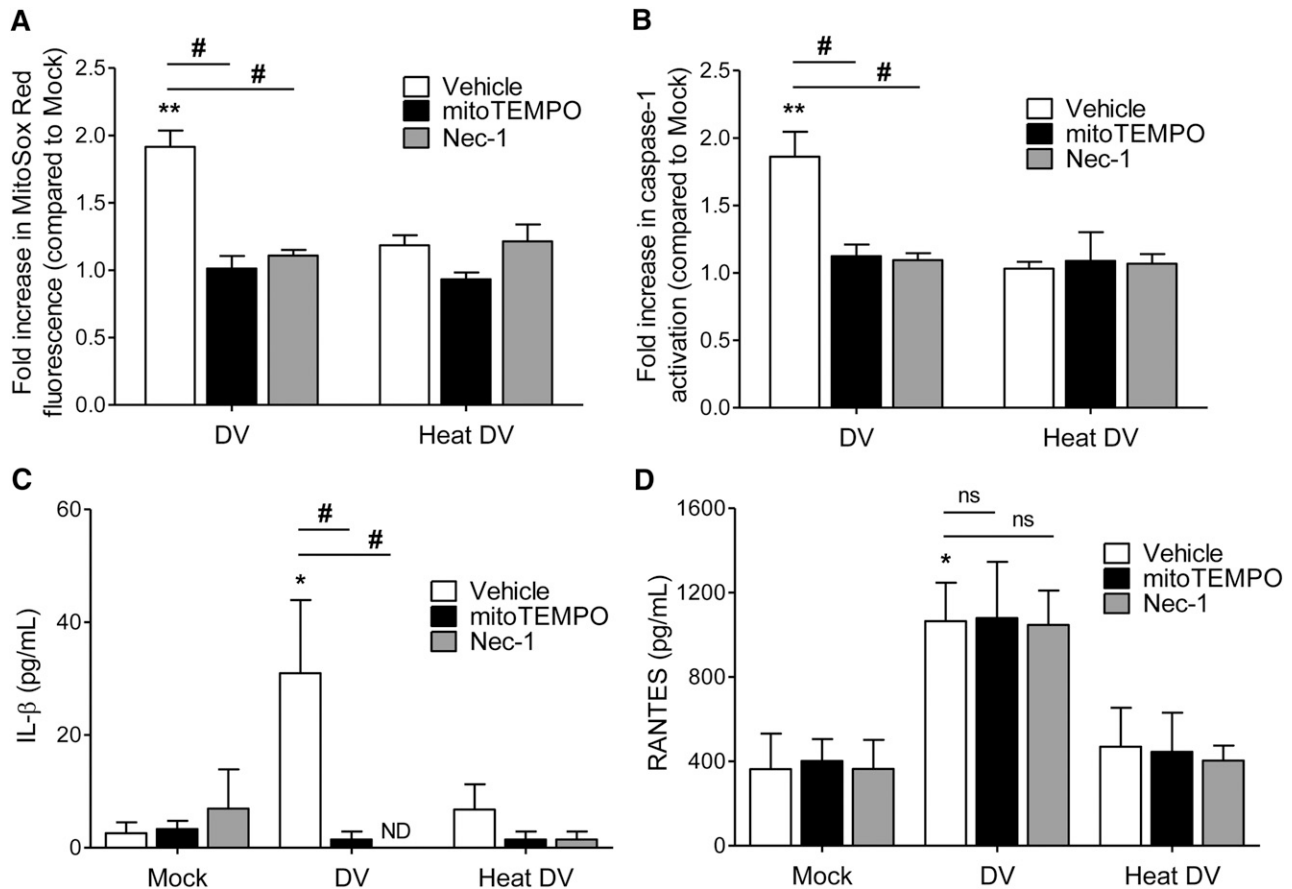


Figure 5. DV-elicited inflammasome activation depends on mitochondrial-derived ROS and RIP kinases. Platelets from healthy subjects were exposed to mock, infective DV-2 (DV), or heat-inactivated DV-2 (heat DV) in the presence or absence of the mitochondrial targeted antioxidant mitoTEMPO or the RIP1 inhibitor necrostatin-1 (Nec-1). Panels A and B show the fold changes for (A) MitoSox Red fluorescence and (B) caspase-1 activation related to mock values. (C-D) The levels of (C) IL-1 β and (D) RANTES were determined in the supernatants of platelets incubated in each condition. The bars represent the mean \pm SEM of 6 independent experiments using samples from different healthy donors. * P < .05 and ** P < .01 compared with mock exposed platelets that were treated with the same drug. # P < .05 between DV-2-exposed platelets that were incubated with mitoTEMPO or Nec-1 and platelets that were incubated with DMSO. ND, not detected; ns, nonsignificant.

in Figure 7). Our data also indicate that IL-1 β synthesis, activation of caspase-1, and release of IL-1 β -rich MPs by platelets are associated with increased vascular permeability during dengue illness (Table 2; Figure 6).

We previously demonstrated that platelets are activated in patients with dengue.²² Dengue patients in the present study similarly had increased platelet P-selectin surface expression (data not shown). It is known that activated platelets mediate inflammatory and immune responses using a variety of mechanisms, including release of stored cytokines and synthesis of others, among them IL-1 β .^{17,18,27} Our results indicate that DV induces platelets to synthesize IL-1 β . A previous report from our group demonstrates that increased IL-1 β in dengue patients correlates with thrombocytopenia.⁵ Conceivably, activated platelets may secrete high levels of IL-1 β before being cleared or eliminated through apoptosis.^{22,31}

The pathways involved in activation of post-transcriptional splicing and IL-1 β synthesis by platelets were recently described,^{20,32} but the pathways that couple IL-1 β synthesis with shedding of IL-1 β -containing MPs remained unknown.²⁰ We provide strong evidence for activation of NLRP3-inflammasome in platelets and its involvement in the shedding of IL-1 β -containing MPs. It was recently reported that generation of ROS by mitochondria regulates the NLRP3 inflammasome response in monocytic cells.¹⁵ Furthermore, RIP1-RIP3 signaling has been shown to promote mitochondrial ROS

production in response to viral infection or other proinflammatory stimuli.^{33,34} Consistent with these observations, our results indicate that RIP kinases activate caspase-1 inflammasomes in DV-exposed platelets by inducing mitochondria to generate ROS.

Increased caspase-1 gene expression was previously observed in DV-infected cultured cells.³⁵ Caspase-1-dependent IL-18 cleavage was also previously reported.³⁶ In addition, activation of the NLRP3-inflammasome was recently demonstrated in DV-infected macrophages in culture.¹⁶ Assembly of NLRP3 inflammasomes has also been described in other viral infections, including those by the DV family flavivirus.^{37,38} When hepatitis C virus infects hepatocytes, it induces the assembly of NLRP3-ASC-caspase-1 complex and, as a consequence, increases IL-1 β secretion.³⁷ Here, we observed evidence for ASC recruitment by NLRP3 leading to caspase-1 activation in platelets from DV-infected patients, providing new evidence for DV-induced inflammasome activation and its occurrence in this critical effector cell. Also, our studies indicate that activation of the caspase-1 inflammasome mediates shedding of IL-1 β -containing MPs by platelets.

Shedding of MPs occurs as a facet the larger process of platelet activation, which is characterized by a multiplicity of subevents and regulatory mechanisms. MP release from activated platelets requires calpain to cleave moesin, a protein that links the underlying actin cytoskeleton with the plasma membrane.³⁹⁻⁴¹ Calpain alone is not

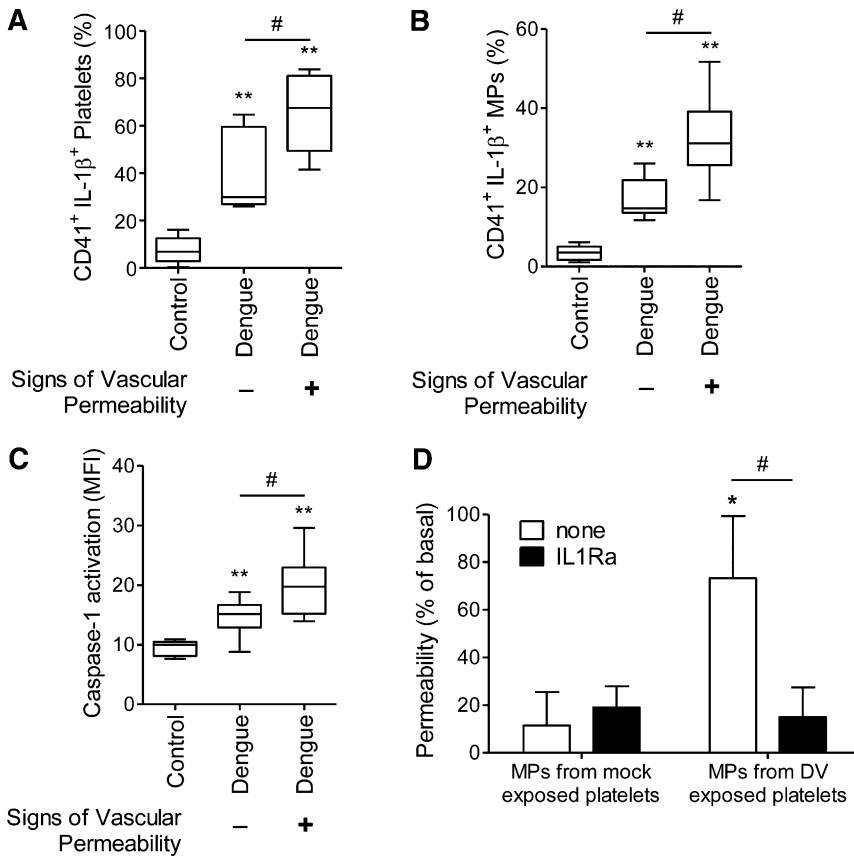


Figure 6. Vascular permeability is associated to platelet shedding of IL-1β-containing MPs. A-C show the percentage of (A) IL-1β-expressing platelets and (B) IL-1β-containing platelet-derived MPs and (C) the MFI of FLICA indicating caspase-1 activation in platelets isolated from healthy volunteers (control) or from DV-infected patients (dengue) that were positive (+) or negative (-) for signs of vascular permeability. The boxes indicate the median and interquartile ranges and the whiskers indicate 5 to 95 percentile. ***P* < .01 compared with healthy volunteers. #*P* < .05 between patients that were positive and negative for signs of increased vascular permeability. (D) Passive leakage of fluorescein isothiocyanate-conjugated albumin across endothelial cell layers was assessed after cell incubation with MPs recovered from mock- or DV-exposed platelets in the presence or absence of soluble IL-1Ra. The bars represent the mean ± SEM of 4 experiments using platelets from independent healthy donors. **P* < .05 compared with mock MP-exposed endothelial cells layers. #*P* < .05 between endothelial cells layers that were incubated with sIL-1Ra or vehicle.

sufficient, however, suggesting a requirement for other proteases.^{40,42} Here we observed partial inhibition of release of platelet MPs (data not shown) and complete inhibition of release of IL-1β-containing MPs by blocking caspase-1 activation. Consistent with our data, it was previously shown that caspase-1 and caspase-3 are involved in moesin cleavage and MP release by agonist-stimulated platelets.⁴²

MPs have been shown to modulate endothelial responses by delivering cytokines to endothelial cells. Brown and McIntyre demonstrated that IL-1β is found associated with MPs from LPS-stimulated platelets and that these MPs induced the expression of vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells in an IL-1R-dependent manner.²⁰ IL-1β-containing monocyte-derived MPs were also shown to activate human endothelial cells depending on IL-1R.⁴³ The mechanisms by which IL-1β-containing MPs induce activation of IL-1R on target cells are not completely clear. It is known, however, that IL-1β is associated with the plasma membranes of activated platelets and that it can signal endothelial cells in a juxtacrine fashion without being released into solution. This signaling is blocked by IL-1RA.⁴⁴ IL-1β associated with the membranes of platelet MP may signal in a similar fashion. Furthermore, Mause and

coworkers⁴⁵ have previously shown that platelet-derived MPs deposit RANTES on endothelial cells during transient interactions. It is also possible that a similar process enhances IL-1β delivery. We observed that MPs recovered from DV-exposed platelets triggered increased human endothelial cell permeability in a fashion dependent on IL-1β and blocked by the IL-1R antagonist. Consistent with these *in vitro* results, IL-1β synthesis, caspase-1 activation, and shedding of IL-1β-rich MPs were associated with enhanced vascular permeability in dengue-infected patients, suggesting that these events may contribute to the vasculopathy of dengue.

Although we provide evidence for IL-1β synthesis by platelets during dengue infection, we cannot exclude a contribution by other cell types. Mononuclear cells are important sources of IL-1β and IL-1β-containing MPs⁴³ and have been shown to secrete IL-1β in response to DV infection *in vitro*.¹⁶ Nevertheless, platelets may be key sources of IL-1β in inflammation and infection⁸ and are major sources of circulating IL-1β in a mouse model of malaria.¹⁹ Although this study indicates that platelets may synthesize IL-1β in dengue infection, we cannot exclude platelet endocytosis of IL-1β or IL-1β synthesis by dengue-infected megakaryocytes. Nevertheless,

Table 2. Correlations of individual components of platelet inflammasome with laboratorial data from DV-infected patients

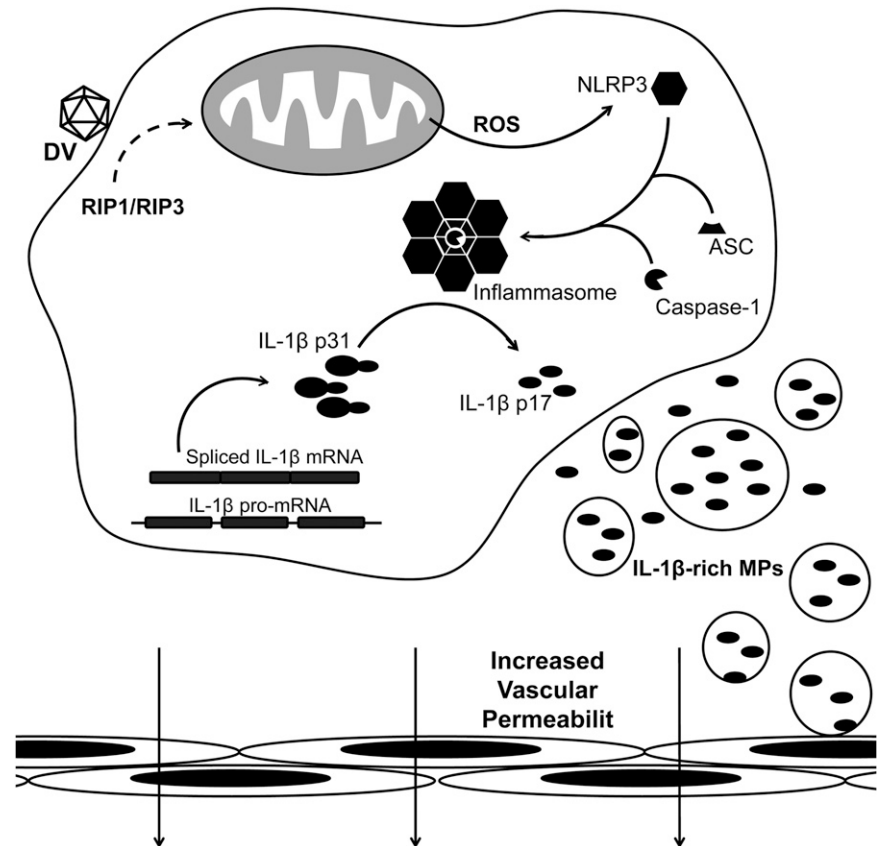
Variable	Hematocrit*		Albumin†		Platelet count*	
	Pearson <i>r</i>	<i>P</i>	Pearson <i>r</i>	<i>P</i>	Pearson <i>r</i>	<i>P</i>
IL-1β-positive platelets	0.5725	.0409	-0.5726	.0408	-0.4181	.1762
Platelet-derived MPs	0.4865	.0296	-0.2845	.2855	-0.4164	.0857
IL-1β-rich MPs	0.6003	.0301	-0.3499	.2915	-0.4069	.1892
Caspase-1 activation	0.4421	.0864	-0.5096	.0437	-0.2224	.3751

Significant correlations are in bold.

*Hematocrit and platelet count analyses were available for all 36 patients.

†Plasma levels of albumin were available for only 29 patients.

Figure 7. Schematic representation for DV-induced platelet shedding of IL-1 β -containing MPs. Platelets synthesize IL-1 β after DV exposure. In parallel, RIP1/RIP3-mediated mitochondrial ROS generation activates NLRP3, which recruits ASC and caspase-1 to assemble the inflammasome complex. Active inflammasomes cleave the full length IL-1 β (p31) into the mature cytokine (p17) and promote the shedding of IL-1 β MPs. Platelet-derived IL-1 β -containing MPs contribute to the increase in endothelium permeability.



our *in vitro* results confirm DV-triggered IL-1 β synthesis by platelets. Whether this is due to outside-in activation of intracellular signaling pathways and/or internalization of DV into platelets^{46,47} requires further investigation. We also recognize that other factors including cytokines, antibodies, and coagulation factors may also contribute to platelet activation in dengue.⁴⁸ It was previously shown that DV binding to platelets may be potentiated by the presence of DV-specific antibodies.⁴⁹ Therefore, increased an DV-IgG immunocomplex in secondary infection might potentially amplify platelet IL-1 β synthesis. It is also possible that increased LPS levels in patients with dengue⁵⁰ contribute to activation of IL-1 β synthesis and shedding of IL-1 β -containing MPs in platelets.²⁰

In summary, we report increased accumulation of IL-1 β in platelets and platelet-derived MPs from patients with dengue and synthesis of IL-1 β in platelets activated by DV *in vitro*. We also provide evidence for DV-triggered inflammasome activation in platelets and inflammasome-dependent shedding of IL-1 β -containing MPs, which likely contributes to the development of increased vascular permeability and hemoconcentration during dengue illness.

Acknowledgments

The authors thank Gisele B. Lima for virus production; Alan B. Carneiro, Edson F. Assis, and Matheus A. Rajão for technical assistance; and the Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde platform for multiplex analysis. The authors also thank Dr José Carlos Alves Filho for providing IL-1Ra.

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde/Fiocruz, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência Dengue, and National Institute of Science and Technology in Dengue, and the National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute grants (HL066277, HL091754, and HL044525 to A.S.W. and G.A.Z.).

Authorship

Contribution: E.D.H. performed the majority of experiments, data analyses, and manuscript drafting and preparation; J.F.L. performed part of experiments and analyzed data; C.F. performed part of experiments, image analyses, and manuscript drafting and preparation; M.F.O. performed the experimental design and manuscript editing/review; M.T.B. performed the experimental design and manuscript editing/review; R.V.-d.-S. performed patient enrollment, clinical classification, and experimental analyses; A.T.D.P. performed experimental design and manuscript editing/review; A.S.W. performed experimental design and manuscript editing/review; G.A.Z. performed experimental design and manuscript editing/review; and F.A.B. and P.T.B. directed all aspects of the study, data analyses, and manuscript preparation and review.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Fernando A. Bozza, Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil; e-mail: bozza.fernando@gmail.com;

or Patricia T. Bozza, Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, Brazil; e-mail: pbozza@ioc.fiocruz.br.

References

- Schmidt AC. Response to dengue fever—the good, the bad, and the ugly? *N Engl J Med*. 2010; 363(5):484-487.
- World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. *WHO Press*. 2009.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446):504-509.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J Infect Dis*. 1997; 176(2): 322-330.
- Bozza FA, Cruz OG, Zaghe SM, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*. 2008; 8:86.
- Schexneider KI, Reedy EA. Thrombocytopenia in dengue fever. *Curr Hematol Rep*. 2005; 4(2):145-148.
- Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(4):264-274.
- Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*. 2012; 34(1):5-30.
- Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost*. 2002; 87(1):42-46.
- Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanarooj S, Pulmanasahakul R, Ubol S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol*. 2009; 53(8): 442-450.
- Houghton-Triviño N, Martín K, Giaya K, Rodríguez JA, Bosch I, Castellanos JE. [Comparison of the transcriptional profiles of patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever reveals differences in the immune response and clues in immunopathogenesis]. *Biomedica*. 2010; 30(4):587-597.
- Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:707-735.
- Lamkanfi M, Dixit VM. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. *J Immunol*. 2011; 187(2):597-602.
- Martino F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006; 440(7081):237-241.
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011; 469(7329):221-225.
- Wu MF, Chen ST, Yang AH, et al. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood*. 2013; 121(1):95-106.
- Denis MM, Tolley ND, Bunting M, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005; 122(3):379-391.
- Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol*. 2008; 181(5):3495-3502.
- Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2013; 190(9): 4685-4691.
- Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1β-rich microparticles. *J Immunol*. 2011; 186(9): 5489-5496.
- Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. 2009; 101(3):439-451.
- Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(5):951-962.
- Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13(9):1044-1051.
- Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods*. 1991; 33(1-2):101-113.
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10(4):622-630.
- Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*. 1990; 75(3):550-554.
- Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003; 1(9):1897-1905.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*. 2001; 15(5):825-835.
- Vince JE, Wong WW, Gentile I, et al. Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity*. 2012; 36(2): 215-227.
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 2007; 85(1):43-45.
- Mitrakul C, Poshychinda M, Futrakul P, Sangkawibha N, Ahandrik S. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1977; 26(5 Pt 1):975-984.
- Schwartz H, Tolley ND, Foulks JM, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*. 2006; 203(11):2433-2440.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009; 137(6):1112-1123.
- Vanlangenacker N, Vanden Berghe T, Bogaert P, et al. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death Differ*. 2011; 18(4):656-665.
- Nasirudeen AM, Liu DX. Gene expression profiling by microarray analysis reveals an important role for caspase-1 in dengue virus-induced p53-mediated apoptosis. *J Med Virol*. 2009; 81(6):1069-1081.
- Yu CY, Chiang RL, Chang TH, Liao CL, Lin YL. The interferon stimulator mitochondrial antiviral signaling protein facilitates cell death by disrupting the mitochondrial membrane potential and by activating caspases. *J Virol*. 2010; 84(5):2421-2431.
- Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1β via caspase-1-inflammasome complex. *J Gen Virol*. 2012; 93(Pt 2):235-246.
- Kaushik DK, Gupta M, Kumawat KL, Basu A. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis. *PLoS ONE*. 2012; 7(2):e32270.
- Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood*. 1993; 81(10):2554-2565.
- Shcherbina A, Bretscher A, Kenney DM, Remold-O'Donnell E. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett*. 1999; 443(1):31-36.
- Shcherbina A, Kenney DM, Bretscher A, Remold-O'Donnell E. Dynamic association of moesin with the membrane skeleton of thrombin-activated platelets. *Blood*. 1999; 93(6):2128-2129.
- Shcherbina A, Remold-O'Donnell E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses. *Blood*. 1999; 93(12):4222-4231.
- Wang JG, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting JP, Mackman N. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1β-dependent manner. *Blood*. 2011; 118(8): 2366-2374.
- Kaplanski G, Porat R, Aiura K, Erban JK, Gelfand JA, Dinarello CA. Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin-8 in vitro via an interleukin-1-mediated event. *Blood*. 1993; 81(10): 2492-2495.
- Mause SF, von Hundelshausen P, Zernecke A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(7): 1512-1518.
- Noisakran S, Chokeyhaibulkit K, Songprakhon P, et al. A re-evaluation of the mechanisms leading to dengue hemorrhagic fever. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1171(Suppl 1):E24-E35.
- Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009; 40(2):253-262.
- Hottz E, Toley N, Zimmerman G, Weyrich A, Bozza F. Platelets in dengue infection. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2011; 8(1-2):e33-e38.
- Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology*. 1995; 213(1):254-257.
- van de Weg CA, Koraka P, van Gorp EC, et al. Lipopolysaccharide levels are elevated in dengue virus infected patients and correlate with disease severity. *J Clin Virol*. 2012; 53(1):38-42.

