

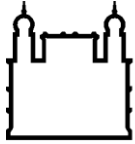
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

EFEITO DAS QUIMIOCINAS NA ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE  
CÉLULAS ENDOTELIAIS NA DENGUE

MÁRCIO DA COSTA CIPITELLI

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*MÁRCIO DA COSTA CIPITELLI*

#### **Efeito das Quimiocinas na alteração da