ORIGINAL ARTICLE

Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases

E. D. HOTTZ,^{*†} M. F. OLIVEIRA,[‡] P. C. G. NUNES,[§] R. M. R. NOGUEIRA,[§] R. VALLS-DE-SOUZA,[†] A. T. DA POIAN,[‡] A. S. WEYRICH,^{¶**} G. A. ZIMMERMAN,^{**} P. T. BOZZA^{*1} and F. A. BOZZA^{†1}

^{*}Laboratório de Immunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; [†]Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz; [‡]Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro; [§]Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; [¶]The Molecular Medicine Program, University of Utah; and ^{**}Department of Medicine, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA

To cite this article: Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza PT, Bozza FA. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost* 2013; **11**: 951–62.

Summary. *Background:* Worldwide, dengue is the most prevalent human arbovirus disease. Dengue infection may cause a range of clinical manifestations from self-limiting febrile illness through to a life-threatening syndrome accompanied by both bleeding and shock. Thrombocytopenia is frequently observed in mild and severe disease; however, the mechanisms involved in DENV-induced platelet activation and thrombocytopenia are incompletely understood. *Patients and methods:* Freshly isolated platelets from patients with dengue were evaluated for markers of activation, mitochondrial alteration and activation of cell death pathways. In parallel, we examined direct DENV-induced activation and apoptosis of platelets obtained from healthy subjects. *Results:* We found that platelets from DENV-infected patients exhibited increased activation by comparison to control subjects. Moreover, platelets from DENV-infected patients exhibited classic signs of the intrinsic pathway of apoptosis that include increased surface phosphatidylserine exposure, mitochondrial depolarization and

activation of caspase-9 and -3. Indeed, thrombocytopenia was shown to strongly associate with enhanced platelet activation and cell death in DENV-infected patients. Platelet activation, mitochondrial dysfunction and caspase-dependent phosphatidylserine exposure on platelets were also observed when platelets from healthy subjects were directly exposed to DENV *in vitro*. DENV-induced platelet activation was shown to occur through mechanisms largely dependent on DC-SIGN. *Conclusions:* Together our results demonstrate that platelets from patients with dengue present signs of activation, mitochondrial dysfunction and activation of the apoptosis caspase cascade, which may contribute to the development of thrombocytopenia in patients with dengue. Our results also suggest the involvement of DC-SIGN as a critical receptor in DENV-dependent platelet activation.

Keywords: apoptosis, DC-SIGN, dengue, mitochondrial dysfunction, platelet activation, thrombocytopenia.

Correspondence: Fernando A. Bozza, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: 5521 25621311; fax: 5521 25903545.

E-mail: fernando.bozza@ipecc.fiocruz.br or bozza.fernando@gmail.com

and

Patricia T. Bozza, Laboratório de Immunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: 5521 25621767; fax: 5521 25903545.

E-mail: pbozza@ioc.fiocruz.br

¹The senior authors contributed equally.

Received 11 December 2012, accepted 19 February 2013

Introduction

Dengue is an infectious disease caused by the dengue virus (DENV). Over 2.5 billion people live in high-risk transmission areas and dengue has emerged as a problem in the Southern United States [1]. It is estimated that over 50 million individuals are annually exposed to DENV [2]. The natural history of dengue is a self-limiting fever followed by a critical phase of defervescence, in which the patient may improve or progress to severe dengue that is associated with life-threatening increases in vascular permeability, hypovolemia, hypotension and shock [2,3]. Thrombocytopenia is commonly observed in both mild and severe dengue syndromes and correlates with the clinical outcome [2–6].

The potential mechanisms inciting DENV-associated thrombocytopenia were recently reviewed [7]. These include impaired thrombopoiesis [8] and/or peripheral platelet destruction. The latter may involve antibody-induced platelet clearance [9], enhanced interactions of platelets with leukocytes or endothelium [10,11] and activation of platelets as they contact the DENV [12,13]. Recent studies suggest that DENV is able to interact with platelets and, in turn, induce ultrastructural changes [12]. Platelets also become activated when they are exposed to DENV-infected endothelial cells [10] and increased numbers of platelet-monocyte aggregates have been observed in dengue patients [11]. These previous studies indicate that platelets can become activated during dengue infection, but the mechanisms underlying this process and its clinical consequences remain unknown.

Mitochondria are known to regulate apoptotic pathways in activated platelets [14–16]. Therefore, we examined platelet function in patients with dengue, focusing on how dengue influences mitochondrial function and apoptosis. We found that platelet activation is significantly increased in dengue-infected patients, especially in individuals with thrombocytopenia. Platelets from patients with dengue also had impaired mitochondrial function and exhibited signs of apoptosis pathway activation. Consistent with these findings, *in vitro* DENV infection induces similar responses of activation, mitochondrial dysfunction and apoptosis through mechanisms involving Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN). Our results suggest that DENV-induced platelet activation and apoptosis occurs through DC-SIGN-dependent mechanisms and may influence the development of thrombocytopenia in dengue.

Patients and methods

Human subjects

We prospectively followed a cohort of 39 serologically/molecularly confirmed DENV-infected patients from the Instituto Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, whose characteristics are presented in Table 1. Peripheral vein blood samples were obtained at febrile ($n = 26$), defervescence ($n = 26$) and convalescence ($n = 13$) phases of infection. The mean day of sample collection after the onset of illness was 4.5 ± 1.6 in febrile, 7.5 ± 2.4 in defervescence and 25.3 ± 12.9 in convalescence. Primary and secondary infections were distinguished using the IgM/IgG antibody ratio as previously described [2,17]. For virus typing and quantification, viral RNA was extracted (QIAamp Viral RNA; Qiagen, Valencia, CA, USA) from plasma samples and processed as previously described [18,19].

Peripheral vein blood was also collected from 30 age-matched healthy subjects and 13 patients with non-dengue febrile illness (NDFI). The disease etiologies of the NDFI

Table 1 Characteristics of dengue-infected patients

	Control (30)	Dengue (39)
Age, years	27 (26–35)	37 (26–46)
Gender, male	12 (40%)	22 (56.4%)
Platelet count, $\times 1000 \text{ mm}^{-3}$	–	107 (49–145)
Hematocrit, %	–	43.5 (40.7–45.3)
Albumin, g dL^{-1}	–	3.6 (3.1–3.9)
TGO/AST, IU L^{-1}	–	66 (35–115)
TGP/ALT, IU L^{-1}	–	69 (46–102)
Haemorrhagic manifestations*	–	11 (28.2%)
Venous hydration	–	16 (41%)
Secondary infection	–	24 (61%)
Mild dengue	–	20 (51.3%)
Mild dengue with warning signs†	–	15 (38.5%)
Severe dengue‡	–	4 (10.2%)
PCR positive	–	29
DENV-1	–	27 (93%)
DENV-2	–	02 (7%)
Viremia, $\times 10^5 \text{ copies mL}^{-1}$	–	1.5 ± 3.4

Data are expressed as median (interquartile range) or number (%).

*Gingival bleed, vaginal bleed, gastrointestinal bleed, petechiae and exanthema.

†Abdominal pain or tenderness, persistent vomiting, clinical fluid accumulation, mucosal bleed, and/or increased hematocrit concurrent with rapid decrease in platelet count. According to WHO guidelines [2].

‡Severe plasma leakage, fluid accumulation, ascites and/or massive bleeding. According to WHO guidelines [2].

patients are listed in Table S1. Written informed consent was obtained from all participants prior to any study-related procedure. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (IPEC#016/2010).

Platelet isolation

Platelets were isolated as previously described [20] and resuspended in medium 199 at 37°C . The purity of the platelet preparations ($> 99\%$ of CD41^+ events) was confirmed by flow cytometry.

Flow cytometric analysis

Platelets were resuspended in modified Tyrode's (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 , 11.9 mM NaHCO_3 , 0.42 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 4.7 mM glucose; pH 7.4). P-selectin (CD62-P) surface expression was determined using PE- or FITC-conjugated anti-human CD62P (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) ($0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$, 30 min); DC-SIGN surface expression was determined by incubating platelets with biotin-conjugated antibody against DC-SIGN (eBioscience, San Diego, CA, USA; eB-h209) ($1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, 20 min) and PE-Cy5-conjugated streptavidin ($0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, 20 min); mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured using the probe, tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, Fluka Analytical, San Diego, CA, USA) (100 nM, 10 min), mitochondrial-derived reactive oxygen species (ROS_m) were detected

using MitoSoxRed (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ($2.5 \mu\text{M}$, 10 min); active caspase-9 was determined using green FAM-LEDH-FMK, FLICA (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN, USA); and phosphatidylserine exposure was stained with FITC-conjugated Annexin V (BD Pharmingen). A minimum of 10 000 gated events were acquired using a FACScalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Diego, CA, USA).

Assessment of mitochondrial function

TMRE and MitoSoxRed were used to measure $\Delta\Psi_m$ and ROS_m , respectively. To control the mitochondrial specificity of the probes, platelets were treated with the proton ionophore FCCP ($0.5 \mu\text{M}$) 15 min before labeling. To assess mitochondrial permeability, platelets were treated with the F_1F_0 -ATP-synthase inhibitor Oligomycin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) 15 min before $\Delta\Psi_m$ labeling. Mitochondrial content was determined measuring citrate-synthase activity in platelet protein extracts ($10 \mu\text{g}$) by 412 nm spectrophotometric detection of CoA-TNB2, which formed with citrate as DTNB, acetyl-CoA and oxaloacetate interacted with one another.

Western blotting

Western blotting was performed as previously described [21]. The primary antibodies used were mouse anti-human caspase-9 and rabbit anti-human caspase-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

Virus preparation

DENV serotype 2 strain 16 881 was propagated in C6/36 *Aedes albopictus* mosquito cells and titrated by plaque assay on BHK cells [22]. The amount of infectious particles was expressed as plaque forming units (PFU) per mL. Supernatants from uninfected cell cultures (mock) were produced using the same conditions.

In vitro platelet stimulation

Platelets from healthy volunteers were incubated with thrombin (T1063; Sigma, St. Louis, MO, USA) (0.1 U mL^{-1}) or with DENV-2 (1 PFU per platelet) at 37°C for the indicated times. In selected experiments platelets were pre-incubated for 30 min with neutralizing antibodies against DC-SIGN (120507; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$), the integrin α_v subunit, or an isotype-matched antibody; or with the pan-caspase inhibitor ZVAD-fmk (BioVision, Milpitas, CA, USA) ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Statistical analysis

Statistics were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). One-

way analysis of variance (ANOVA) was used to determine differences. Bonferroni's post-hoc test was employed to identify the location of each difference between groups. The paired two-tail *t*-test was used to compare stimulated and unstimulated platelets from the same donor. Correlations were assessed using Pearson's test.

Results

Platelet activation in patients with dengue

The intensity of surface P-selectin expression (mean fluorescence intensity, MFI) on platelets was significantly ($P < 0.05$) higher in samples from patients with dengue during the febrile (51.5 ± 24.3 MFI) (41.0 ± 22.0 MFI) phases compared with the convalescence (22.9 ± 6.3 MFI) phase or healthy volunteers (16.9 ± 4.3 MFI). P-selectin expression was also higher on platelets isolated from febrile and defervescence DENV-infected patients compared with

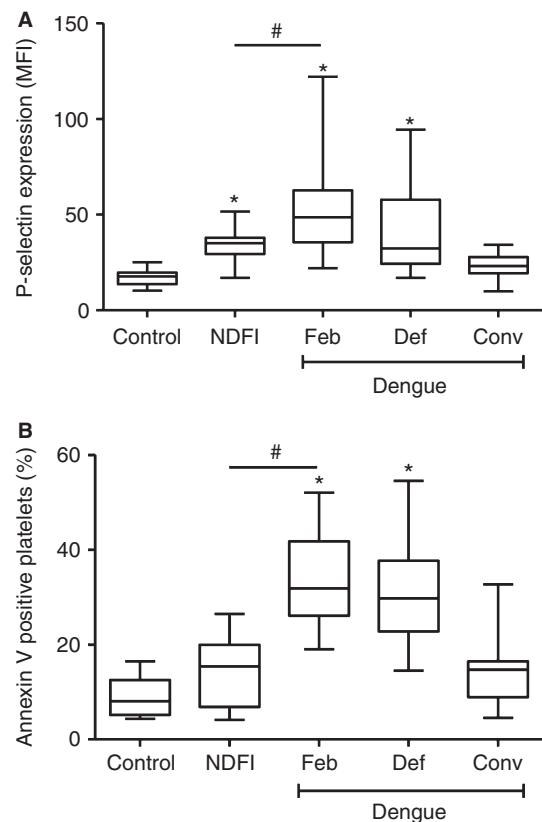


Fig. 1. Platelet activation is increased during dengue illness. The mean fluorescence intensity (MFI) of P-selectin expression (A) and the percentage of annexin V-binding platelets (B) in platelets freshly isolated from healthy subjects (control), patients with non-dengue febrile illness (NDFI), and dengue-infected patients in febrile (Feb), defervescence (Def), and convalescence (Conv) phases. Boxes indicate median and interquartile ranges and whiskers indicate 5–95 percentile. * $P < 0.05$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. non-dengue febrile illness (NDFI).

NDFI (33.8 ± 8.7 MFI) even although surface P-selectin expression was greater in NDFI compared with healthy subjects (Fig. 1A).

Phosphatidylserine exposure on platelets (percentage of positive platelets) was similarly increased ($P < 0.01$) in patients in febrile ($34.4 \pm 10.4\%$) and defervescence ($31.6 \pm 10.7\%$) dengue phases vs. patients in the convalescence phase ($14.1 \pm 7.3\%$), healthy volunteers ($9.1 \pm 4.2\%$), or NDFI ($14.3 \pm 7.6\%$) (Fig. 1B).

Platelet activation is associated with thrombocytopenia during dengue disease

Using platelet counts determined on the day of sample collection, patients were classified as thrombocytopenic (TCP) ($<150\,000\text{ mm}^{-3}$) or non-thrombocytopenic (NTCP). Based on this grouping, 14 patients in the febrile phase were TCP whereas 12 were NTCP. The breakdown was similar in dengue patients in the defervescence phase (14 TCP and 10 NTCP patients). P-selectin surface expression was higher in TCP dengue patients (61.5 ± 27.5 MFI for febrile and 49.3 ± 25.2 MFI for defervescence) vs. NTPC (39.8 ± 13.0 for febrile and 29.8 ± 6.6 MFI for defervescence) (Fig. 2A).

Moreover, we found that platelet counts in DENV-infected patients inversely correlated with surface P-selectin expression and phosphatidylserine exposure (Fig. 2B, C). This relationship between thrombocytopenia and platelet activation was similarly observed during the course of the disease (Fig. 2D).

Mitochondrial dysfunction in platelets from patients with dengue

Mitochondria are important regulators of the intrinsic pathways of apoptosis [23]. They also regulate activation responses and procoagulant activity in platelets [24], and loss of $\Delta\Psi_m$ occurs in platelets that become apoptotic after activation [14,15] or aging during storage [16,25]. As shown in Fig. 3A, the proton ionophore FCCP significantly reduced $\Delta\Psi_m$ in platelets isolated from healthy subjects or DENV-infected patients. However, basal $\Delta\Psi_m$ was significantly ($P < 0.01$) reduced in platelets isolated from dengue-infected patients in febrile (14.6 ± 3.5 MFI) and defervescence (14.6 ± 4.1 MFI) compared with dengue patients in the convalescence (21.8 ± 3.6 MFI), NDFI (20.5 ± 4.6 MFI), or healthy volunteers (23.2 ± 4.6 MFI) (Fig. 3B). As expected, $\Delta\Psi_m$ was significantly increased when platelets from healthy subjects were incubated with oligomycin, which inhibits mitochondrial H^+ -ATP synthase. This increase, however, was not observed when platelets from dengue patients were exposed to oligomycin (Fig. 3C).

Next, we assessed citrate-synthase activity in platelets and found no differences between dengue patients and controls (Fig. 3D). These results indicate that perturbation

in $\Delta\Psi_m$ are result of increased mitochondrial permeability and not a reduction in mitochondrial content.

As shown in Fig. 3E,F, platelets from DENV-infected patients constitutively generate ROS_m . Treatment of the platelets with FCCP confirmed that ROS were derived from mitochondria (Fig. 3E). Basal production of ROS_m was significantly ($P < 0.05$) higher in platelets from dengue patients at both febrile (14.2 ± 3.8 MFI) and defervescence (11.8 ± 2.7 MFI) phases compared with dengue patients at the convalescence (8.4 ± 0.9 MFI), NDFI (9.7 ± 2.2 MFI) and healthy subjects (8.4 ± 1.3 MFI) (Fig. 3F).

Platelet apoptosis in patients with dengue

Increased phosphatidylserine exposure and mitochondrial depolarization suggest that apoptotic pathways are more active in platelets from DENV-infected patients. Consistent with this possibility, we found that phosphatidylserine exposure negatively correlated with $\Delta\Psi_m$ in platelets from dengue patients (Fig. 4A). To assess activation of apoptosis pathways in more depth, we measured activation of caspase-9 and -3 in platelets during dengue illness. Caspase-9 activation was significantly ($P < 0.01$) higher in platelets isolated from febrile (15.3 ± 3.2 MFI) and defervescence dengue patients compared with healthy subjects (8.5 ± 1.7 MFI), dengue patients in convalescence (8.8 ± 2.5 MFI) and NDFI (11.3 ± 2.3 MFI) (Fig. 4B). Higher amounts of cleaved caspase-9 and -3 were also observed by Western blot in DENV-infected patients compared with healthy volunteers (Fig. 4C).

DENV-2 induces activation, mitochondrial dysfunction and apoptosis in platelets

Next, we determined whether DENV-2 directly activates platelets yielding similar responses to those of platelets from dengue-infected patients. Platelets from healthy donors were incubated with DENV-2 or mock for 1, 30 min, 1.5, 3 and 6 h. Incubation of platelets with DENV-2 significantly increased surface P-selectin expression at 6 h compared with mock (55.2 ± 5.7 vs. 30.7 ± 12.4 MFI; $n = 4$, $P = 0.019$). The kinetics of P-selectin presentation on the surface of platelets exposed to DENV-2 was distinct from that of thrombin stimulation, suggesting that DENV activates platelets through different mechanisms (Fig. 5A).

Six hours exposure to purified DENV-2 similarly activated platelets (Fig. 5B). Virus purification was obtained using a Centricon YM-100 Centrifugal Filter (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) and platelets from healthy subjects were exposed separately to the filtrate or to the retentate (purified virus) resuspended in medium. Exposure of platelets to purified DENV-2 significantly increased surface P-selectin expression compared with the virus filtrate or to mock sample processed in parallel (purified DENV-2, 49.6 ± 12.5 MFI vs. 23.6 ± 14.5 MFI

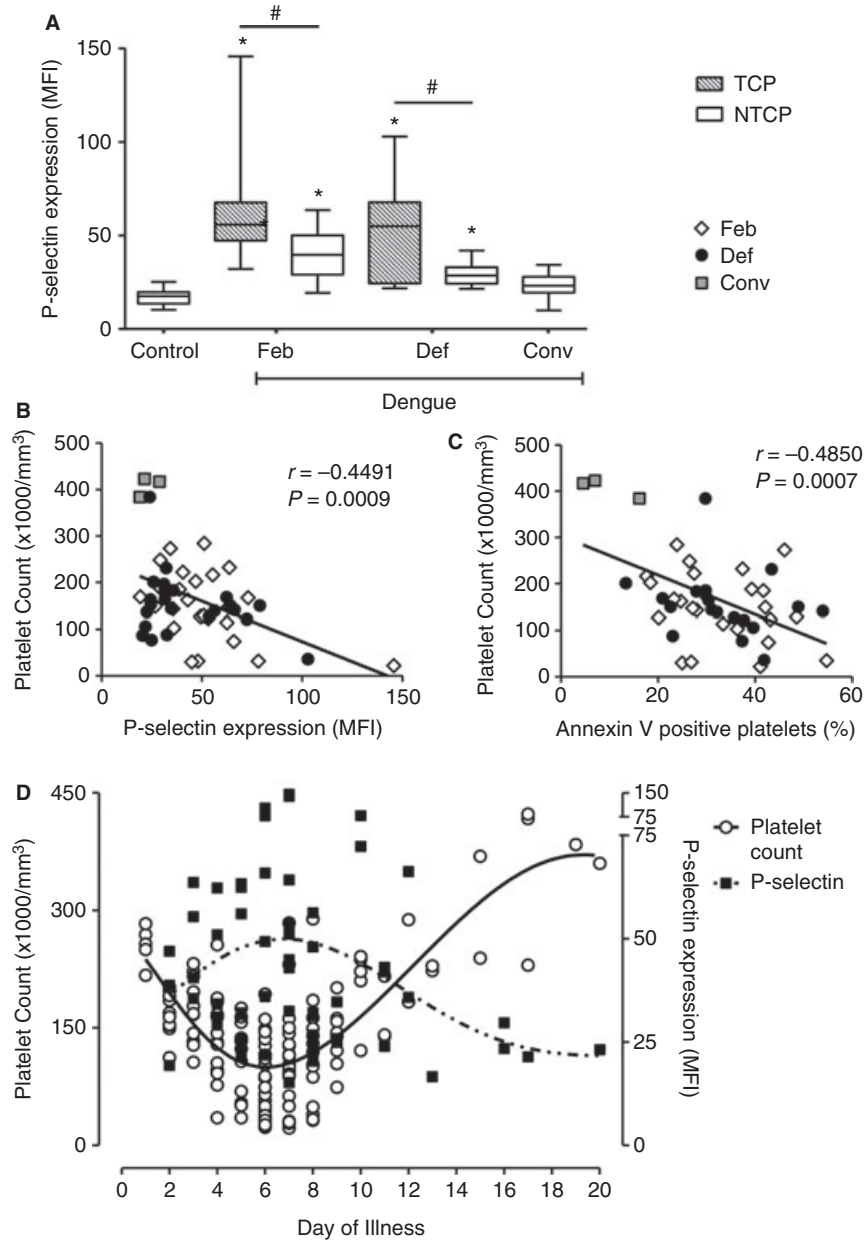


Fig. 2. Platelet counts in patients with dengue correlate with indices of platelet activation. (A) The mean fluorescence intensity (MFI) of P-selectin expression in thrombocytopenic (TCP) and non-thrombocytopenic (NTCP) dengue patients. Boxes indicate the median and interquartile ranges and whiskers indicate 5–95 percentile. (B–C) Platelet counts were plotted against the MFI of P-selectin expression (B) and the percentage of annexin V-binding platelets (C) in febrile (Feb) defervescence (Def) and convalescence (Conv) phases. In Panels B and C the analysis was restricted to platelet counts obtained on the same day that P-selectin and phosphatidylserine were analysed. (D) Platelet counts and the MFI of P-selectin expression were plotted against the day of illness in which each value was obtained. Non-linear regressions were traced according to the distribution of dots. * $P < 0.05$ vs. control; # $P < 0.01$ TCP vs. NTCP.

or 32.6 ± 13.7 MFI for virus filtrate and mock retentate, respectively; $n = 4$, $P < 0.05$).

Phosphatidylserine exposure on platelets was also increased after 6 h of incubation with DENV-2 ($68.7 \pm 11.5\%$ vs. $19.2 \pm 11.8\%$ of positive platelets; $n = 4$, $P = 0.0052$) (Fig. 5C). To investigate the proportion of phosphatidylserine exposed as a result of platelet activation or apoptosis, platelets were incubated with DENV in presence of the pan-caspase inhibitor ZVAD-

fmk. Blocking caspase activity did not affect P-selectin expression (Fig. 5D), but significantly ($P < 0.05$) impaired phosphatidylserine exposure on platelets (Fig. 5E). These data demonstrate that most of phosphatidylserine exposure depends on apoptosis pathways and only a small proportion depends on platelet activation.

In addition to infective DENV-2, we also exposed platelets to heat-inactivated virus (56°C , 1 h). Heat inactivation prevented DENV-2 from increasing P-selectin

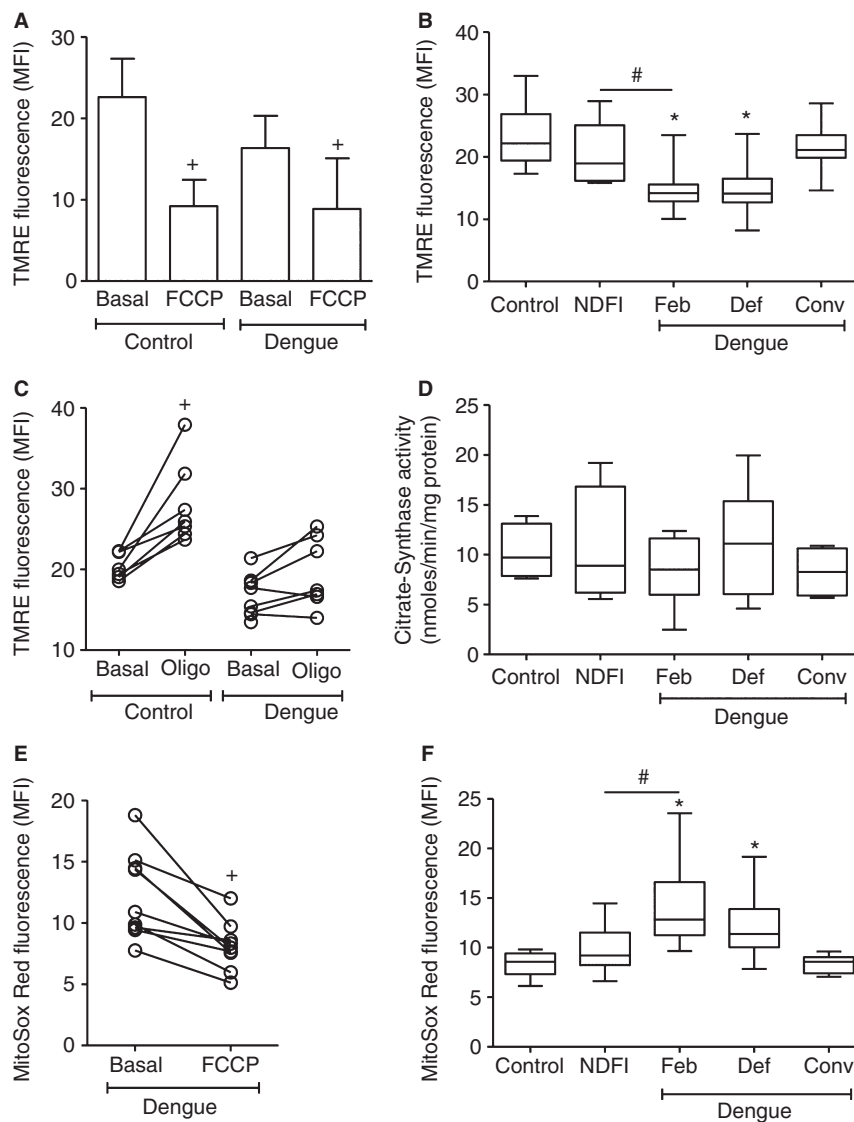


Fig. 3. Mitochondrial function is impaired in platelets from dengue-infected patients. (A–C) The mean fluorescence intensity (MFI) for TMRE, (D) the Citrate-Synthase activity, and (E–F) the MFI of MitoSoxRed in platelets from healthy subjects (control), patients with non-dengue febrile illness (NDFI), and dengue-infected patients in febrile (Feb), defervescence (Def), or convalescence (Conv) phases. (A, C and E) Mitochondrial responses in platelets treated with FCCCP or oligomycin. Bars (A) depict the mean \pm standard error of the mean (SEM) of 7–9 healthy participants and dengue patients; dots (C and E) represent tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) or MitoSoxRed fluorescence in platelets from control or dengue patients before (basal) and after the treatments. Boxes (B, D and F) indicate median and interquartile ranges and whiskers indicate 5–95 percentile. + P < 0.05 vs. basal; * P < 0.05 vs. control; # P < 0.05 vs. NDFI.

and phosphatidylserine on the surface of platelets (Fig. 5D,E).

DENV-2 also significantly impaired mitochondrial function in platelets as evidenced by a reduction in TMRE fluorescence (infectious DENV-2, 18.2 ± 7.4 MFI vs. 31.6 ± 18.3 MFI or 31.3 ± 12.3 MFI for heat-inactivated and mock, respectively; $n = 6$, $P < 0.01$) and increased MitoSOX Red fluorescence (infectious DENV-2, 38.3 ± 13.8 MFI vs. 23.5 ± 7.7 MFI or 24.6 ± 6.4 MFI for heat inactivated-DENV-2 and mock, respectively; $n = 6$, $P < 0.01$) (Fig. 6A,B). Activated caspase-9 was also significantly higher in platelets exposed to DENV-2 (infectious DENV-2, 50.4 ± 11.5 MFI vs.

28.6 ± 12.3 MFI or 29.0 ± 5.6 MFI for heat-inactivated DENV-2 and mock, respectively; $n = 4$, $P < 0.01$) (Fig. 6C). Furthermore, a negative correlation was observed between $\Delta\Psi_m$ and phosphatidylserine exposure (Fig. 6D). We observed that platelets with high phosphatidylserine exposure concomitantly exhibited reduced TMRE fluorescence (Fig. 6D insets).

DENV-2 activates platelets through pathways that involve DC-SIGN

Previous studies in other cell types have shown that DENV particles interact with surface molecules that include DC-

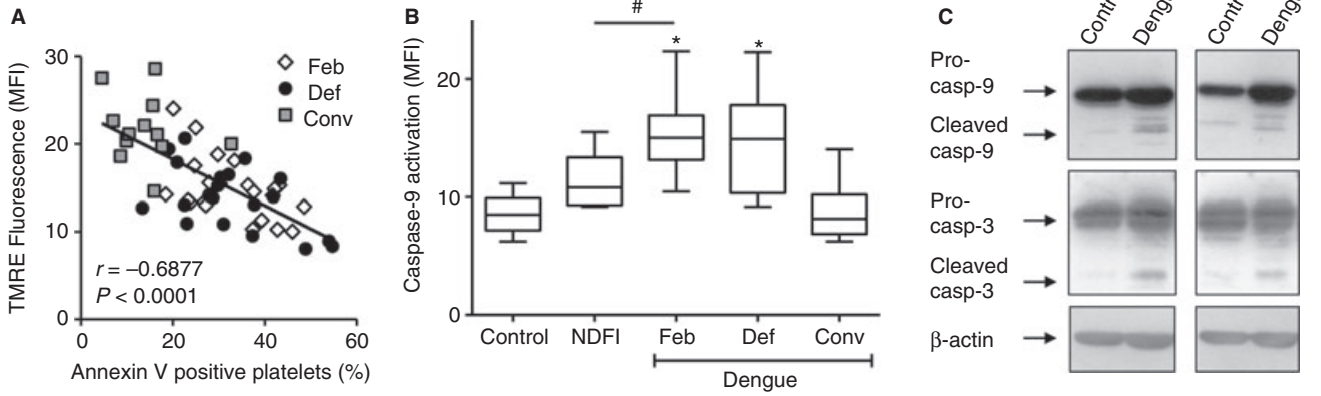


Fig. 4. Platelets apoptosis in patients with dengue. (A) The mean fluorescence intensity (MFI) for tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) was plotted against the percentage of annexin V-binding platelets in febrile (Feb), defervescence (Def) and convalescence (Conv) dengue phases. (B) The MFI of caspase-9 activation in platelets freshly isolated from healthy subjects (control), patients with non-dengue febrile illness (NDFI) and dengue-infected patients in Feb, Def, and Conv. Boxes indicate median and interquartile ranges and whiskers indicate 5-95 percentile. (C) Western analysis of pro- and cleaved caspase-9 (casp-9) and caspase-3 (casp-3), and β -actin in platelets isolated from control or dengue patients (representative of 5). * $P < 0.01$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. NDFI.

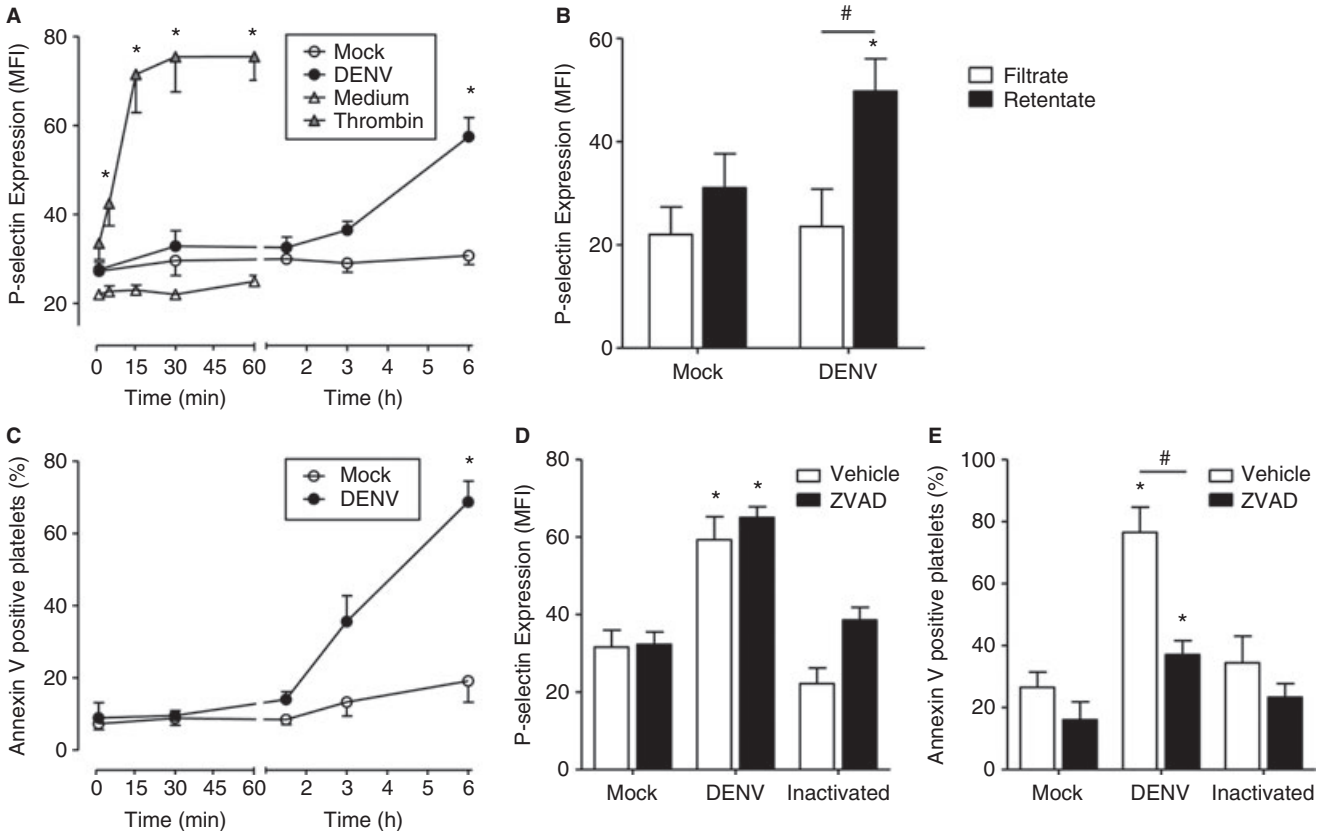


Fig. 5. DENV-2 induces platelet activation. The mean fluorescence intensity (MFI) of P-selectin expression (A, B and D) and the percentage (%) of annexin V-binding platelets (C and E) in platelets exposed to DENV *in vitro*. (A and C) Platelets were exposed to mock or DENV-2 for 1, 30 min, 1.5, 3 or 6 h; or activated with thrombin for 1, 5, 15, 30 min or 1 h. (B) Platelets were exposed (6 h) to the filtrate or the retentate of DENV-2 purified through centrifugation in a Centricon Filter, or mock processed in parallel. (D and E) Platelets were exposed (6 h) to mock, DENV or heat-inactivated DENV in the presence of the pan caspase inhibitor ZVAD-fmk. Dots and bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM) of four independent experiments from individual donors. * $P < 0.05$ vs. mock; # $P < 0.05$ vs. DENV filtrate or ZVAD-fmk treated platelets.

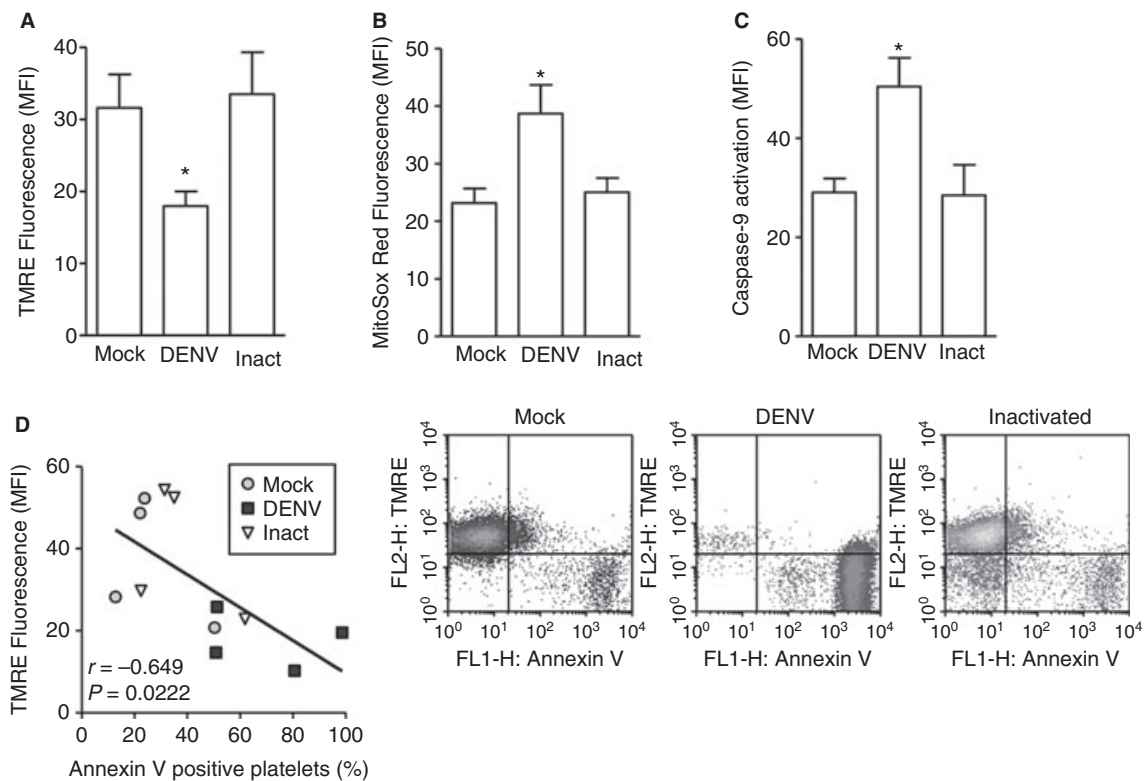


Fig. 6. DENV-2 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in platelets. The mean fluorescence intensity (MFI) for tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) (A), MitoSoxRed (B) and caspase-9 activation (C) in platelets exposed for 6 h to mock, DENV-2 or heat-inactivated DENV-2. The bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM) of 4–6 independent experiments from individual donors. (D) The MFI for TMRE was plotted against the percentage of annexin V-binding platelets. Representative density plots are shown. * $P < 0.01$ vs. mock.

SIGN and integrin $\alpha_v\beta_3$ [26,27]. Although these receptors have been reported in platelets [28,29], they have not been linked to DENV-induced platelet activation. To investigate their roles in platelet activation, platelets were incubated with neutralizing antibodies against DC-SIGN or α_v integrin subunit prior to exposure to DENV-2. Blocking of DC-SIGN, but not α_v , prevented DENV-2 from increasing P-selectin expression on the surface of platelets (Fig. 7A). Decreased $\Delta\Psi_m$ elicited by DENV-2 was similarly rescued by anti-DC-SIGN antibodies (Fig. 7B).

To clarify the role played by DC-SIGN-expressing platelets in DENV-induced platelet activation, we analyzed surface P-selectin expression in DC-SIGN-stained platelets gated as DC-SIGN positive or negative. DC-SIGN positive platelets ranged from 13.4% to 37.5% ($21.4 \pm 8.5\%$) (Fig. 7C). DENV exposure did not affect DC-SIGN expression on platelets (Fig. 7D). As shown in Fig. 7E, DC-SIGN positive platelets exhibited increased P-selectin expression compared with DC-SIGN negative (51.8 ± 14.6 MFI for DC-SIGN+ vs. 31.4 ± 3.2 MFI for DC-SIGN-; $n = 4$, $P = 0.0398$).

Discussion

Thrombocytopenia is a common manifestation of dengue infection. Increased platelet clearance may occur in den-

gue infection as consequence of platelet activation. However, the mechanisms underlying this remain elusive. Here, we show that platelets from dengue patients display classic signs of apoptosis that include increased phosphatidylserine exposure, mitochondrial depolarization and activation of caspase-9 and -3. Moreover, thrombocytopenia in patients with dengue strongly correlates with enhanced platelet activation and apoptosis. Our data also implicate DC-SIGN as a critical receptor in DENV-dependent platelet activation.

Abnormal platelet function has been reported in dengue [30], but the underlying mechanisms are not fully understood. We consistently observed that platelets from DENV-infected patients were more activated compared with healthy subjects. Moreover, platelet activation was more pronounced in thrombocytopenic patients. This suggests that dengue may activate platelets and, as a result, facilitate platelet deposition in micro-vessels and/or clearance. Consistent with this hypothesis, increased phagocytosis of platelets by macrophages in patients with dengue was recently reported [6]. Sequestration of platelets in the liver and spleen of dengue-infected patients have also been observed [31].

Many factors influence platelet survival, which is reduced in patients with dengue [31]. One of these involves the intrinsic pathway of apoptosis [16]. It is

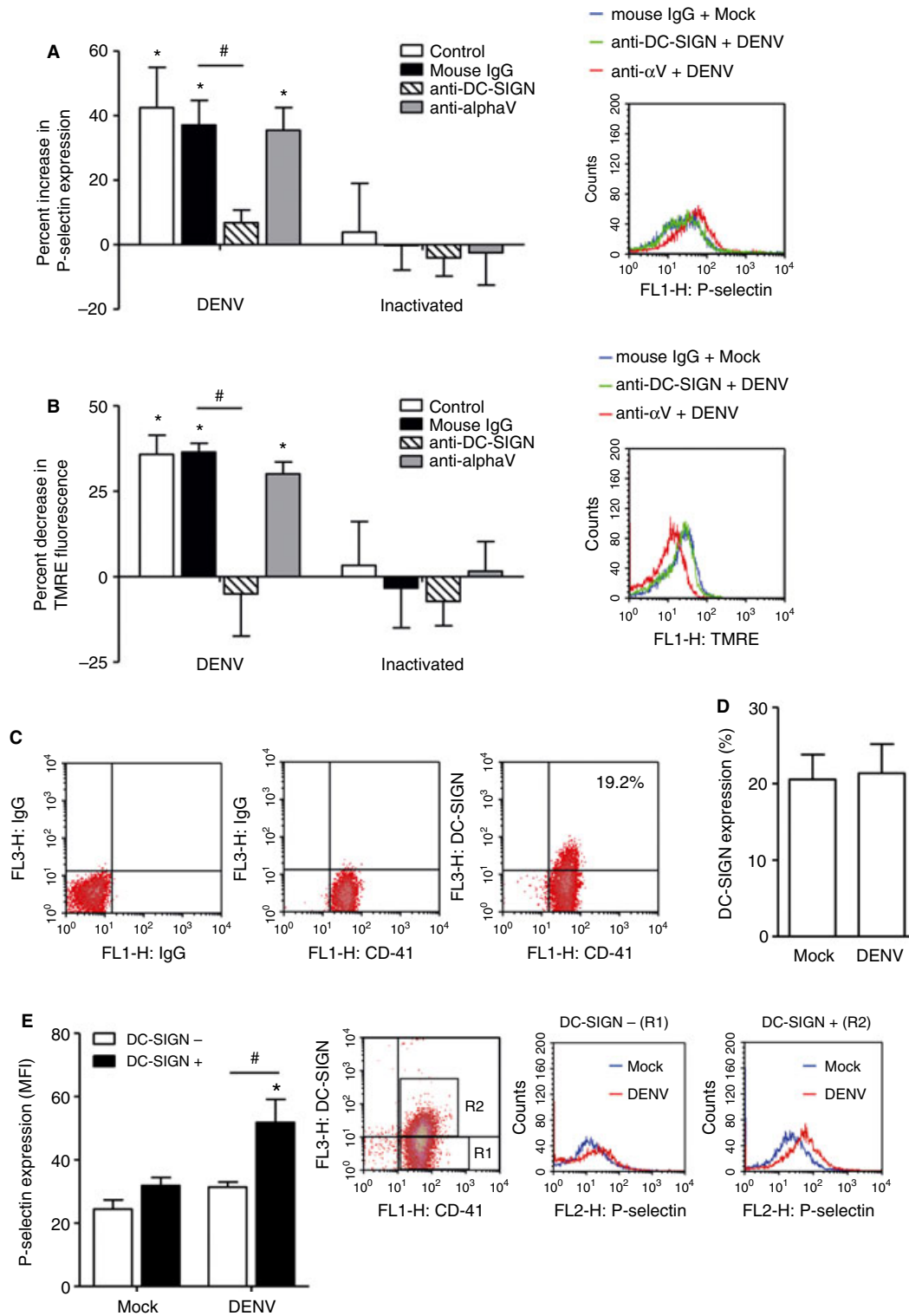


Fig. 7. DENV-2 activates platelets through mechanisms that involve DC-SIGN. Platelets were exposed for 6 h to mock, DENV-2 or heat-inactivated DENV-2 in the presence or absence of neutralizing antibodies against DC-SIGN or the α_V integrin subunit. The percentage increase in P-selectin expression (A) or percentage decrease in tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) fluorescence (B) related to mock values are shown. (C) Representative density plots showing the expression of DC-SIGN on platelets. (D) The percentage of DC-SIGN-expressing platelets exposed to mock or DENV. (E) Platelets exposed to mock or DENV-2 were stained for P-selectin and DC-SIGN. The mean fluorescence intensity (MFI) for P-selectin expression was assessed on platelets gated as DC-SIGN negative (DC-SIGN⁻) or positive (DC-SIGN⁺). Representative histograms and density plots are shown next to their corresponding graphs. Bars represent the mean \pm standard error of the mean (SEM) of four independent experiments from individual donors. * $P < 0.05$ vs. mock; # $P < 0.05$ between anti-DC-SIGN or IgG isotype (A and B); or between DC-SIGN⁻ and DC-SIGN⁺ (E).

widely accepted that DENV induces apoptosis in host cells [32,33]. When DENV infects hepatocytes it increases mitochondrial permeability and, as a consequence, induces apoptosis [33]. We similarly observed mitochondrial dysfunction and apoptosis in platelets from patients with dengue. Moreover, DENV-induced phosphatidylserine exposure *in vitro* was largely dependent on caspase activation as assessed by ZVAD blockade, further supporting apoptotic-dependent mechanisms of cell death. Conceivably, mitochondrial dysfunction followed by activation of apoptosis pathways in platelets may contribute to the genesis of thrombocytopenia in dengue. Consistent with this possibility, we found that platelet counts in dengue-infected patients inversely correlate with phosphatidylserine exposure (Fig. 2C) and positively correlate with $\Delta\Psi_m$ ($r = 0.4612$, $P < 0.001$) (data not shown).

It was previously reported that platelet activation and apoptosis followed distinct kinetics during dengue illness [34]. We similarly observed that phosphatidylserine exposure remained higher whereas P-selectin presentation recovered to normal levels (data not shown). Platelet apoptosis has been shown to follow the platelet activation *in vitro* [35]. However, this was not the case in dengue infection, as P-selectin expression and phosphatidylserine exposure were concomitantly increased during the initial phase of infection. Furthermore, the kinetics of P-selectin expression and phosphatidylserine exposure were similar in platelets incubated with DENV *in vitro* (Fig. 5), suggesting that platelet apoptosis is directly induced by DENV. Other factors beyond DENV exposure may be responsible for platelet apoptosis in non-viremic phases. Although our results showed activation of the mitochondrial pathway of apoptosis, we cannot exclude participation of other cell death pathways as necrosis or apoptosis by extrinsic pathways.

In addition to mitochondrial dysfunction and activation of apoptosis pathways, we found that DENV-2 directly activated platelets isolated from healthy donors. Consistent with our observations, Ghosh *et al.* [12] previously demonstrated that DENV-2 induces morphological features of activation in platelets. Although these data indicate that the virus can directly activate platelets, we recognize that other factors can contribute to platelet activation including antibodies, cytokines, endothelial activation and coagulation factors among others [7]. It was previously shown that DENV-specific antibodies may potentiate DENV binding to platelets [36]. Thus, increased serum IgG levels in patients with secondary dengue may also contribute to platelet activation, even although we did not find significant differences in platelet activation and apoptosis from primary or secondary dengue infections (Table S2). Also, although in our study patients with severe dengue exhibited a trend towards increased platelet activation and apoptosis (data not shown), it was not possible to determine whether this correlates with more severe clinical outcome owing to the small size of our cohort.

The mechanisms by which dengue induces platelet activation are not known. Here we show that DC-SIGN supports DENV-induced P-selectin surface expression and mitochondrial dysfunction in platelets. Boukour *et al.*, [28] previously demonstrated that platelets express DC-SIGN, a C-type lectin receptor that has demonstrated roles in DENV recognition in dendritic cells [26]. Blockade of DC-SIGN on the surface of platelets prevents DENV-2 from activating platelets and impairing $\Delta\Psi_m$. Whether this is as a result of outside-in activation of DC-SIGN signaling pathways and/or internalization of DENV-2 into platelets requires further investigation. Regarding the latter, DC-SIGN facilitates entry of HIV into platelets [28] and DENV has been detected in platelets [13,37]. If DENV entry is necessary to induce platelet activation and apoptosis, other receptors such as FC γ RIIa may be also involved, as it can mediate DENV entry in macrophages [38] and has demonstrated roles in *Staphylococcus aureus*-induced platelet activation [39].

In summary, we show that platelets from dengue-infected patients have impaired mitochondrial function and evidence of apoptosis, which probably contributes to the development of thrombocytopenia in dengue disease. As DENV can trigger mitochondrial dysfunction and platelet activation through mechanisms that involve DC-SIGN, therapeutic strategies that prevent DENV from interacting with DC-SIGN on platelets may have a role in the treatment of dengue-associated thrombocytopenia.

Addendum

E.D. Hottz, performed the majority of experiments, data analyzes and manuscript drafting and preparation; P.C.G. Nunes, performed virological and immunological analyses from patient plasma; R.M.R. Nogueira, experimental design and manuscript editing/review; M.F. Oliveira, experimental design and manuscript editing/review; R. Valls-de-Souza, patient enrolment and experimental analyzes; A.T. Da Poian, experimental design and manuscript editing/review; A.S. Weyrich, experimental design and manuscript editing/review; G.A. Zimmerman, experimental design and manuscript editing/review; P.T. Bozza and F.A. Bozza, directed all aspects of the study, data analyzes, and manuscript preparation and review.

Acknowledgements

We thank Gisele B. Lima for virus production, and Alan B. Carneiro, Luiz Felipe G. Souza, Edson F. Assis and Monique R. Q. Lima for technical assistance.

Funding

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), PAPES/FIOCRUZ, INBEB and PRO-NEX Dengue; and from the National Institutes of Health (HL066277, HL091754, and HL044525 awarded to A.S.W. and G.A.Z).

Disclosure of Conflict of Interests

The authors declare no competing financial interests.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Characteristics of patients with non-dengue febrile illness (NDFI).

Table S2. Platelet activation, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in platelets from patients with primary and secondary dengue infection.

References

- Schmidt AC. Response to dengue fever—the good, the bad, and the ugly? *N Engl J Med* 2010; **363**: 484–7.
- WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009.
- Torrez EM. Dengue. *Estudos Avanzados* 2008; **22**: 33–52.
- Mourao MP, Lacerda MV, Macedo VO, Santos JB. Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets* 2007; **18**: 605–12.
- Schexneider KI, Reedy EA. Thrombocytopenia in dengue fever. *Curr Hematol Rep* 2005; **4**: 145–8.
- Honda S, Saito M, Dimaano EM, Morales PA, Alonzo MT, Suarez LA, Koike N, Inoue S, Kumatori A, Matias RR, Natividad FF, Oishi K. Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary dengue virus infection by human macrophages. *Am J Trop Med Hyg* 2009; **80**: 841–5.
- Hottz E, Toley N, Zimmerman G, Weyrich A, Bozza F. Platelets in dengue infection. *Drug Discov Today Dis Mech* 2011; **8**: e33–8.
- La Russa VF, Innis BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillieres Clin Haematol* 1995; **8**: 249–70.
- Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol* 2006; **19**: 127–32.
- Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66**: 435–41.
- Tsai JJ, Jen YH, Chang JS, Hsiao HM, Noisakran S, Perng GC. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun* 2011; **3**: 530–40.
- 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. *J Electron Microscop* 2008; **57**: 113–8.
- Noisakran S, Chokephaibulkit K, Songprakhon P, Onlamoon N, Hsiao HM, Villinger F, Ansari A, Perng GC. A re-evaluation of the mechanisms leading to dengue hemorrhagic fever. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1171**: E24–35.
- Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 2656–63.
- Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Thrombin induces activation and translocation of Bid, Bax and Bak to the mitochondria in human platelets. *J Thromb Haemost* 2008; **6**: 1780–8.
- Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DC, Kile BT. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007; **128**: 1173–86.
- Falconar AK, De Plata E, Romero-Vivas CM. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccine Immunol* 2006; **13**: 1044–51.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 545–51.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4977–83.
- Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996; **97**: 1525–34.
- Alves LR, Costa ES, Sorgine MH, Nascimento-Silva MC, Teodosio C, Barcena P, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Orfao A, Oliveira PL, Maya-Monteiro CM. Heme-oxygenases during erythropoiesis in K562 and human bone marrow cells. *PLoS ONE* 2011; **6**: e21358.
- Conceicao TM, El-Bacha T, Villas-Boas CS, Coello G, Ramirez J, Montero-Lomeli M, Da Poian AT. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect* 2010; **60**: 65–75.
- Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2012; **942**: 157–83.
- Jobe SM, Wilson KM, Leo L, Raimondi A, Molkentin JD, Lentz SR, Di Paola J. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood* 2008; **111**: 1257–65.
- Verhoeven AJ, Verhaar R, Gouwerok EG, De Korte D. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion* 2005; **45**: 82–9.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Bix DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003; **197**: 823–9.
- Zhang JL, Wang JL, Gao N, Chen ZT, Tian YP, An J. Up-regulated expression of beta3 integrin induced by dengue virus serotype 2 infection associated with virus entry into human dermal microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **356**: 763–8.
- Boukour S, Masse JM, Benit L, Dubart-Kupferschmitt A, Cramer EM. Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 426–35.
- Paul BZ, Vilaire G, Kunapuli SP, Bennett JS. Concurrent signaling from Galphaq- and Galphai-coupled pathways is essential for agonist-induced alphavbeta3 activation on human platelets. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 814–20.
- Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000; **13**: 261–76.
- Mitrakul C, Poshyachinda M, Futrakul P, Sangkawibha N, Ahandrik S. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977; **26**: 975–84.

- 32 Courageot MP, Catteau A, Despres P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv Virus Res* 2003; **60**: 157–86.
- 33 El-Bacha T, Midlej V, Pereira da Silva AP, Silva da Costa L, Benchimol M, Galina A, Da Poian AT. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1772**: 1158–66.
- 34 Alonzo MT, Lacuesta TL, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LA, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis* 2012; **205**: 1321–9.
- 35 Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. *Br J Haematol* 2008; **142**: 494–7.
- 36 Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology* 1995; **213**: 254–7.
- 37 Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, Jarman RG, Malasit P, Choekhaibulkit K, Perng GC. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; **40**: 253–62.
- 38 Wahala WM, Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses* 2011; **3**: 2374–95.
- 39 Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcγRIIIa receptor. *Mol Microbiol* 2006; **59**: 212–30.

Emerging Concepts in Dengue Pathogenesis: Interplay between Plasmablasts, Platelets, and Complement in Triggering Vasculopathy

Eduardo J.M. Nascimento^{1,2,**}, Eugenio D. Hottz^{5,6,**}, Tatiana M. Garcia-Bates³, Fernando Bozza⁵, Ernesto T.A. Marques, Jr.^{1,2,7}, & Simon M. Barratt-Boyes^{1,2,4,*}

¹Center for Vaccine Research and Departments of ²Infectious Diseases and Microbiology, ³Otolaryngology, and ⁴Immunology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA; ⁵Laboratório de Immunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, and ⁶Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; and ⁷Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

*Address correspondence to: Simon M. Barratt-Boyes, Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, 3501 Fifth Avenue, Pittsburgh, Pennsylvania, USA; Tel.: (1) 412 383 7537; Fax: (1) 412 624 4440; Email: smb@pitt.edu

ABSTRACT: Dengue is a mosquito-borne disease caused by infection with dengue virus (DENV) that represents a serious and expanding global health threat. Most DENV infections are inapparent or produce mild and self-limiting illness; however a significant proportion results in severe disease characterized by vasculopathy and plasma leakage that may culminate in shock and death. The cause of dengue-associated vasculopathy is likely to be multifactorial but remains essentially unknown. Severe disease is manifest during a critical phase from 4 to 7 days after onset of symptoms, once the virus has disappeared from the circulation but before the peak of T-cell activation, suggesting that other factors mediate vasculopathy. Here, we present evidence for a combined role of plasmablasts, complement, and platelets in driving severe disease in DENV infection. Massive expansion of virus-specific plasmablasts peaks during the critical phase of infection, coincident with activation of complement and activation and depletion of platelets. We propose a step-wise model in which virus-specific antibodies produced by plasmablasts form immune complexes, leading to activation of complement and release of vasoactive anaphylatoxins. Platelets become activated through binding of complement- and antibody-coated virus, as well as direct binding of virus to DC-SIGN, leading to the release of inflammatory microparticles and cytokines and sequestration of platelets in the microvasculature. We suggest that the combined effects of anaphylatoxins, inflammatory microparticles, and platelet sequestration serve as triggers of vasculopathy in severe dengue.

KEY WORDS: Cell activation, immune dysregulation, immune complexes, inflammation

ABBREVIATIONS: CR: complement receptor; DENV: dengue virus; FcγR: Fcγ receptor; MBL: mannose-binding lectin; NS1: non-structural protein-1; PAF: platelet-activating factor

I. INTRODUCTION

Dengue is the most important mosquito-borne viral disease of humans worldwide, with more than two billion people living in endemic areas and 50 to 100 million new infections occurring each year.¹ Dengue is caused by infection with dengue virus (DENV), a positive-strand RNA virus of the family Flaviviridae

with four distinct serotypes: DENV-1 -2, -3 and -4. DENV infections can be asymptomatic or produce a spectrum of clinical disease from mild, self-limiting illness to severe dengue, characterized by systemic plasma leakage that may culminate in shock and death.² Many factors have been associated with disease severity in dengue, including age, female sex, host immunity, and virus fitness,^{3,4} and the etiology of

**These authors contributed equally.

the laboratory and clinical changes that characterize severe disease is likely to be complex. A key clinical feature of dengue is the occurrence of vasculopathy during a critical phase between 4 to 7 days after the onset of symptoms. Epidemiologic data indicate that immunity to one DENV serotype increases the risk of developing severe dengue upon infection with a second serotype to which the individual is immunologically naïve.^{5,6} The leading hypothesis to explain this finding is antibody-dependent enhancement, in which sub-neutralizing concentrations of DENV-specific antibodies bind virus and facilitate infection of Fc receptor-bearing cells.⁷ This phenomenon may contribute to increased virus production early in the course of infection, but it is not likely to be a direct driver of vasculopathy, as virus burden wanes several days before the critical phase.⁸ Systemic T-cell activation with subsequent production of proinflammatory cytokines is a well-described event in severe dengue;⁹ however, this too is temporally dissociated from disease, generally peaking after hemoconcentration and other signs of plasma leakage have occurred.¹⁰ In this review, we consider three different components of the human response to DENV infection that occur coincident with the critical phase of infection: the acute B-cell response, activation and dysregulation of complement, and activation and depletion of platelets. Additionally, we discuss how the interplay between these responses may trigger the vasculopathy that defines severe dengue.

II. B CELLS IN IMMUNITY TO DENGUE

A. Differentiation of B Cells in Viral Infection

During a primary virus infection, naïve B cells located in the extrafollicular foci of secondary lymphoid organs can become activated without T-cell help, differentiating into antibody-secreting cells that contribute to the early immune response. Generally, these cells have not undergone affinity maturation and produce “natural” antibodies of the IgM isotype.^{11,12} Alternatively, naïve B cells engage antigen and migrate to germinal centers where, with CD4+ T-cell help,

they undergo somatic hypermutation, affinity maturation, and class switch recombination, becoming either plasmablasts or long-lived memory B cells. It is still unknown whether naïve B cells have the capacity to become long-lived plasma cells or whether only germinal center-derived plasmablasts or memory cells have this capability.^{13,14} Long-lived plasma cells reside in bone marrow, where they are responsible for the maintenance of antibodies in serum. Memory B cells remain in secondary lymphoid organs and are able to react quickly after secondary antigenic challenge, becoming short-lived plasmablasts. Circulating human plasmablasts can be identified by flow cytometry as CD19+CD10– mature B cells that are CD27+CD21–CD38+CD20–, distinguishing them from activated memory B cells, which have low or absent expression of CD38 and continue to express CD20.^{15,16}

B. B Cell Response to DENV

1. Humoral Immunity

The serum antibody response to DENV has been studied in depth. DENV-specific antibodies in immune individuals generally are broadly cross-reactive for all DENV serotypes,^{17,18} although antibody specificities appear to be different during primary and secondary DENV infections and throughout the course of disease.^{17–19} Other reports have characterized immortalized memory B cells isolated from immune individuals and have shown that the majority of B cells has specificity against envelope or precursor-membrane proteins that are reactive across serotypes and can induce antibody-dependent enhancement.^{20–23} Antibodies specific to non-structural protein-1 (NS1), which is not incorporated into virions but is found in the cellular membrane or secreted into the extracellular environment,^{24–26} are highly cross-reactive with very poor neutralizing capacity,²² and studies have suggested that NS1-specific antibodies may contribute to pathogenesis.^{27–29} The disparity between antibody half-life (several weeks) and the period of disease (several days) indicates that it is unlikely that NS1-specific antibodies are directly involved in increased capillary permeability. It is more plausible that

immune complexes with NS1 and virus particles serve to activate complement in DENV infection which impacts disease, as discussed in the following section.

2. Plasmablast Response during Acute DENV Infection

a. Kinetics of Plasmablast Expansion

Recent studies have shown that acute DENV infection results in a profound surge in the frequency of plasmablasts in the circulation peaking within 4 to 7 days after the onset of symptoms, coincident with the critical phase of disease.^{30–33} Plasmablasts dominate the B-cell compartment during this expansion, frequently constituting 70% or more of circulating B cells, and the vast majority of these plasmablasts has specificity for DENV.^{31,32} By comparison, plasmablast frequencies in healthy individuals are approximately 0.14% of circulating B cells,³⁴ and following vaccination against influenza or yellow fever viruses, this proportion increases to 2–3%.^{35,36} In primary infection with HIV, which is characterized by hyperactivity and terminal differentiation of B cells and hypergammaglobulinemia, the proportion of B cells that is comprised of plasmablasts may reach 5%,¹⁵ but only a small fraction of these plasmablasts is HIV-specific.³⁷ Hence, while a direct comparison remains to be conducted, the current data suggest that the frequency of virus-specific plasmablasts in individuals with acute DENV infection may be substantially higher than that induced by other virus infections. The degree of B-cell activation, proliferation, and apoptosis in acutely infected individuals approaches that of T cells,³¹ although whether activated B cells themselves produce proinflammatory cytokines and contribute to immune activation in dengue remains to be determined.

b. Potential Contribution of Plasmablasts to Complement and Platelet Activation

Plasmablast expansion closely mirrors the onset of severe disease in DENV-infected individuals, and evidence in adult patients suggests that the magnitude of the response is greatest in severe secondary infections;³¹ hence, it is tempting to speculate that plasmablasts contribute in some way to disease.

Whether plasmablasts comply with the concept of original antigenic sin³⁸ by producing antibodies that preferentially neutralize the previously encountered virus rather than the infecting virus, facilitating antibody-dependent enhancement, is a key question, and data available to date are somewhat contradictory.^{30–33} Recent studies suggest that plasmablasts that are expanded during acute secondary DENV infection produce antibodies with significantly different specificities from those made by long-lived plasma cells and secreted into serum.³⁹ The fact that virus production in plasma peaks several days before detectable expansion of plasmablasts makes it unlikely that plasmablast-derived antibodies play a significant role in promoting virus replication per se, although the possibility exists that tissue reservoirs of virus persist and are impacted by plasmablast-derived antibodies. Here, we consider an alternative contribution of plasmablasts to dengue pathogenesis—the production of virus-specific antibodies that leads to activation of complement and aids in the activation of platelets. In the following sections, we discuss the findings relating to complement and platelet activation in dengue and how this activation may ultimately trigger vasculopathy (Fig. 1).

III. COMPLEMENT ACTIVATION IN DENGUE

A. Complement Cascade

The complement system is a component of the innate immune response that can be activated through the classical, alternative, and lectin-dependent pathways, resulting in inflammation and lysis of pathogens and infected cells. The classical pathway is activated mostly by antibody-antigen complexes⁴⁰ that interact with C1 complex (C1q, C1r, and C1s). The lectin pathway is initiated by mannose-binding lectin (MBL) or ficolin in complex with MBL-associated serine proteases after interaction with carbohydrate residues on the surface of pathogens. The activation of the classical and lectin pathways leads to the activation of the C3 convertase (C4b2b). The alternative pathway is activated by the binding of C3b,

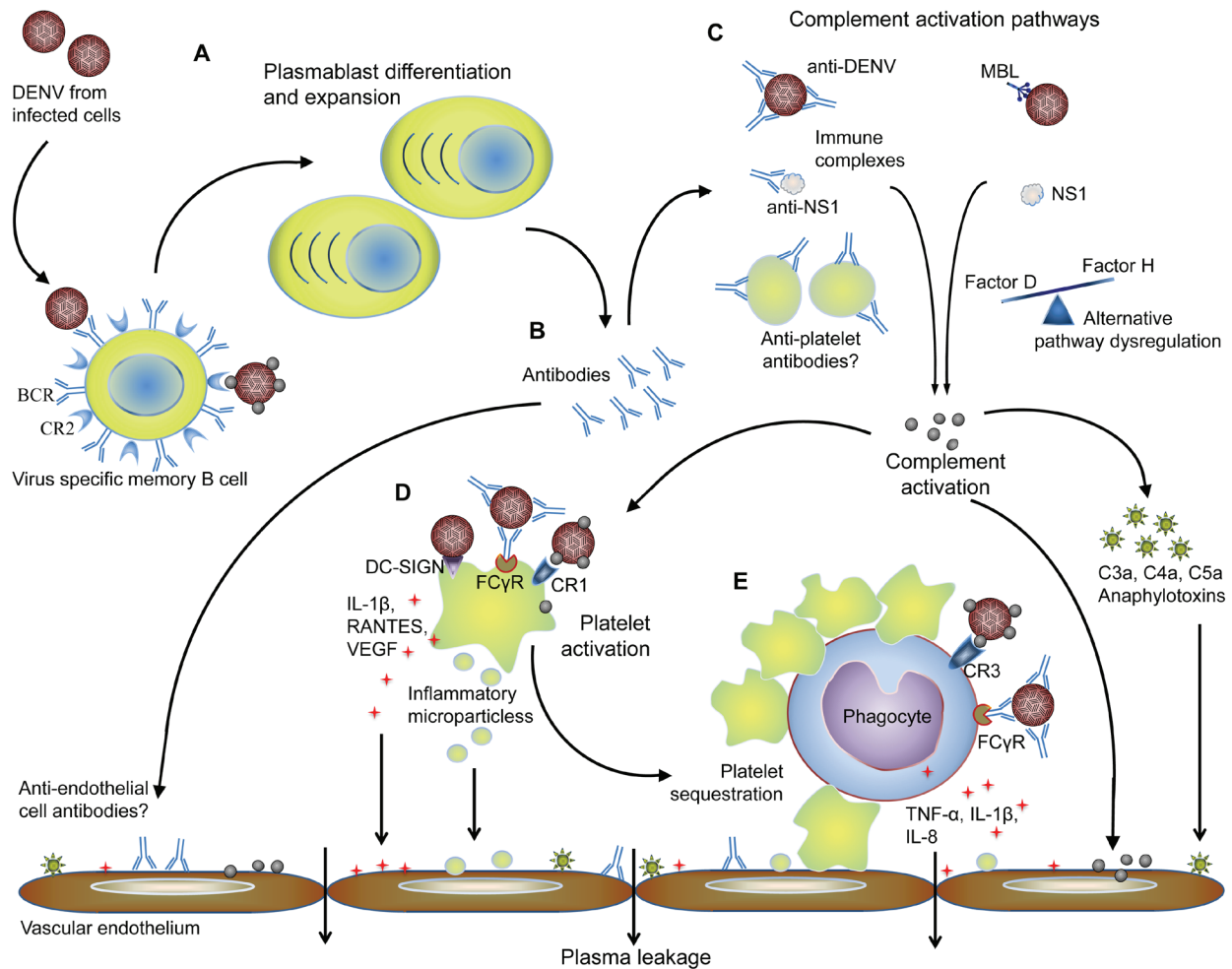


FIG. 1: Model of dengue vasculopathy: Interplay between plasmablasts, platelets and complement in the critical phase of infection. (A) DENV released from infected cells during a secondary infection binds to virus-specific memory B cells which differentiate and proliferate into plasmablasts, peaking at days 4 to 7 following the onset of symptoms. (B) Antibodies produced by plasmablasts form immune complexes with virus particles and with NS1, activating the classical pathway of complement, while antibodies targeting endothelium could potentially damage vascular endothelium directly. (C) Free NS1 and MBL bound to virus particles also lead to complement activation, which is amplified further by regulation imbalances through increases in factor D and decreases in factor H, which favor production of alternative pathway C3 convertase. Antibody coating of platelets may also lead to complement activation. Complement factors including vasoactive anaphylatoxins bind to endothelium and mediate plasma leakage. (D) Platelets become activated through binding of complement- and antibody-coated virus particles, by binding of DENV to DC-SIGN, and by direct binding of complement to the platelet surface. Activated platelets produce inflammatory cytokines and microparticles that act on vascular endothelium to promote plasma leakage. (E) Activated platelets are sequestered by phagocytes in the microvasculature, promoting thrombocytopenia and phagocyte activation, which is enhanced by binding of complement- and antibody-coated virus. Activated phagocytes release proinflammatory cytokines that may directly damage endothelium.

which is spontaneously generated by the hydrolysis of C3, to targeted surfaces. This surface-bound C3b interacts with factor B forming the complex C3bB.⁴¹ The C3bB complex, in turn, is cleaved by factor D to yield the active form of the C3 convertase of the alternative pathway (C3bBb) that is further stabilized by properdin. C3 convertases cleave C3 into C3b, which is covalently bound to the targeted surface, and C3a, which is released. C3b contributes to the formation of C3 convertase of the alternative pathway and C5 convertase (C3bBbC3b or C4bC2bC3b). These proteases in turn cleave C5 into C5b that initiates formation of the membrane attack complex and C5a, a small released fragment. C3a, C5a, and C4a are anaphylatoxins, promoting inflammation through chemotaxis of leukocytes and fluid leakage.

B. Complement Regulation

The complement cascade is tightly controlled by a range of regulators present on cell surfaces and in plasma. The cell-surface regulators include complement receptor-1 (CR1/CD35), decay accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (MCP/CD46), and protectin (CD59), whereas the soluble regulators include C4b binding protein (C4bBP), factor H, factor I, clusterin, and vitronectin. These regulators work either by destabilizing and inactivating the convertases, by inactivating and degrading C3b into iC3b, C3c, and C3dg, or by inhibiting the formation of the membrane attack complex. Recognition of products of degradation of C3b through CR1, CR2/CD21, CR3/[CD11b/CD18] and CR4/[CD11c/CD18] mediates several important leucocyte functions.⁴² CR1 engagement of C3b promotes phagocytosis and processing of immune complex-bound C3b. In addition, erythrocyte- and platelet-mediated immune complex clearance is also associated with CR1 function. CR2 recognizes iC3b/C3dg and reduces the activation threshold of B cells. CR3 and CR4 recognize iC3b, inducing synthesis of reactive oxygen metabolites and promoting phagocytosis (monocytes and neutrophils) and degranulation (neutrophils). Additionally, immune complexes can mediate cross talk between CR3 and Fcγ receptors (FcγR) in monocytes, inhibiting antiviral responses

and producing anti-inflammatory cytokines, thereby altering the ability to combat infection.⁴³

C. Increased Complement Activation in Dengue

1. Complement Activation and the Antibody Response

Several reports have demonstrated increased complement activation in DENV infection, with complement proteins across both classical and alternative activation pathways, including C4, factor B, and C3, being consumed as disease severity increases.⁴⁴⁻⁴⁶ In addition, increased levels of the vasoactive products of complement activation, including C3a, C4a and C5a, are elevated in patients with severe dengue, and these anaphylatoxins could contribute directly to vascular leakage (Fig. 1).⁴⁶⁻⁵⁰ As with plasmablasts, complement activation coincides temporally with the critical phase of DENV infection and the manifestations of vasculopathy.^{44,46} Mechanistically, antibody responses against DENV are likely to be intimately linked to complement activation through formation of immune complexes that trigger the classical pathway. Increased levels of both virus and soluble NS1 protein are seen in severe dengue,⁴⁷ and immune complexes with either virus or NS1 are seen in secondary DENV infections and have been associated with severe disease.^{45,50-52} The increase in immune complexes in severe dengue may be the result of exhaustion of the clearance capacity.⁵⁰ In some individuals, decreased immune complex clearance may result from a polymorphism in the FcγRIIa gene that is associated with reduced affinity to IgG1 and accumulation of serum DENV-specific IgG and immune complexes.⁵³ Immune complexes are found in skin rashes as well as kidney and brain in fatal cases of dengue, co-localizing with products of complement activation.^{54,55} In addition, greater levels of DENV-specific IgG1 and IgG3, with greater ability to fix and activate complement than the other IgG isotypes, are found in severe dengue during the febrile acute phase of infection.^{56,57} Interestingly, after natural infection, most circulating DENV-specific

memory B cells in peripheral blood produce IgG1,⁵⁸ and if this property extends to plasmablasts, it would greatly promote complement activation.

2. Antibody-Independent Mechanisms of Complement Activation in Dengue

Dysregulation of the alternative pathway contributes to overall complement activation in dengue. In patients with severe dengue relative to those with mild disease, serum levels of factor D that drive alternative pathway C3 convertase are increased, whereas levels of the regulatory protein factor H are reduced. This effect is not a result of preferential loss of small molecules through fluid leakage, as factor H is a large complex molecule of 155 kDa, six times the size of factor D, yet it is factor H that is reduced in severe disease. The imbalance favors complement activation and is consistent with increased levels of C3 convertase and the corresponding consumption of C3 seen in severe dengue (Fig. 1).⁴⁶ A genetic polymorphism in factor H gene is associated with increased basal protein levels and is protective against severe dengue,⁵⁹ consistent with a role for loss of this regulatory pathway in disease pathogenesis. In addition to alternative pathway activation, MBL can bind to envelope protein of DENV⁶⁰ and thus could trigger the lectin pathway of complement activation during infection (Fig. 1). During severe dengue, levels of functional (oligomerized) MBL are increased relative to mild disease.⁴⁶ Moreover, individuals with a MBL genotype associated with reduced levels of protein are less likely to develop thrombocytopenia during DENV infection than patients with the wild-type genotype,⁶¹ suggesting an association between complement activation and platelet consumption. Robust genetic association studies using larger numbers of individuals are warranted to better determine the association between specific complement factors and disease severity in dengue. Finally, viral NS1 protein can directly activate complement, and increased levels of NS1 are associated with increased disease severity.⁴⁷ NS1 is not likely to drive endothelial dysfunction directly, as primary DENV infections often are associated with high circulating levels of NS1 in the absence of severe disease.

IV. IMPACT OF DENV INFECTION ON PLATELETS

A. Thrombocytopenia

A key clinical correlate of disease severity in dengue is thrombocytopenia. Platelet-count decline is temporally coincident with the critical phase of infection and the onset of vasculopathy and plasma leakage.⁸ Megakaryocytes are the main target for DENV in the bone marrow^{62,63} and there is evidence for the presence of DENV in platelets from DENV-infected patients.^{64,65} Bone-marrow suppression, impaired thrombopoiesis, and increased peripheral platelet destruction are potential mechanisms that lead to dengue-associated thrombocytopenia.⁶⁶ DENV propagation in bone marrow^{67,68} may contribute to suppression of megakaryopoiesis through inhibition of proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors^{69–72} and alteration of cytokine production in bone marrow.^{73,74} In addition, dengue thrombocytopenia has been correlated with complement activation and high levels of C3a and C5a. Antibody-mediated platelet destruction, complement-mediated platelet lysis and hemophagocytosis have all been proposed as mechanisms to drive thrombocytopenia,^{75–78} as discussed below.

B. PLATELET ACTIVATION IN DENGUE

1. Antibody-Mediated Activation and Sequestration of Platelets

Recently, platelet activation and apoptosis, which increase platelet aggregation with phagocytes in the microvasculature and apoptotic platelet clearance, were shown to be major contributors for dengue-associated thrombocytopenia.^{79,80} DENV directly activates platelets^{64,80,81} through a mechanism that may involve DC-SIGN,^{80,82} a C-type lectin that mediates DENV infection of dendritic cells.⁸³ In contrast to dendritic cells, it is likely that the effect of DENV on platelets is independent of productive infection because platelet activation, apoptosis, and thrombocytopenia peak during the non-viremic phase

of disease.^{79,80} Host factors that are recognized by platelet signaling receptors resulting in platelet activation such as thrombin and platelet-activating factor (PAF) are also increased in DENV infection.^{84–86} A potentially major factor for platelet activation in dengue is the presence of immune complexes, which stimulate platelet activation through FcγRIIa and sensitize platelets to further activation by thrombin (Fig. 1).^{87,88} Because FcγRIIa can mediate DENV entry into macrophages,⁸⁹ ligation of DENV immune complexes to FcγRIIa on platelets probably also contributes to platelet activation in secondary DENV infection. DENV-specific antibodies can potentiate DENV binding to platelets.⁹⁰ Platelet FcγRIIa has also been demonstrated to have roles in *Staphylococcus aureus*-induced platelet activation,⁹¹ and this is enhanced by complement factors such as C1q,^{92,93} providing a further link between antibodies, complement and platelet activation in dengue.

2. Complement-Mediated Activation of Platelets

Complement likely plays a major role in activation and subsequent depletion of platelets in dengue, and consumption of C3 parallels thrombocytopenia in severe disease.⁴⁶ Complement could promote platelet sequestration during platelet-mediated clearance of immune complexes⁹⁰ or subsequent to virus deposition on the platelet surface, which would then be targeted by virus-specific antibody to activate complement.⁹⁴ Platelet activation could also occur following binding of uncleaved complement proteins to CR1⁹⁵ or potentially after binding of cross-reactive NS1-specific antibodies to the platelet surface, subsequently activating complement.⁷⁵

3. Consequences of Platelet Activation in Dengue

a. Release of Mediators of Inflammation

Platelet activation results in expression of P-selectin,^{80,96,97} a glycoprotein in platelet α-granules that translocates to the platelet surface during degranulation,⁹⁸ and surface expression of P-selectin is seen in platelets from individuals with DENV infection.^{79,80}

Platelet activation by DENV also results in release of the chemokine RANTES/CCL5, a preformed factor stored in platelet granules.^{82,98} Interestingly, cytokines that are stored in platelet granules, including RANTES/CCL5, PF4/CXCL4, MIP-1α/CCL3, VEGF and PDGF,⁹⁸ are increased in plasma from patients with severe dengue, associated with decreasing platelet counts.^{99–103} Considering that platelets are a major source of these mediators, the secretion of chemokines by platelets that become activated during DENV infection could be an important pathogenic mechanism (Fig. 1). These observations are in agreement with others demonstrating that thrombocytopenia and disease severity are reduced in mice lacking the receptor for PAF,¹⁰⁴ as well as CCR2 and CCR4, receptors for the chemokines MIP-1α/CCL3 and RANTES/CCL5, respectively.¹⁰⁵

b. Platelet Activation and Increased Vascular Permeability

Beyond the release of preformed granule-stored factors, the ability of activated platelets to splice constitutive intron-containing RNA to produce mature tissue factor and IL-1β mRNA was recently demonstrated.^{106–108} Platelet neo-synthesis of tissue factor and/or IL-1β has been implicated as a main mechanism in inflammation and dysregulated hemostasis in bacterial sepsis, malaria, and most recently, in dengue.^{109–112} Importantly, analysis of platelets from patients with dengue together with *in vitro* models indicate that DENV-triggered IL-1β synthesis in platelets is a mechanism for endothelial activation and increased vascular permeability (Fig. 1).¹¹² Synthesis of IL-1β occurs in parallel with the assembly of the NLRP3-inflammasome, which mediates IL-1β processing and release into microparticles.¹¹² Platelet shedding of microparticles likely contributes to the pathogenesis of dengue not only by delivering IL-1β but also through release of tissue factor and RANTES. The precise contribution of circulating microparticles to vasculopathy and vascular instability in severe dengue syndromes is currently under investigation.

c. Platelet Interaction and Sequestration with Leukocytes

Platelet activation also supports the adhesion of

platelets to leukocytes. Onlamoon and colleagues¹¹³ found that DENV elicits platelet-monocyte and platelet-neutrophil aggregates in a primate model of dengue, and platelet-monocyte aggregates have been also observed in mild dengue in humans.¹¹⁴ In these interactions, the binding of P-selectin on activated platelets to P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on leukocytes is a dominant molecular event.^{115,116} This molecular interaction not only tethers the cells together but also triggers gene expression pathways and induces functional responses by the leukocytes.^{115,116} Signals delivered to the monocytes by ligated PSGL-1 are amplified by soluble factors such as PAF, RANTES, and IL-1 β ,¹¹⁶⁻¹¹⁸ and at least two of these factors are known to be secreted by DENV-activated platelets.¹¹² Interestingly, cytokines that are synthesized as a result of platelet-dependent signaling of monocytes, such as TNF- α , IL-1 β , IL-8, and MCP-1,¹¹⁶⁻¹¹⁸ are also recognized as important pathogenic factors in severe dengue.¹¹⁹⁻¹²² The aggregation of activated platelets with themselves or with monocytes and neutrophils could lead to their sequestration in the microvasculature (Fig.1), as has been described in sepsis,¹²³⁻¹²⁵ a condition that has many parallels to severe dengue.¹²⁶ Platelet activation and thrombocytopenia are considered ubiquitous in human septic syndromes, and sequestration of platelets in microvascular beds can induce vascular damage in part through deposition of fibrin.^{127,128} Whether aggregates of platelets and phagocytes become sequestered in the microvasculature in patients with severe dengue is a critical question that needs to be addressed.

V. CONCLUSION

In this review, we focused on three seemingly disparate aspects of the host response to DENV infection; each coincides temporally with the critical phase of infection and the development of the severe form of disease. We have emphasized the interplay between the acute virus-specific plasmablast response, the activation of complement, and the activation and sequestration of platelets, and we have proposed a model of how these interactions could provide

multiple triggers of vasculopathy leading to plasma leakage and severe disease. Several questions remain to be addressed. The ineffectiveness of short-course oral corticosteroid therapy in preventing the development of severe disease in children with DENV infection has cast doubt on the contribution of immune dysregulation in dengue pathogenesis.^{129,130} While this finding may be inconsistent with a mechanistic role of activated T cells and the ensuing cytokine storm in severe dengue,⁹ the extent to which corticosteroids would suppress the key processes of complement and platelet activation described in our model is not clear. It is important to recognize that severe dengue is a syndrome with a complex pathogenesis, and it is possible that no single pathway or potentially even set of pathways entirely accounts for this disease. Future studies using clinical specimens from dengue patients with different disease outcomes will help determine the relative contributions of factors described in this review in mediating dengue pathogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by U.S. National Institutes of Health research grant AI049820 (to E.T.A.M. and S.M.B.-B.) and training grant AI049820 (to T.M.G.-B.); “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” - CNPq project 550140/2010-7 (to E.T.A.M.); “Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco” - FACEPE project APQ-1516-4.01/10 (to E.T.A.M.); and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – FAPERJ (to F.B.)

REFERENCES

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496:504-7.
2. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012;366:1423-32.
3. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS,

- Martinez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:S7–16.
4. OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborio S, Nunez A, Lennon NJ, Birren BW, Gordon A, Henn MR, Harris E. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med.* 2011;3:114ra28.
 5. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38:172–80.
 6. Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol.* 2002;156:40–51.
 7. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 1977;146:201–17.
 8. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009.
 9. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:532–43.
 10. Dung NT, Duyen HT, Thuy NT, Ngoc TV, Chau NV, Hien TT, Rowland-Jones SL, Dong T, Farrar J, Wills B, Simmons CP. Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue. *J Immunol.* 2010;184:7281–7.
 11. Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:3839–43.
 12. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature reviews. Immunology.* 2011;11:34–46.
 13. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews. Immunology.* 2005;5:230–42.
 14. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T, Hiepe F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:741–50.
 15. Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, Roby G, Kottlilil S, Arthos J, Proschan MA, Chun TW, Fauci AS. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med.* 2008;205:1797–805.
 16. Qian Y, Wei C, Eun-Hyung Lee F, Campbell J, Halliley J, Lee JA, Cai J, Kong YM, Sadat E, Thomson E, Dunn P, Seegmiller AC, Karandikar NJ, Tipton CM, Mosmann T, Sanz I, Scheuermann RH. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78 Suppl 1:S69–82.
 17. Crill WD, Hughes HR, Delorey MJ, Chang GJ. Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One.* 2009;4:e4991.
 18. Wahala WM, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology.* 2009;392:103–13.
 19. Lai CY, Tsai WY, Lin SR, Kao CL, Hu HP, King CC, Wu HC, Chang GJ, Wang WK. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol.* 2008;82:6631–43.
 20. Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, Macagno A, Simonelli L, Quyen NT, Sukupolvi-Petty S, Navarro-Sanchez E, Young PR, de Silva AM, Rey FA, Varani L, Whitehead SS, Diamond MS, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe.* 2010;8:271–83.
 21. de Alwis R, Beltramello M, Messer WB, Sukupolvi-Petty S, Wahala WM, Kraus A, Olivarez NP, Pham Q, Brien JD, Tsai WY, Wang WK, Halstead S, Kliks S, Diamond MS, Baric R, Lanzavecchia A, Sallusto F, de Silva AM. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1188.
 22. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, Puttikhant C, Edwards C, Duangchinda T, Supasa S, Chawansuntati K, Malasit P, Mongkolsapaya J, Screaton G. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science.* 2010;328:745–8.
 23. Schieffelin JS, Costin JM, Nicholson CO, Orgeron NM, Fontaine KA, Isern S, Michael SF, Robinson JE. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virol J.* 2010;7:28.
 24. Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J.* 2000;14:1603–10.
 25. Young PR, Hilditch PA, 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. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1053–7.
26. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186:1165–8.
 27. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol.* 2003;69:82–90.
 28. Falconar AK. 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. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:493–504.
 29. Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, Hsiao YL, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest.* 2008;88:1079–89.
 30. Balakrishnan T, Bela-Ong DB, Toh YX, Flamand M, Devi S, Koh MB, Hibberd ML, Ooi EE, Low JG, Leo YS, Gu F, Fink K. Dengue virus activates polyreactive, natural IgG B cells after primary and secondary infection. *PLoS One.* 2011;6:e29430.
 31. Garcia-Bates TM, Cordeiro MT, Nascimento EJ, Smith AP, Soares de Melo KM, McBurney SP, Evans JD, Marques ET, Jr., Barratt-Boyes SM. Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients. *J Immunol.* 2013;190:80–7.
 32. Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, Perng GC, Polsrila K, Chandele A, Kwissa M, Pulendran B, Wilson PC, Wittawatmongkol O, Yoksan S, Angkasekwinai N, Pattanapanyasat K, Chokephaibulkit K, Ahmed R. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J Virol.* 2012;86:2911–8.
 33. Zompi S, Montoya M, Pohl MO, Balmaseda A, Harris E. Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1568.
 34. Mei HE, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA, Radbruch A, Dorner T. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood.* 2009;113:2461–9.
 35. Wrammert J, Miller J, Akondy R, Ahmed R. Human immune memory to yellow fever and smallpox vaccination. *J Clin Immunol.* 2009;29:151–7.
 36. Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, Zheng NY, Mays I, Garman L, Helms C, James J, Air GM, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature.* 2008;453:667–71.
 37. Buckner CM, Moir S, Ho J, Wang W, Posada JG, Kardava L, Funk EK, Nelson AK, Li Y, Chun TW, Fauci AS. Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. *J Virol.* 2013;87:5800–11.
 38. Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32:154–6.
 39. Xu M, Hadinoto V, Appanna R, Joensson K, Toh YX, Balakrishnan T, Ong SH, Warter L, Leo YS, Wang CI, Fink K. Plasmablasts generated during repeated dengue infection are virus glycoprotein-specific and bind to multiple virus serotypes. *J Immunol.* 2012;189:5877–85.
 40. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1058–66.
 41. Lutz HU, Fumia S, Schurtenberger C, Alaia V. Opinion paper: stimulation of complement amplification or activation of the alternative pathway of complement? *Mol Immunol.* 2007;44:3862–5.
 42. Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol.* 2013;190:3831–8.
 43. Trinidad AG, de la Puerta ML, Fernandez N, Bayon Y, Crespo MS, Alonso A. Coupling of C3bi to IgG inhibits the tyrosine phosphorylation signaling cascade downstream Syk and reduces cytokine induction in monocytes. *J Leukoc Biol.* 2006;79:1073–82.
 44. Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ, Dixon FJ. The role of complement in hemorrhagic shock syndrome (dengue). *Trans Assoc Am Physicians.* 1973;86:102–10.
 45. Duran A, Valero N, Mosquera J, Pons H, Torres M, Alcocer S, Castillo JL. Dengue nonstructural protein-1 status is not associated to circulating levels of interleukin-17, C-reactive protein and complement in children with acute dengue. *J Clin Virol.* 2013;56:199–206.
 46. Nascimento EJ, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LH, Braga-Neto U, Marques ET. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PLoS ONE.* 2009;4:e6782.
 47. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul SN, Yenchitsomanus PT, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S, Malasit P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006;193:1078–88.

48. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005;36:425–35.
49. Nishioka K. Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. *Allerg Immunol.* 1974;20–21:385–92.
50. Wang WK, Chen HL, Yang CF, Hsieh SC, Juan CC, Chang SM, Yu CC, Lin LH, Huang JH, King CC. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1023–30.
51. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, Osterhaus AD. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4154–9.
52. Phan DT, Ha NT, Thuc LT, Diet NH, Phu LV, Ninh LY, An VT. Some changes in immunity and blood in relation to clinical states of dengue hemorrhagic fever patients in Vietnam. *Haematologia.* 1991;24:13–21.
53. Garcia G, Gonzalez N, Perez AB, Sierra B, Aguirre E, Rizo D, Izquierdo A, Sanchez L, Diaz D, Lezcay M, Pacheco B, Hirayama K, Guzman MG. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. *Int J Infect Dis.* 2011;15:e38–43.
54. Bhoopat L, Bhamarapravati N, Attasiri C, Yoksarn S, Chaiwun B, Khunamornpong S, Sirisanthana V. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1996;14:107–13.
55. Boonpucknavig S, Boonpucknavig V, Bhamarapravati N, Nimmannitya S. Immunofluorescence study of skin rash in patients with dengue hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med.* 1979;103:463–6.
56. Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, Juffrie M, Sutaryo J, Van Der Meer GM, Groen J, Osterhaus AD. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4332–8.
57. Thein S, Aaskov J, Myint TT, Shwe TN, Saw TT, Zaw A. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. *J Med Virol.* 1993;40:102–6.
58. Smith SA, de Alwis R, Kose N, Durbin AP, Whitehead SS, de Silva AM, Crowe JE, Jr. Human monoclonal antibodies derived from memory B cells following live attenuated dengue virus vaccination or natural infection exhibit similar characteristics. *J Infect Dis.* 2013;207:1898–908.
59. Pastor AF, Rodrigues Moura L, Neto JW, Nascimento EJ, Calzavara-Silva CE, Gomes AL, Silva AM, Cordeiro MT, Braga-Neto U, Crovella S, Gil LH, Marques ET, Jr., Acioli-Santos B. Complement factor H gene (CFH) polymorphisms C-257T, G257A and haplotypes are associated with protection against severe dengue phenotype, possible related with high CFH expression. *Hum Immunol.* 2013;74:1225–30.
60. Fuchs A, Lin TY, Beasley DW, Stover CM, Schwaeble WJ, Pierson TC, Diamond MS. Direct complement restriction of flavivirus infection requires glycan recognition by mannose-binding lectin. *Cell Host Microbe.* 2010;8:186–95.
61. Acioli-Santos B, Segat L, Dhalla R, Brito CA, Braga-Neto UM, Marques ET, Crovella S. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum Immunol.* 2008;69:122–8.
62. Clark KB, Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Roback J, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. Multiploid CD61+ cells are the pre-dominant cell lineage infected during acute dengue virus infection in bone marrow. *PLoS One.* 2012;7:e52902.
63. Noisakran S, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Hsiao HM, Songprakhon P, Angkasekwinai N, Choekhaibulkit K, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. Role of CD61+ cells in thrombocytopenia of dengue patients. *Int J Hematol.* 2012;96:600–10.
64. Noisakran S, Choekhaibulkit K, Songprakhon P, Onlamoon N, Hsiao HM, Villinger F, Ansari A, Perng GC. A re-evaluation of the mechanisms leading to dengue hemorrhagic fever. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1171 Suppl 1:E24–35.
65. Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, Jarman RG, Malasit P, Choekhaibulkit K, Perng GC. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009;40:253–62.
66. Hottz E, Toley N, Zimmerman G, Weyrich A, Bozza F. Platelets in dengue infection. *Drug Discov Today: Dis Mech.* 2011;8:e33–e8.
67. Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Clark KB, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. Infection of bone marrow cells by dengue virus *in vivo*. *Exp Hematol.* 2012;40:250–9 e4.
68. de Araujo JM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, Coelho JM, Nogueira RM. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods.* 2009;155:34–8.
69. Basu A, Jain P, Gangodkar SV, Shetty S, Ghosh K. Dengue 2 virus inhibits *in vitro* megakaryocytic colony formation and induces apoptosis in thrombopoietin-inducible megakaryocytic differentiation from cord blood CD34+ cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;53:46–51.
70. Murgue B, Cassar O, Guigon M, Chungue E. Dengue

- virus inhibits human hematopoietic progenitor growth *in vitro*. *J Infect Dis*. 1997;175:1497–501.
71. Nakao S, Lai CJ, Young NS. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood*. 1989;74:1235–40.
 72. Sridharan A, Chen Q, Tang KF, Ooi EE, Hibberd ML, Chen J. Inhibition of megakaryocyte development in the bone marrow underlies dengue virus-induced thrombocytopenia in humanized mice. *J Virol*. 2013;87:11648–58.
 73. La Russa VF, Innis BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillieres Clin Haematol*. 1995;8:249–70.
 74. Rothwell SW, Putnak R, La Russa VF. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54:503–10.
 75. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol*. 2001;63:143–9.
 76. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol*. 2006;19:127–32.
 77. Honda S, Saito M, Dimaano EM, Morales PA, Alonzo MT, Suarez LA, Koike N, Inoue S, Kumatori A, Matias RR, Natividad FF, Oishi K. Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary dengue virus infection by human macrophages. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:841–5.
 78. Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, Yu CC, Chang HH. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost*. 2007;5:2291–9.
 79. Alonzo MT, Lacuesta TL, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LA, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis*. 2012;205:1321–9.
 80. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza PT, Bozza FA. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost*. 2013;11:951–62.
 81. 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. *J Electron Microscop*. 2008;57:113–8.
 82. Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. 2013;122:3405–14.
 83. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Bix DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;197:823–9.
 84. Yang KD, Lee CS, Shiao MF. A higher production of platelet activating factor in ex vivo heterologously secondary dengue-2 virus infections. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 1995;42:403–7.
 85. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, ten CH, van der Meer JW. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost*. 2002;87:42–6.
 86. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, Green S, Nisalak A, Endy TP, Vaughn DW, Nimmannitya S, Innis BL. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:840–7.
 87. Antczak AJ, Singh N, Gay SR, Worth RG. IgG-complex stimulated platelets: a source of sCD40L and RANTES in initiation of inflammatory cascade. *Cell Immunol*. 2010;263:129–33.
 88. Berlacher MD, Vieth JA, Heflin BC, Gay SR, Antczak AJ, Tasma BE, Boardman HJ, Singh N, Montel AH, Kahaleh MB, Worth RG. FcγRIIIa ligation induces platelet hypersensitivity to thrombotic stimuli. *Am J Pathol*. 2013;182:244–54.
 89. Wahala WM, Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*. 2011;3:2374–95.
 90. Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology*. 1995;213:254–7.
 91. Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcγRIIIa receptor. *Mol Microbiol*. 2006;59:212–30.
 92. Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D, Foster TJ. Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Mol Microbiol*. 2005;57:804–18.
 93. Peerschke EI, Ghebrehiwet B. C1q augments platelet activation in response to aggregated Ig. *J Immunol*. 1997;159:5594–8.
 94. Funahara Y, Ogawa K, Fujita N, Okuno Y. Three possible triggers to induce thrombocytopenia in dengue virus

- infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1987;18:351–5.
95. Hamad OA, Nilsson PH, Wouters D, Lambris JD, Ekdahl KN, Nilsson B. Complement component C3 binds to activated normal platelets without preceding proteolytic activation and promotes binding to complement receptor 1. *J Immunol*. 2010;184:2686–92.
 96. Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:435–41.
 97. 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. *J Electron Microscop* (Tokyo). 2008;57:113–8.
 98. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*. 2012;34:5–30.
 99. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 2000;13:261–76.
 100. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, Manikam R, Sekaran SD. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One*. 2012;7:e52215.
 101. Kumar Y, Liang C, Bo Z, Rajapakse JC, Ooi EE, Tannenbaum SR. Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1887.
 102. de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Pova TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LD, Motta-Castro AR, Alves AM, Avila CA, de Souza LJ, da Cunha RV, Damasco PV, Paes MV, Kubelka CF. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS One*. 2012;7:e38527.
 103. Tseng CS, Lo HW, Teng HC, Lo WC, Ker CG. Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;43:99–102.
 104. Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral FA, Souza RS, Souza AL, Kroon EG, Sachs D, Cunha FQ, Bukin E, Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Teixeira MM. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:14138–43.
 105. Guabiraba R, Marques RE, Besnard AG, Fagundes CT, Souza DG, Ryffel B, Teixeira MM. Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLoS One*. 2010;5:e15680.
 106. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005;122:379–91.
 107. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol*. 2008;181:3495–502.
 108. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*. 2006;203:2433–40.
 109. Rondina MT, Schwertz H, Harris ES, Kraemer BF, Campbell RA, Mackman N, Grissom CK, Weyrich AS, Zimmerman GA. The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human platelets. *J Thromb Haemost*. 2011;9:748–58.
 110. Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1beta-rich microparticles. *J Immunol*. 2011;186:5489–96.
 111. Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2013;190:4685–91.
 112. Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. 2013.
 113. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*. 2010;115:1823–34.
 114. Tsai JJ, Jen YH, Chang JS, Hsiao HM, Noisakran S, Perng GC. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun*. 2011;3:530–40.
 115. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*. 1989;59:305–12.
 116. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest*. 1996;97:1525–34.
 117. Weyrich AS, Denis MM, Kuhlmann-Eyre JR, Spencer ED, Dixon DA, Marathe GK, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Dipyridamole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates. *Circulation*. 2005;111:633–42.

118. Dixon DA, Tolley ND, Bemis-Standoli K, Martinez ML, Weyrich AS, Morrow JD, Prescott SM, Zimmerman GA. Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J Clin Invest.* 2006;116:2727–38.
119. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8:86.
120. Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanarooj S, Pulmanasahakul R, Ubol S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol.* 2009;53:442–50.
121. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, Cecilia D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One.* 2010;5:e8709.
122. van de Weg CA, Pannuti CS, de Araujo ES, van den Ham HJ, Andeweg AC, Boas LS, Felix AC, Carvalho KI, de Matos AM, Levi JE, Romano CM, Centrone CC, de Lima Rodrigues CL, Luna E, van Gorp EC, Osterhaus AD, Martina BE, Kallas EG. Microbial translocation is associated with extensive immune activation in dengue virus infected patients with severe disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2236.
123. Cowan DH, Bowman LS, Fratianne RB, Ahmed F. Platelet aggregation as a sign of septicemia in thermal injury. A prospective study. *J Amer Med Assoc.* 1976;235:1230–4.
124. Evans G, Lewis AF, Mustard JF. The role of platelet aggregation in the development of endotoxin shock. *Br J Surg.* 1969;56:624.
125. Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:843–51.
126. Steinberg BE, Goldenberg NM, Lee WL. Do viral infections mimic bacterial sepsis? The role of microvascular permeability: A review of mechanisms and methods. *Antiviral Res.* 2012;93:2–15.
127. Aird WC. The hematologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis. *Mayo Clin Proc.* 2003;78:869–81.
128. Warkentin TE, Aird WC, Rand JH. Platelet-endothelial interactions: sepsis, HIT, and antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:497–519.
129. Nguyen TH, Nguyen TH, Vu TT, Farrar J, Hoang TL, Dong TH, Ngoc Tran V, Phung KL, Wolbers M, Whitehead SS, Hibberd ML, Wills B, Simmons CP. Corticosteroids for dengue— why don't they work? *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2592.
130. Tam DT, Ngoc TV, Tien NT, Kieu NT, Thuy TT, Thanh LT, Tam CT, Truong NT, Dung NT, Qui PT, Hien TT, Farrar JJ, Simmons CP, Wolbers M, Wills BA. Effects of short-course oral corticosteroid therapy in early dengue infection in Vietnamese patients: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2012;55:1216–24.

Discover **PE/Dazzle™ 594**
Antibody Conjugates



Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue

This information is current as of July 13, 2014.

Eugenio D. Hottz, Isabel M. Medeiros-de-Moraes, Adriana Vieira-de-Abreu, Edson F. de Assis, Rogério Vals-de-Souza, Hugo C. Castro-Faria-Neto, Andrew S. Weyrich, Guy A. Zimmerman, Fernando A. Bozza and Patrícia T. Bozza

J Immunol published online 11 July 2014
<http://www.jimmunol.org/content/early/2014/07/11/jimmunol.1400091>

-
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994. Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue

Eugenio D. Hottz,^{*,†,‡,1} Isabel M. Medeiros-de-Moraes,^{*,1} Adriana Vieira-de-Abreu,^{*,‡}
Edson F. de Assis,^{*} Rogério Vals-de-Souza,[†] Hugo C. Castro-Faria-Neto,^{*}
Andrew S. Weyrich,^{‡,§} Guy A. Zimmerman,^{*,‡} Fernando A. Bozza,^{†,¶,2} and
Patrícia T. Bozza^{*,2}

Dengue is the most prevalent human arbovirus disease in the world. Dengue infection has a large spectrum of clinical manifestations, from self-limited febrile illness to severe syndromes accompanied by bleeding and shock. Thrombocytopenia and vascular leak with altered cytokine profiles in plasma are features of severe dengue. Although monocytes have been recognized as important sources of cytokines in dengue, the contributions of platelet–monocyte interactions to inflammatory responses in dengue have not been addressed. Patients with dengue were investigated for platelet–monocyte aggregate formation. Platelet-induced cytokine responses by monocytes and underlying mechanisms were also investigated *in vitro*. We observed increased levels of platelet–monocyte aggregates in blood samples from patients with dengue, especially patients with thrombocytopenia and increased vascular permeability. Moreover, the exposure of monocytes from healthy volunteers to platelets from patients with dengue induced the secretion of the cytokines IL-1 β , IL-8, IL-10 and MCP-1, whereas exposure to platelets from healthy volunteers only induced the secretion of MCP-1. In addition to the well-established modulation of monocyte cytokine responses by activated platelets through P-selectin binding, we found that interaction of monocytes with apoptotic platelets mediate IL-10 secretion through phosphatidylserine recognition in platelet–monocyte aggregates. Moreover, IL-10 secretion required platelet–monocyte contact but not phagocytosis. Together, our results demonstrate that activated and apoptotic platelets aggregate with monocytes during dengue infection and signal specific cytokine responses that may contribute to the pathogenesis of dengue. *The Journal of Immunology*, 2014, 193: 000–000.

Dengue is the most important arthropod-borne viral disease in the world, with >2.5 billion people living in areas at risk for transmission. Disease is caused by four sero-

types of dengue virus (DENV-1–4), resulting in >90 million apparent infections annually (1–3). Dengue induces a spectrum of clinical manifestations that range from mild self-limited dengue fever to severe dengue, a life-threatening syndrome associated with increased vascular permeability, hypovolemia, hypotension, bleeding, and, eventually, shock (2, 3). Thrombocytopenia is commonly observed in both mild and severe dengue syndromes and correlates with the clinical outcome (3–7). Although thrombocytopenia is a hallmark of dengue infection, the role played by platelets in the pathogenesis of dengue is not completely understood.

We showed previously that platelets from patients with dengue have characteristics indicating increased activation and apoptosis (8). It is known that activated platelets mediate inflammatory and immune responses by a variety of mechanisms, including release of cytokines and interactions with leukocytes (9–13). A previous study reported increased platelet–monocyte aggregation in patients with dengue (14). The phagocytosis of apoptotic platelets from DENV-infected patients by macrophages also was shown (15). Although interaction with activated platelets and recognition of apoptotic bodies have recognized roles in the immunomodulation of mononuclear cells (10, 11, 16), the role played by activated and apoptotic platelets in the modulation of monocyte responses during DENV infection has not been addressed.

It is widely accepted that proinflammatory cytokines play a major role in the pathogenesis of dengue (4, 17). Nevertheless, the cytokine network and key regulatory pathways are highly complex, and the mechanisms underlying specific cytokine responses by immune cells during dengue infection are not fully elucidated. In this study, we show that the formation of platelet–monocyte aggregates modulates monocyte activation and cytokine release during dengue infection. Specifically, binding of activated

*Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil; [†]Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil; [‡]Department of Medicine, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112; [§]Molecular Medicine Program, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112; and [¶]Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, Rio de Janeiro 22281-110, Brazil

¹E.D.H. and I.M.M.-d.-M. contributed equally to this work.

²The senior authors (F.A.B. and P.T.B.) contributed equally to this work.

Received for publication January 13, 2014. Accepted for publication June 11, 2014.

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência Dengue, and the National Institutes of Health (Grants HL066277, HL091754, and R37HL044525 to A.S.W. and G.A.Z.). G.A.Z. is the recipient of a Ciência Sem Fronteiras special visiting professorship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

E.D.H. and I.M.M.-d.-M. performed the majority of experiments, analyzed data, and drafted and prepared the manuscript. E.F.d.A. performed some of the experiments and analyzed data. R.V.-d.-S. was responsible for patient enrollment, clinical classification, and experimental analyses. A.V.-d.-A., H.C.C.-F.-N., A.S.W., and G.A.Z. designed experiments and edited/reviewed the manuscript. P.T.B. and F.A.B. directed all aspects of the study, analyzed data, and prepared and reviewed the manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Fernando A. Bozza or Dr. Patrícia T. Bozza, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil (F.A.B.) or Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil (P.T.B.). E-mail addresses: Fernando.bozza@ipecc.fiocruz.br or bozza.fernando@gmail.com (F.A.B.) or pbozza@ioc.fiocruz.br (P.T.B.)

Abbreviations used in this article: DENV, dengue virus; HSA, human serum albumin; M199, medium 199; PRP, platelet-rich plasma; PSGL, P-selectin glycoprotein ligand.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

and apoptotic platelets from dengue patients induced the secretion of IL-1 β , IL-8, IL-10, and MCP-1 in monocytes. Interactions of monocytes with platelets from heterologous healthy volunteers induced the secretion of MCP-1, but not IL-1 β , IL-8, and IL-10. In exploring the mechanisms involved, we evaluated the monocyte responses to agonist-stimulated platelets that showed features of activation and apoptosis. We observed that the release of cytokines depended on the P-selectin–mediated adhesion (11, 13), and, in addition, on the phosphatidylserine-mediated recognition of apoptotic platelets, which induced IL-10 secretion. Our findings provide new insights regarding inflammatory mechanisms in dengue infection and the biology of platelet–monocyte interactions.

Materials and Methods

Human subjects

Peripheral vein blood samples were obtained from 25 serologically and molecularly confirmed DENV-infected patients from the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas–FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; their characteristics are presented in Table I. The average day of sample collection after the onset of illness was 3.8 ± 1.5 , and the average day of defervescence was 4.6 ± 1.3 . Peripheral vein blood also was collected from 19 sex- and aged-matched healthy subjects. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas #016/2010 and University of Utah), and the experiments were performed in compliance with these protocols. Written informed consent was obtained from all volunteers prior to any study-related procedure.

The cohort consisted of mild dengue patients, of which 12 (48%) presented warning signs that were diagnosed according to World Health Organization guidelines (3). Levels of IgM and IgG specific for DENV E protein were measured in plasma from dengue patients using a standard capture ELISA Kit, according to the manufacturer's instructions (E-Den01M and E-Den01G; PanBio). DENV NS1 protein was detected in patient plasma using the NS1 Detection Kit, according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA). Primary and secondary infections were distinguished using the IgM/IgG Ab ratio: values < 1.2 were considered secondary infection, as previously reported (18–20). Ninety-six percent of the patients were found to have secondary DENV infection.

Platelet and monocyte isolation

Peripheral blood samples were drawn into acid citrate–dextrose and centrifuged at $200 \times g$ for 20 min to obtain platelet-rich plasma (PRP). Platelets were isolated from PRP, and CD45⁺ leukocytes were depleted from platelet preparations, as previously described (21, 22). The platelet preparation was resuspended in medium 199 (M199; Lonza Biologics, Basel, Switzerland), and its purity ($>99\%$ CD41⁺) was confirmed by flow cytometry. PBMCs were isolated from whole blood after PRP was removed (bottom cell layer after the first centrifugation described above) by Ficoll-Paque (GE Healthcare) gradient centrifugation. The monocyte fraction was isolated by CD14⁺ selection (Human CD14+ Selection Beads, Easy Sep; STEMCELL Technologies, London, U.K. or AutoMACS Technology, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), according to the manufacturer's instructions. Cell viability ($>95\%$) was assessed by a trypan blue exclusion test, and the purity of the preparations ($>90\%$ CD14⁺) was confirmed by flow cytometry.

Flow cytometric analyses

Platelet–monocyte aggregates were analyzed as previously described (10). Briefly, whole blood was incubated for 10 min with FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA) and then centrifuged at $500 \times g$ for 15 min. The supernatant was discarded, and cells were resuspended in HT buffer (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, 0.35% BSA [pH 7.4]) and incubated (20 min at room temperature) in the presence of PE-conjugated anti-CD41 and FITC-conjugated anti-CD14 (both from BD Pharmingen, San Diego, CA). After incubation, 250 μ l FACS Lysing solution was added to fix the samples. To assess platelet activation, freshly isolated platelets were incubated (30 min at room temperature) with FITC-conjugated anti-CD41 (0.5 μ g/ml) and PE-conjugated anti-CD62P (0.25 μ g/ml) (BD Pharmingen). Isotype-matched Abs were used to control nonspecific binding of Abs. Platelets and monocytes were distinguished by characteristic forward and side scattering and specific binding to CD41 or CD14, respectively. A total of 5,000–10,000 gated events was analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Cell surface

phosphatidylserine exposure was determined with FITC-conjugated Annexin V (Beckman Coulter, Marseille, France). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured using the probe tetramethylrhodamine methyl ester (Invitrogen; 100 nM, 10 min).

Platelet–monocyte *in vitro* interactions

To examine interactions of platelets and monocytes from patients and healthy volunteers, purified heterologous platelets and monocytes were incubated with one another for 12 h at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Each experimental point contained 10⁵ monocytes and 10⁷ platelets in a volume of 100 μ l M199 containing 10 μ g/ml polymyxin B (Sigma-Aldrich). Platelets and monocytes alone also were examined under the same conditions. Cells were recovered by centrifugation at $500 \times g$ for 10 min and fixed with 4% paraformaldehyde (10 min), and platelet–monocyte aggregates were evaluated by flow cytometry, as described above. The supernatants from platelets, monocytes, and platelet–monocyte aggregates were collected and stored at -20°C until analysis.

For the interactions of agonist-stimulated platelets with monocytes, autologous platelets and monocytes were incubated with one another for 8 h at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Each experimental point contained 5×10^5 monocytes and 5×10^7 platelets in a volume of 200 μ l M199 containing 10 μ g/ml polymyxin B. Platelets were stimulated with thrombin (0.5 U/ml; Sigma-Aldrich; T1063) or thrombin plus convulxin (250 ng/ml; Santa Cruz; sc-202554) for 5 min. These platelets were then diluted 1:5 and incubated with monocytes (final concentration of thrombin and convulxin in monocytes was 0.1 U/ml and 50 ng/ml, respectively) in the presence or absence of anti-P-selectin (10 μ g/ml; BBA30; R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-phosphatidylserine (50 μ g/ml; ab18005; Abcam), or isotype-matched Ab.

Platelet phagocytosis assay

Platelet phagocytosis was assayed as previously described (23). Briefly, platelets were labeled with CellTracker Far Red DDAO-SE (5 μ M; Molecular Probes) for 1 h at 37°C, washed three times by resuspending in warm PIPES saline and glucose buffer containing 100 nM PGE₁ (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) and centrifuging at $500 \times g$ for 20 min, and resuspended in M199. Labeled platelets were stimulated with thrombin or thrombin plus convulxin, as described above, and incubated with monocytes for 1 h at 37°C to allow phagocytosis to proceed. Cells were washed in HBSS, quenched with 0.1% trypan blue in HBSS for 20 min, washed once, and analyzed by flow cytometry. Monocytes incubated with unlabeled platelets and monocytes incubated with labeled, stimulated platelets and kept unquenched were used to set up the flow cytometer. Monocytes treated with the cytoskeleton assembly inhibitors cytochalasin D (10 μ g/ml) and cytochalasin B (10 μ g/ml) were used as negative controls for platelet phagocytosis.

Monocyte adhesion to immobilized P-selectin and phosphatidylserine

Monocyte adhesion assays were performed as previously described (11). Briefly, 300 μ l phosphatidylserine (100 μ g/ml) dissolved in ice-cold ethanol was added to the wells of flat-bottom 16-mm plates (Nuncclon, Roskilde, Denmark) and incubated for 18 h at 4°C to evaporate the ethanol. Control wells that were not coated with phosphatidylserine were treated with ethanol alone. The plates were incubated overnight at 4°C with HBSS containing human serum albumin (HSA) or P-selectin (10 mg/ml) and blocked with HSA (10 mg/ml) for 4 h at 25°C. The plates were washed twice with HBSS–0.05% Tween-20 and three times with HBSS. A total of 10⁶ monocytes, resuspended in 300 μ l M199 containing 10 mg/ml polymyxin B, was added to the coated surfaces and maintained at 37°C for 8 h. Adherent cells were fixed, stained with Giemsa, and counted by light microscopy.

Cytokine measurement

The levels of the cytokines FGF- β , G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF, RANTES, TNF- α , and VEGF in the supernatants from platelet–monocyte interactions were measured using a Multiplex cytokine immunoassay (Bio-Plex Human Cytokine Assay). Levels of IL-8 and IL-10 also were determined using a standard capture ELISA Kit (R&D Systems).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). The numerical demographic and clinical

Table I. Characteristics of healthy volunteers and DENV-infected patients

	Control (n = 19)	Dengue (n = 25)
Age (y)	29 (26–34)	33 (29–44)
Males	10 (52.6%)	16 (64%)
Platelet count ($\times 1000/\text{mm}^3$)	241 (215–262)	128 (95–168)*
Leukocyte count (cells/mm^3)	6320 (5285–7050)	3750 (2900–4560)*
Monocytes (cells/mm^3)	426 (327.6–515.2)	412 (340.2–538.9)
Hematocrit (%)	39.4 (36.4–41.3)	43.1 (40.1–44.0)*
Albumin (g/dl)	3.8 (3.4–4.0)	3.6 (3.4–3.7)
TGO/AST (IU/l)	19 (15.8–22.2)	40 (32.5–74)*
TGP/ALT (IU/l)	28 (20.8–36.5)	62 (45–99)*
Hemorrhagic manifestations ^a	–	12 (48%)
Intravenous fluid resuscitation	–	11 (44%)
Secondary dengue infection	–	24 (96%)
Mild dengue	–	13 (52%)
Mild dengue with warning signs ^b	–	12 (48%)
IgM ⁺	0 (0%)	20 (80%)
IgG ⁺	14 (74.7%)	24 (96%)
NS1 ⁺	–	7 (28%)
PCR ^{+c}	–	8 (32%)

Data are median (interquartile range) or n (%).

^aGingival, vaginal, and/or gastrointestinal bleeding, petechiae, and exanthema.

^bAbdominal pain or tenderness, persistent vomiting, clinical fluid accumulation, mucosal bleed, and/or increased hematocrit concurrent with rapid decrease in platelet count; according to World Health Organization criteria (3).

^cDENV-4 was detected in all PCR⁺ patients.

* $p < 0.05$ versus control.

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; TGO, glutamic-oxalacetic transaminase; TGP, glutamic-pyruvic transaminase.

variables are expressed as the median and the interquartile range (25–75%) or as a number and percentage (%). All of the numerical variables were tested for a normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. We compared the continuous variables using the *t* test (parametric distribution) or the Mann–Whitney *U* test (nonparametric distribution). Correlations were assessed using the Pearson test.

Results

Increased platelet–monocyte aggregates in patients with dengue

We showed previously that platelets in the blood of patients with dengue are activated (8). Consistent with this, platelets in samples from dengue patients in the current study also had increased P-selectin surface expression (data not shown). P-selectin is the primary adhesion molecule on activated platelets that binds leukocytes (11, 13, 24). To investigate whether activated platelets can interact with monocytes during active dengue infection, we analyzed platelet–monocyte aggregates in peripheral whole blood samples by flow cytometry. As shown in Fig. 1A, dengue patients had increased platelet–monocyte aggregates compared with healthy volunteers ($26.1 \pm 14.1\%$ versus $8.1 \pm 1.7\%$, $p < 0.001$).

Moreover, platelet P-selectin surface expression positively correlated with the levels of circulating platelet–monocyte aggregates in samples from patients with dengue and healthy volunteers ($r = +0.69$, $p < 0.01$) (Fig. 1B).

Platelet–monocyte aggregates are associated with thrombocytopenia and increased vascular permeability during dengue disease

Using platelet counts determined on the day of sample collection, patients were classified as thrombocytopenic ($<150,000/\text{mm}^3$) or nonthrombocytopenic (Table I). Based on this grouping, 45% of the patients were thrombocytopenic, whereas 55% were not. Platelet–monocyte aggregates were higher in thrombocytopenic dengue patients compared with nonthrombocytopenic dengue patients ($34.2 \pm 18.4\%$ versus $20.3 \pm 6.8\%$, $p = 0.0151$) (Fig. 2A). The breakdown was similar in patients who were positive or negative for signs of increased vascular permeability. Increased vascular permeability was evidenced by one or more of the following signs: increase $>20\%$ in hematocrit, hypoalbuminemia, postural hypotension, ascites, and/or oliguria (Table I). According to the presence or absence of these signs, 48% of patients were

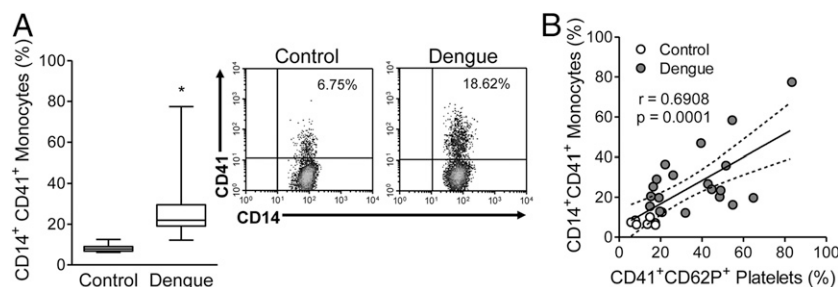
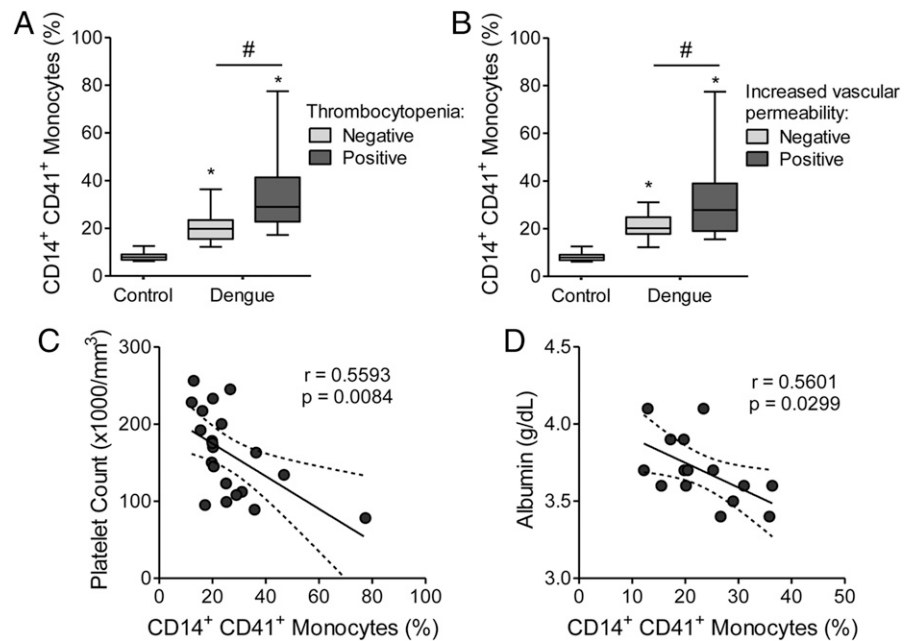


FIGURE 1. Increased platelet–monocyte aggregates in dengue illness. **(A)** The percentage of platelet–monocyte aggregates identified as CD14⁺CD41⁺ monocytes was assessed in healthy subjects (control) and patients with dengue. The boxes indicate the median and interquartile ranges, and the whiskers indicate the 5–95 percentiles. The insets show representative density plots for CD41⁺ monocytes from one healthy volunteer and one dengue patient. The value in the quadrant indicates the cell frequencies of the quadrant. **(B)** The percentage of platelets with CD62-P surface expression was plotted against the percentage of CD14⁺CD41⁺ monocytes in the same patient or healthy volunteer. Linear regression was traced according to the distribution of points. * $p < 0.01$, versus control.

FIGURE 2. Platelet-monocyte aggregates correlate with thrombocytopenia and increased vascular permeability in dengue. The percentage of CD14⁺CD41⁺ monocytes was assessed in health volunteers (control) and dengue patients that were positive or negative for thrombocytopenia (A) or signs of increased vascular permeability (B). The boxes indicate the median and interquartile ranges, and the whiskers indicate the 5–95 percentiles. The percentage of CD14⁺CD41⁺ monocytes was plotted against the platelet counts obtained on the same day that platelet-monocyte aggregates were analyzed (C) and the lowest plasma albumin level for each patient (D). Linear regressions were traced according to the distribution of points. * $p < 0.01$, versus control; # $p < 0.05$, positive versus negative.



classified as positive, and the remaining 52% were classified as negative. The percentage of platelet-monocyte aggregates was significantly higher in patients who were positive for signs of increased vascular permeability compared with patients who did not have evidence of vascular leak ($32.7 \pm 18.5\%$ versus $20.6 \pm 5.3\%$, $p = 0.021$) (Fig. 2B). Moreover, we found that platelet-monocyte aggregates in DENV-infected patients inversely correlated with platelet counts and plasma albumin levels (Fig. 2C, 2D).

Platelets from dengue-infected patients aggregate with control monocytes and induce cytokine release in vitro

Next, we investigated the ability of platelets isolated from patients with dengue to aggregate with monocytes from healthy volunteers and modulate monocyte responses. Increased platelet-monocyte aggregate formation was observed when monocytes from healthy volunteers were exposed to platelets from DENV-infected patients in comparison with platelets from heterologous healthy volunteers ($62.5 \pm 9.1\%$ versus $30.7 \pm 11.6\%$, $p = 0.006$). Incubation of platelets from healthy volunteers with monocytes from dengue patients did not promote any increment in platelet-monocyte aggregates compared with control platelets plus control monocytes ($41.8 \pm 19.5\%$, $p = 0.2234$) (Fig. 3).

We showed previously that signaling by activated adherent platelets enhances cytokine and chemokine production by monocytes, including TNF- α , IL-1 β , IL-8, and MCP-1 (10, 11, 25). In this study, the levels of IL-1 β and IL-8 were significantly ($p < 0.05$) elevated in the supernatant of monocytes exposed to plate-

lets from dengue-infected patients compared with control platelets (Fig. 4A, 4B). The levels of MCP-1 were elevated in all platelet-monocyte interactions compared with monocytes alone, regardless of patient or control source of the cells (Fig. 5C). Also, increased RANTES secretion was observed in platelets from healthy volunteers compared with dengue-infected patients (Fig. 4D).

The secretion of TNF- α was not different between monocytes exposed to platelets from control or dengue subjects or in platelet-monocyte interactions compared with monocytes alone (Fig. 4E). Interestingly, we observed that monocytes exposed to platelets from dengue-infected subjects secreted increased levels of IL-10 (Fig. 4F), a cytokine not previously demonstrated to be directly modulated by platelet-monocyte binding. Other cytokines measured in the multiplex assay were either below the detection limit or were not different among platelets, monocytes, or platelet-monocyte interactions from patients and controls (data not shown).

P-selectin and phosphatidylserine are required for IL-10 secretion in platelet-monocyte aggregates

Previously, we showed increased platelet apoptosis, in addition to platelet activation, in patients with dengue (8). Platelets from patients in the current study similarly showed increased phosphatidylserine exposure ($26.9 \pm 7.9\%$ versus $4.9 \pm 3.2\%$, for dengue patients and healthy volunteers, respectively). We hypothesized that monocytes secrete IL-10 (Fig. 4F) in response to the recognition of apoptotic platelets in platelet-monocyte

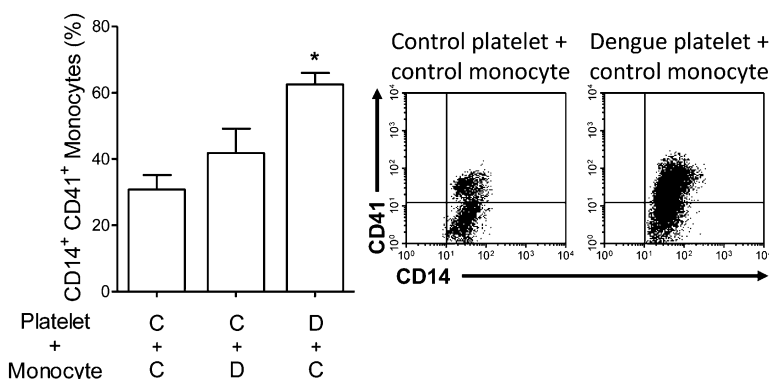


FIGURE 3. Platelets from dengue-infected patients aggregate with control monocytes in vitro. Platelets and monocytes from healthy volunteers (control [C]) or patients with dengue (D) were incubated with one another, as described. Percentage of CD14⁺CD41⁺ monocytes (left panel). The bars represent mean \pm SEM of seven independent platelet plus monocyte combinations. Representative dot plots for CD41-expressing monocytes (right panels). * $p < 0.05$, versus C+C. C+C, platelets plus monocytes from heterologous control participants; C+D, control platelets plus monocytes from dengue patients; D+C, platelets from dengue patients plus control monocytes.

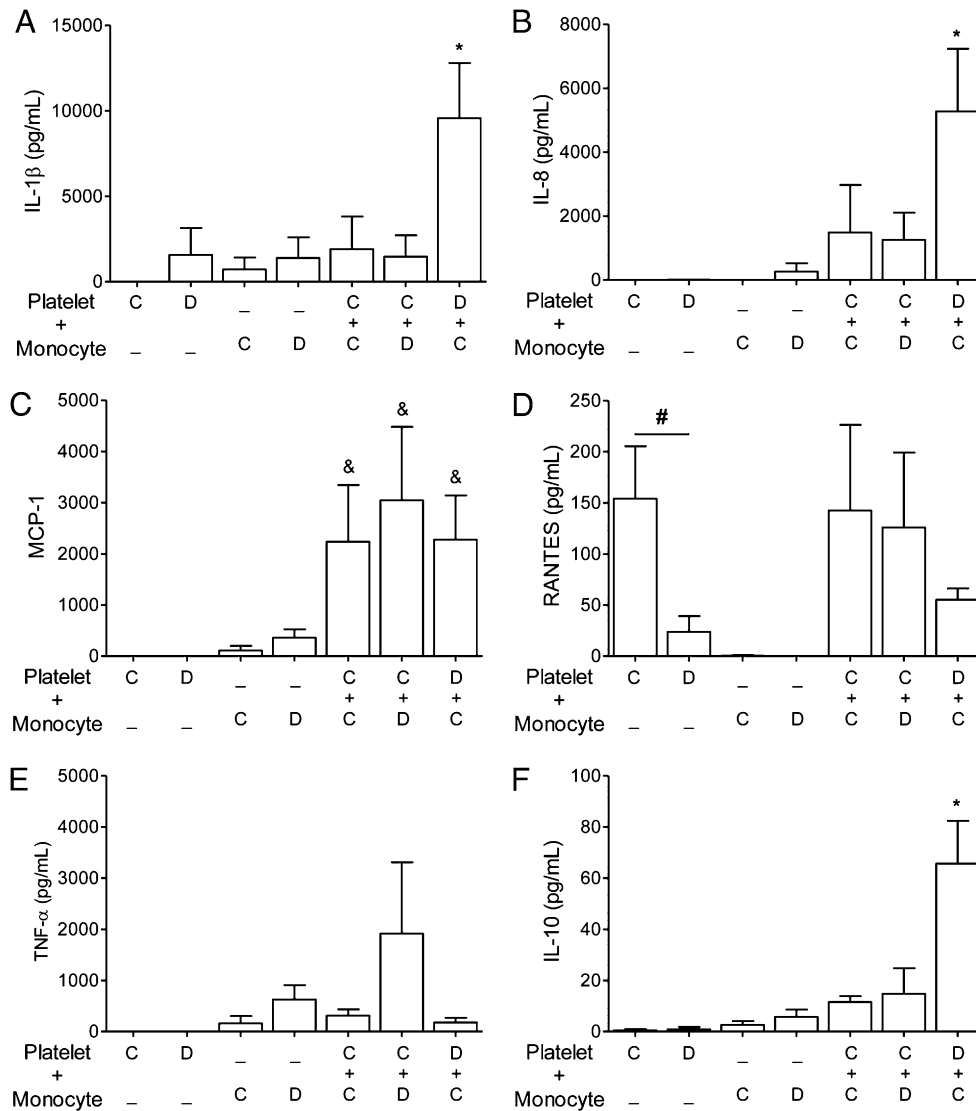


FIGURE 4. Platelets from dengue-infected patients modulate the monocyte cytokine profile. Platelets and monocytes from healthy volunteers (control [C]) or patients with dengue (D) were incubated alone or with one another, as described. Concentrations of IL-1 β (A), IL-8 (B), MCP-1 (C), RANTES (D), TNF- α (E), and IL-10 (F) in the supernatants of cells incubated in each condition. The bars represent mean \pm SEM of seven independent platelet plus monocyte combinations. * p < 0.05, versus C+C; & p < 0.05, versus monocytes from the same origin (control or dengue); # p < 0.05, between specified groups. C+C, platelets plus monocytes from heterologous control participants; C+D, control platelets plus monocytes from patients with dengue; D+C, platelets from dengue patients plus control monocytes.

aggregates. Thus, we evaluated monocyte responses after exposure to activated platelets or to activated and apoptotic platelets. Platelet activation and apoptosis were induced by specific agonist stimulation, as previously described (26). Platelets stimulated with thrombin or convulxin alone became activated but not apoptotic; in contrast, platelets stimulated with thrombin plus convulxin became activated and apoptotic, as demonstrated by P-selectin surface expression, phosphatidylserine exposure, and loss of $\Delta\Psi_m$ (Fig. 5A). As shown in Fig. 5B, monocytes incubated with thrombin-activated platelets secreted IL-8 but not IL-10. In contrast, the exposure of monocytes to platelets stimulated with thrombin plus convulxin induced both IL-8 and IL-10. Importantly, the agonists alone did not induce significant cytokine secretion in monocytes.

To better understand the mechanisms by which monocytes secrete cytokines in response to apoptotic and/or activated platelets, monocytes were exposed to platelets in the presence of anti-P-selectin or anti-phosphatidylserine Abs. As previously reported (11), blocking of P-selectin damped the secretion of IL-8 in

monocytes interacted with activated platelets, independently if stimulated with thrombin or thrombin plus convulxin (Fig. 5C). Interestingly, the secretion of IL-10 in monocytes exposed to platelets stimulated with thrombin plus convulxin also was damped by P-selectin blocking (Fig. 5D). The secretion of IL-8 by platelet–monocyte aggregates was not affected by anti-phosphatidylserine Abs (Fig. 5E). Nevertheless, blocking of phosphatidylserine on apoptotic platelets significantly reduced the secretion of IL-10 (Fig. 5F). These data indicate that IL-10 secretion by platelet–monocyte aggregation depends on both P-selectin–mediated binding and phosphatidylserine recognition on activated and apoptotic platelets.

Phosphatidylserine recognition is sufficient to induce IL-10 secretion by monocytes

Beyond its immunomodulatory activities, phosphatidylserine recognition is the main signal for apoptotic cell phagocytosis. During platelet–monocyte aggregation, the levels of platelet phagocytosis were higher in monocytes interacting with thrombin plus

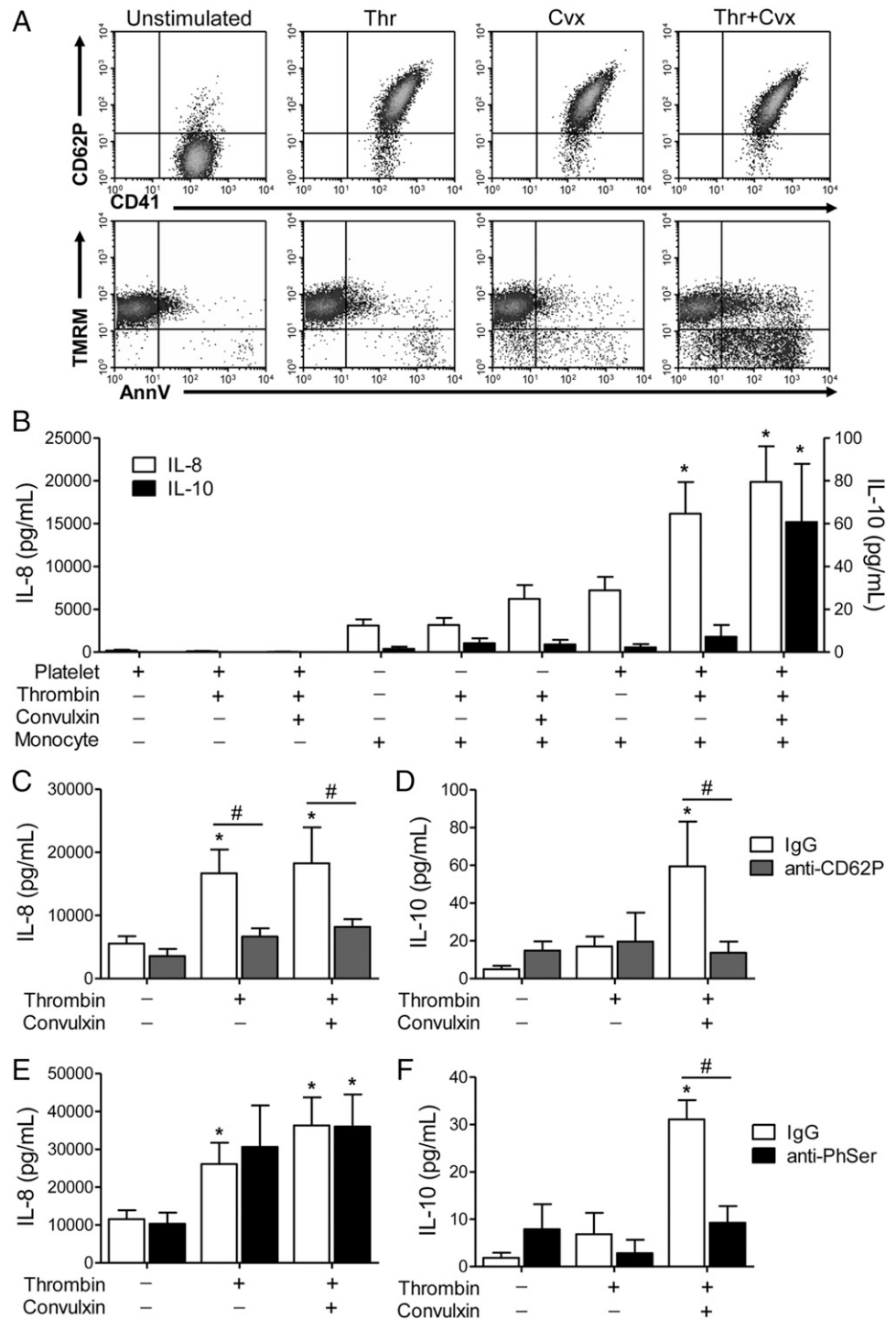


FIGURE 5. Apoptotic platelet recognition mediates IL-10 secretion by platelet-monocyte aggregates. **(A)** Representative density plots showing P-selectin surface expression, $\Delta\Psi_m$, and phosphatidylserine (PhSer) exposure in platelets activated with thrombin (Thr) and/or convulxin (Cvx). **(B-F)** Monocytes were exposed to resting platelets or platelets activated with Thr or Thr+Cvx in the presence or absence of neutralizing Abs against CD62-P or PhSer. Concentrations of IL-8 (B, C, and E) and IL-10 (B, D, and F) in the supernatants of cells incubated in each condition. The bars represent mean \pm SEM of four to eight independent experiments. * $p < 0.05$, versus unstimulated platelets; # $p < 0.05$, versus IgG.

convulxin-stimulated platelets compared with unstimulated platelets (Fig. 6A, 6B). Treatment of platelets with anti-P-selectin or anti-phosphatidylserine Abs significantly reduced the phagocytosis of apoptotic platelets (Fig. 6A, 6B). To better understand the role played by platelet phagocytosis in the regulation of IL-10 secretion, monocytes were pretreated (30 min) with the cytoskeleton assembly inhibitors cytochalasin D (10 $\mu\text{g/ml}$) and cytochalasin B (10 $\mu\text{g/ml}$), which significantly impaired uptake of apoptotic platelets (Fig. 6A, 6B). Interestingly, platelet phagocytosis was not required for the secretion of IL-8 or IL-10 (Fig. 6C, 6D). We next investigated whether a synergistic signaling of P-selectin and phosphatidylserine is required to induce IL-10 synthesis. We observed increased adhesion of monocytes plated on P-selectin and/or

phosphatidylserine compared with HSA (Fig. 6E, 6F). Monocytes plated on P-selectin and/or phosphatidylserine also secreted increased levels of IL-8. However, the secretion of IL-10 was preferentially found in monocytes adherent to phosphatidylserine or to P-selectin plus phosphatidylserine compared with HAS-coated plates (Fig. 6G). These results indicate that phosphatidylserine recognition is sufficient to induce IL-10 secretion by monocytes, suggesting that phagocytosis of apoptotic platelets or synergistic signaling by P-selectin plus phosphatidylserine is not required (Fig. 7).

Discussion

Thrombocytopenia and increased vascular permeability are hallmarks of dengue illness. Although high concentration of pro- and

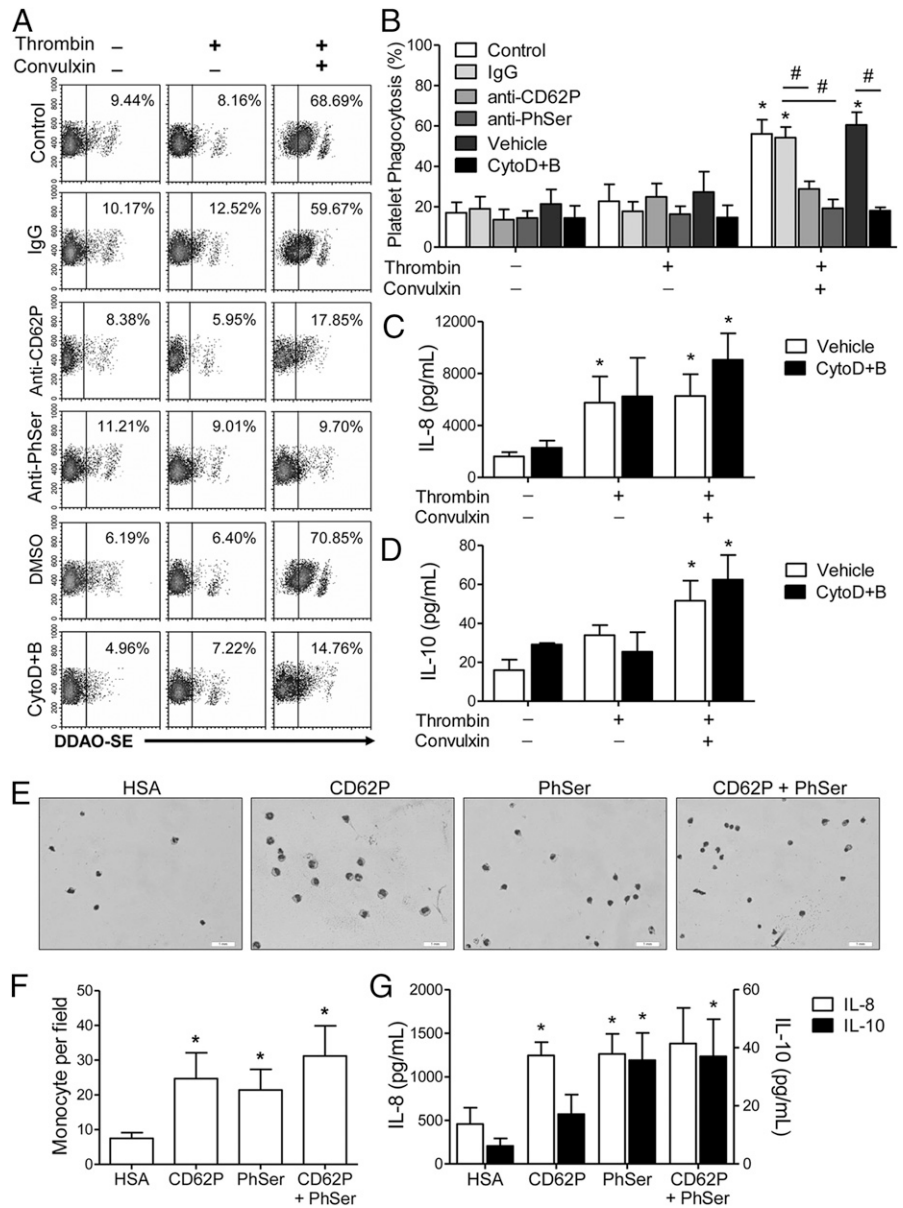


FIGURE 6. Phosphatidylserine recognition mediates platelet phagocytosis and IL-10 secretion. Representative density plots (A) and bar graphs (B) showing the percentage of platelet phagocytosis by monocytes exposed to resting platelets or platelets stimulated with thrombin or thrombin plus convulxin in the presence or absence of anti-CD62P, anti-phosphatidylserine (PhSer), or cytochalasin D plus cytochalasin B (CytoD+B). Concentrations of IL-8 (C) and IL-10 (D) in the supernatants of cells treated with CytoD+B. (E and F) Monocyte adhesion on plates coated with HSA, P-selectin (CD62P), PhSer, or P-selectin + PhSer. (G) Concentrations of IL-8 and IL-10 in the supernatants of monocytes adherent to each substrate. (A) and (E) show representative images and density plots from four independent experiments. The value in the quadrant indicates the cell frequency of the quadrant. Scale bar, 100 μ m. The bars represent mean \pm SEM of four independent experiments. * p < 0.05, versus unstimulated platelets or HSA-coated plates; # p < 0.05, versus IgG or vehicle (DMSO).

anti-inflammatory cytokines have been extensively reported in dengue patients (4, 27–29), the sources and determinants for cytokine secretion are not fully elucidated. Our results demonstrate a role for platelet–monocyte interactions in the activation of monocytes during dengue infection. We observed increased levels of platelet–monocyte aggregates in patients with dengue, especially in samples from patients who exhibited thrombocytopenia and signs of increased vascular permeability. We found evidence that platelet binding modulates cytokine responses by monocytes in dengue. Interaction with platelets from patients with dengue enabled monocytes from healthy volunteers to synthesize and secrete IL-1 β , IL-8, and IL-10. Experiments with in vitro–stimulated platelets showed that the secretion of cytokines is regulated by P-selectin–mediated adhesion and, in addition, recognition of apoptotic platelets through phosphatidylserine (Fig. 7). Induction of immunomodulatory gene expression in platelet–monocyte aggregates by phosphatidylserine signaling has not been reported previously.

Platelet adhesion to leukocytes is mediated by platelet P-selectin surface expression (11, 13, 24), which is increased in platelets from patients with dengue (8). Onlamoon et al. (30) found that

DENV elicits platelet–monocyte and platelet–neutrophil aggregates in a primate model for severe dengue. Platelet–monocyte aggregates also were observed in mild dengue in humans (14). In these interactions, the binding of P-selectin on activated platelets to P-selectin glycoprotein ligand (PSGL)-1 on monocytes not only tethers the cells together but also triggers functional responses in the monocytes (24), among them cytokine synthesis and secretion (10, 11, 25). Of importance, the cytokines IL-1 β , IL-8, and IL-10, which were released by monocytes in response to interactions with platelets from dengue patients, are frequently increased in plasma from patients with severe dengue (4, 27–29).

It is known that signals delivered to monocytes by binding of platelet P-selectin to PSGL-1 are integrated and amplified by factors secreted from platelets (11, 31), including the chemokine RANTES (11). In this study, platelets from dengue-infected patients secreted lower levels of RANTES in vitro than did platelets from healthy volunteers. This may be explained by extensive release of platelet granule contents in vivo before platelet isolation, because platelets from patients with dengue were shown to be activated. Furthermore, we showed previously that platelets release RANTES in response to DENV exposure (21). Because

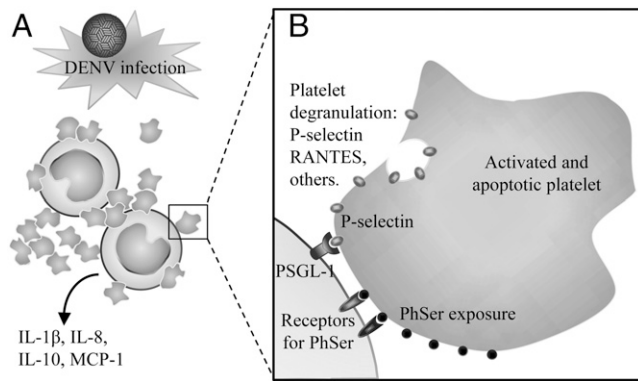


FIGURE 7. Schematic representation of platelet-induced cytokine secretion by monocytes. **(A)** Interaction of activated and apoptotic platelets with monocytes during DENV infection promotes secretion of IL-1 β , IL-8, IL-10, and MCP-1. **(B)** Surface binding of P-selectin to PSGL-1 and recognition of phosphatidylserine (PhSer) by PhSer receptors, in parallel with the secretion of chemokines from platelet α -granules, are the main mechanisms for immunomodulation of monocytes by activated and apoptotic platelets after agonist stimulation. Even though we show phosphatidylserine-mediated signaling in platelet-monocyte aggregates in vitro and during dengue infection, it potentially occurs in any disease condition where platelet activation and platelet apoptosis take place (i.e. dengue, sepsis).

MCP-1 synthesis by monocytes in response to platelet adhesion depends on concomitant RANTES signaling (11), the exhaustion of RANTES in platelets from dengue-infected patients may explain why these platelets failed to induce higher MCP-1 secretion compared with control platelets, even though they express more P-selectin. Platelet-monocyte aggregate formation probably contributes to MCP-1 release in vivo, because both platelet-monocyte aggregates and RANTES are increased in patients with dengue (29, 32).

In previous studies from our group (4) and other investigators (33, 34), the levels of MCP-1, IL-1 β , IL-8, and IL-10 were associated with severe thrombocytopenia in dengue. These associations are in agreement with the formation of platelet-monocyte aggregates as a mechanism for both thrombocytopenia and cytokine release, as suggested by the correlation of platelet-monocyte aggregates with platelet counts in the present work. Platelet-monocyte aggregates also were associated with increased vascular permeability in dengue patients. The endothelial effects of the cytokines released in response to platelet-monocyte binding might explain this association. The cytokines IL-1 β , IL-8, and MCP-1 are reported to be mediators in DENV-triggered endothelial leak based on in vitro assays (21, 35, 36). Furthermore, IL-1 β is linked to enhanced vascular permeability, hypotension, and hemoconcentration in dengue-infected patients (4, 21). We showed previously that activated platelets are important sources of IL-1 β during dengue infection, and that platelet-released IL-1 β contributes to increased endothelial permeability in dengue (21). We now show that activated platelets also contribute to IL-1 β levels in dengue by inducing IL-1 β synthesis in monocytes. However, we cannot exclude that IL-1 β secreted by platelets from patients with dengue may have contributed to the higher levels of IL-1 β in platelet-monocyte interactions (Fig. 4A). Relevant to the importance of platelets and platelet-monocyte aggregates as sources of IL-1 β in systemic infections, depletion of platelets completely reduced the circulating levels of IL-1 β in mice with experimental cerebral malaria (37).

Beyond proinflammatory cytokines, exposure to platelets from dengue-infected patients induced the secretion of IL-10 in monocytes. IL-10 is an anti-inflammatory and regulatory cytokine

with many immunomodulatory properties. This cytokine inhibited DENV-specific T cell responses, as shown by ex vivo and in vitro models (38). Accordingly, patients with severe dengue exhibit increased levels of IL-10 compared with patients with mild dengue (39, 40), and higher levels of IL-10 are observed in nonsurvivors than in survivors among patients with severe dengue (41).

In addition to platelet activation, we showed previously that platelets from dengue patients have characteristics that are indicative of apoptosis, among them the exposure of phosphatidylserine (8). Similarly, platelets from dengue patients in the current study had increased phosphatidylserine exposure. Phosphatidylserine exposure is the main “eat-me” signaling for apoptotic cell clearance. Recognition of phosphatidylserine by mononuclear phagocytes promotes apoptotic cell uptake, as well as immunoregulatory responses, including IL-10 synthesis and secretion (16, 42). Alonzo et al. (15) showed that cultured macrophages phagocytized platelets from dengue-infected patients, depending on phosphatidylserine recognition. In our model for agonist-induced platelet apoptosis, the recognition of phosphatidylserine induced platelet phagocytosis, as well as IL-10 secretion. IL-10 secretion also was induced in monocytes exposed to platelets from patients with dengue. Gudbrandsdottir et al. (43) recently reported higher IL-10 synthesis in platelet-attached monocytes after stimulation of PBMCs with LPS in the presence of platelets. In agreement, platelet phagocytosis and IL-10 secretion also were influenced by P-selectin-mediated binding in our platelet-monocyte interactions. Although blocking P-selectin reduced IL-10 secretion in platelet-monocyte aggregates, our results with isolated adherent monocytes indicate that the recognition of phosphatidylserine is sufficient to induce IL-10 secretion. P-selectin binding probably contributes to apoptotic platelet phagocytosis and IL-10 secretion by facilitating phosphatidylserine recognition while tethering the cells together. These results are in agreement with those from other investigators who showed that apoptotic platelet clearance by neutrophils is a biphasic event that depends on P-selectin-mediated adhesion, followed by phosphatidylserine-mediated internalization (44). Thus, P-selectin- and phosphatidylserine-mediated cell interactions may represent new targets for dengue treatment research, and Abs against P-selectin and phosphatidylserine were recently shown to be safe for human use in phase 1 clinical trials (45–47). Although our findings suggest that monocytes secrete IL-10 through recognition of apoptotic platelets in dengue, we cannot exclude that this also occurs in response to other apoptotic cell types. In a previous study, levels of IL-10 were associated with the presence of apoptotic lymphocytes in dengue-infected patients (39).

In summary, to our knowledge, we report for the first time the contributions of platelets to inflammatory and immunomodulatory responses of monocytes during dengue infection. We provide evidence for platelet-monocyte aggregate formation during dengue infection and platelet-dependent monocyte activation with IL-1 β , IL-8, IL-10, and MCP-1 synthesis and secretion. We also provide new insights regarding the biology of platelet-monocyte interactions, with the recognition of phosphatidylserine on apoptotic platelets as a key immunoregulatory event. Each of these events and cellular interactions potentially contribute to the pathogenesis of dengue.

Acknowledgments

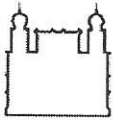
We thank Robert Campbell for technical assistance and the Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde platform for multiplex analysis.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Schmidt, A. C. 2010. Response to dengue fever—the good, the bad, and the ugly? *N. Engl. J. Med.* 363: 484–487.
2. Bhatt, S., P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504–507.
3. World Health Organization. 2009. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
4. Bozza, F. A., O. G. Cruz, S. M. Zagne, E. L. Azeredo, R. M. Nogueira, E. F. Assis, P. T. Bozza, and C. F. Kubelka. 2008. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect. Dis.* 8: 86.
5. Schexneider, K. I., and E. A. Reedy. 2005. Thrombocytopenia in dengue fever. *Curr. Hematol. Rep.* 4: 145–148.
6. Mourão, M. P., M. V. Lacerda, V. O. Macedo, and J. B. Santos. 2007. Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets* 18: 605–612.
7. Hottz, E., N. Toley, G. Zimmerman, A. Weyrich, and F. Bozza. 2011. Platelets in Dengue Infection. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 8: e33–e38.
8. Hottz, E. D., M. F. Oliveira, P. C. Nunes, R. M. Nogueira, R. Valls-de-Souza, A. T. Da Poian, A. S. Weyrich, G. A. Zimmerman, P. T. Bozza, and F. A. Bozza. 2013. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J. Thromb. Haemost.* 11: 951–962.
9. Semple, J. W., J. E. Italiano, Jr., and J. Freedman. 2011. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 264–274.
10. Weyrich, A. S., M. M. Denis, J. R. Kuhlmann-Eyre, E. D. Spencer, D. A. Dixon, G. K. Marathe, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, and S. M. Prescott. 2005. Dipyrromole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates. *Circulation* 111: 633–642.
11. Weyrich, A. S., M. R. Elstad, R. P. McEver, T. M. McIntyre, K. L. Moore, J. H. Morrissey, S. M. Prescott, and G. A. Zimmerman. 1996. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97: 1525–1534.
12. Weyrich, A. S., S. Lindemann, and G. A. Zimmerman. 2003. The evolving role of platelets in inflammation. *J. Thromb. Haemost.* 1: 1897–1905.
13. Vieira-de-Abreu, A., R. A. Campbell, A. S. Weyrich, and G. A. Zimmerman. 2012. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin. Immunopathol.* 34: 5–30.
14. Tsai, J. J., Y. H. Jen, J. S. Chang, H. M. Hsiao, S. Noisakran, and G. C. Perng. 2011. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J. Innate Immun.* 3: 530–540.
15. Alonzo, M. T., T. L. Lacuesta, E. M. Dimaano, T. Kurosu, L. A. Suarez, C. A. Mapua, Y. Akeda, R. R. Matias, D. J. Kuter, S. Nagata, et al. 2012. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J. Infect. Dis.* 205: 1321–1329.
16. Chung, E. Y., J. Liu, Y. Homma, Y. Zhang, A. Brendolan, M. Saggese, J. Han, R. Silverstein, L. Selleri, and X. Ma. 2007. Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 27: 952–964.
17. Pang, T., M. J. Cardosa, and M. G. Guzman. 2007. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol. Cell Biol.* 85: 43–45.
18. Falconar, A. K., E. de Plata, and C. M. Romero-Vivas. 2006. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 1044–1051.
19. Kuno, G., I. Gómez, and D. J. Gubler. 1991. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J. Virol. Methods* 33: 101–113.
20. Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, and J. H. Huang. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10: 622–630.
21. Hottz, E. D., J. F. Lopes, C. Freitas, R. Valls-de-Souza, M. F. Oliveira, M. T. Bozza, A. T. Da Poian, A. S. Weyrich, G. A. Zimmerman, F. A. Bozza, and P. T. Bozza. 2013. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* 122: 3405–3414.
22. Denis, M. M., N. D. Tolley, M. Bunting, H. Schwertz, H. Jiang, S. Lindemann, C. C. Yost, F. J. Rubner, K. H. Albertine, K. J. Swoboda, et al. 2005. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122: 379–391.
23. Aslam, R., M. Kim, E. R. Speck, A. C. Seetana, S. Molinski, J. Freedman, and J. W. Semple. 2007. Platelet and red blood cell phagocytosis kinetics are differentially controlled by phosphatase activity within mononuclear cells. *Transfusion* 47: 2161–2168.
24. Larsen, E., A. Celi, G. E. Gilbert, B. C. Furie, J. K. Erban, R. Bonfanti, D. D. Wagner, and B. Furie. 1989. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59: 305–312.
25. Dixon, D. A., N. D. Tolley, K. Bemis-Standoli, M. L. Martinez, A. S. Weyrich, J. D. Morrow, S. M. Prescott, and G. A. Zimmerman. 2006. Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J. Clin. Invest.* 116: 2727–2738.
26. Jobe, S. M., K. M. Wilson, L. Leo, A. Raimondi, J. D. Molkenin, S. R. Lentz, and J. Di Paola. 2008. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood* 111: 1257–1265.
27. Houghton-Triviño, N., K. Martín, K. Giaya, J. A. Rodríguez, I. Bosch, and J. E. Castellanos. 2010. [Comparison of the transcriptional profiles of patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever reveals differences in the immune response and clues in immunopathogenesis]. *Biomedica* 30: 587–597.
28. Jaiyen, Y., P. Masrinoul, S. Kalayanaroj, R. Pulmanusahakul, and S. Ubol. 2009. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol. Immunol.* 53: 442–450.
29. Rathakrishnan, A., S. M. Wang, Y. Hu, A. M. Khan, S. Ponnampalavar, L. C. Lum, R. Manikam, and S. D. Sekaran. 2012. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS ONE* 7: e22215.
30. Onlamoon, N., S. Noisakran, H. M. Hsiao, A. Duncan, F. Villinger, A. A. Ansari, and G. C. Perng. 2010. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood* 115: 1823–1834.
31. Stephen, J., B. Emerson, K. A. Fox, and I. Dransfield. 2013. The uncoupling of monocyte-platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. *J. Immunol.* 191: 5677–5683.
32. de-Oliveira-Pinto, L. M., C. F. Marinho, T. F. Povoia, E. L. de Azeredo, L. A. de Souza, L. D. Barbosa, A. R. Motta-Castro, A. M. Alves, C. A. Ávila, L. J. de Souza, et al. 2012. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS ONE* 7: e38527.
33. Priyadarshini, D., R. R. Gadia, A. Tripathy, K. R. Gurukumar, A. Bhagat, S. Patwardhan, N. Mokashi, D. Vaidya, P. S. Shah, and D. Cecilia. 2010. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS ONE* 5: e8709.
34. Azeredo, E. L., S. M. Zagne, M. A. Santiago, A. S. Gouvea, A. A. Santana, P. C. Neves-Souza, R. M. Nogueira, M. P. Miagostovich, and C. F. Kubelka. 2001. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* 204: 494–507.
35. Talavera, D., A. M. Castillo, M. C. Dominguez, A. E. Gutierrez, and I. Meza. 2004. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J. Gen. Virol.* 85: 1801–1813.
36. Lee, Y. R., M. T. Liu, H. Y. Lei, C. C. Liu, J. M. Wu, Y. C. Tung, Y. S. Lin, T. M. Yeh, S. H. Chen, and H. S. Liu. 2006. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J. Gen. Virol.* 87: 3623–3630.
37. Aggrey, A. A., K. Srivastava, S. Ture, D. J. Field, and C. N. Morrell. 2013. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 190: 4685–4691.
38. Malavige, G. N., C. Jeevandar, K. M. Alles, M. Salimi, L. Gomes, A. Kamaladasa, S. D. Jayaratne, and G. S. Ogg. 2013. Suppression of virus specific immune responses by IL-10 in acute dengue infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2409.
39. Malavige, G. N., L. C. Huang, M. Salimi, L. Gomes, S. D. Jayaratne, and G. S. Ogg. 2012. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. *PLoS ONE* 7: e50387.
40. van de Weg, C. A., C. S. Pannuti, E. S. de Araújo, H. J. van den Ham, A. C. Andeweg, L. S. Boas, A. C. Felix, K. I. Carvalho, A. M. de Matos, J. E. Levi, et al. 2013. Microbial translocation is associated with extensive immune activation in dengue virus infected patients with severe disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2236.
41. Chen, L. C., H. Y. Lei, C. C. Liu, S. C. Shiesh, S. H. Chen, H. S. Liu, Y. S. Lin, S. T. Wang, H. W. Shyu, and T. M. Yeh. 2006. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 142–147.
42. Freire-de-Lima, C. G., D. O. Nascimento, M. B. Soares, P. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, F. G. de Mello, G. A. DosReis, and M. F. Lopes. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403: 199–203.
43. Gudbrandsdottir, S., H. C. Hasselbalch, and C. H. Nielsen. 2013. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *J. Immunol.* 191: 4059–4067.
44. Maugeri, N., P. Rovere-Querini, V. Evangelista, C. Covino, A. Capobianco, M. T. Bertilaccio, A. Piccoli, L. Totani, D. Cianflone, A. Maseri, and A. A. Manfredi. 2009. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and beta2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood* 113: 5254–5265.
45. Gerber, D. E., A. T. Stopeck, L. Wong, L. S. Rosen, P. E. Thorpe, J. S. Shan, and N. K. Ibrahim. 2011. Phase I safety and pharmacokinetic study of baviximab, a chimeric phosphatidylserine-targeting monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 17: 6888–6896.
46. Kling, D., C. Stucki, S. Kronenberg, D. Tuerck, E. Rhéaume, J. C. Tardif, J. Gaudreault, and C. Schmitt. 2013. Pharmacological control of platelet-leukocyte interactions by the human anti-P-selectin antibody inlucumab—pre-clinical and clinical studies. *Thromb. Res.* 131: 401–410.
47. Tardif, J. C., J. F. Tanguay, S. S. Wright, V. Duchatelle, T. Petroni, J. C. Grégoire, R. Ibrahim, T. M. Heinonen, S. Robb, O. F. Bertrand, et al. 2013. Effects of the P-selectin antagonist inlucumab on myocardial damage after percutaneous coronary intervention for non-ST-segment elevation myocardial infarction: results of the SELECT-ACS trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61: 2048–2055.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

ANEXO VI



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 016/2010

Protocolo 0066.0.009.000-09

1. Identificação:

Título do Projeto: "Mecanismos de Ativação Plaquetária na Infecção pelo Vírus da Dengue".

Pesquisador Responsável: Fernando Augusto Bozza.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 03/11/2009.

2. Sumário:

Visa a identificar os mecanismos de ativação plaquetária associados à resposta inflamatória, induzidos direta ou indiretamente pela infecção a partir de um modelo de interação plaqueta-monócito. Tem como objetivos específicos: 1) identificar infecção direta de plaquetas por DV através de marcação intracelular de plaquetas infectadas *in vitro* ou isoladas de pacientes com dengue; 2) caracterizar os efeitos da infecção sobre plaquetas e monócitos isoladamente e em combinação; 3) avaliar a ativação plaquetária em isolado de plaquetas infectadas com DV-2 isoladamente e na interação plaqueta-monócito; 4) avaliar a ativação plaquetária em isolado de plaquetas de pacientes com dengue; 5) avaliar o estresse oxidativo em plaquetas infectadas como DV através de oxigrafia de alta resolução; 6) correlacionar infecção da plaqueta, ativação plaquetária e estresse oxidativo com aspectos clínicos quando o material for obtido de pacientes com dengue, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC). Trata-se de um estudo com amostra de conveniência. Estima-se que cerca de 50 pacientes serão incluídos nos 12 meses de duração do período de inclusão. Pretende-se, portanto, com esse projeto, compreender os mecanismos de ativação plaquetária envolvidos na patogênese da infecção pelo vírus da dengue objetivando o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas e detecção de marcadores de ativação celular que auxiliem no diagnóstico da progressão para as formas graves.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi elaborado em linguagem acessível aos sujeitos de pesquisa. Será financiado pela FAPERJ, Doenças Negligenciadas, grant nº E26/111615/2008.


4. Diligências:

Sim. Foram satisfeitas.

5. Parecer: APROVADO.

Data: 23 de março de 2010.

Assinatura do Coordenador:


Dr. Lés Carrillo-Couti
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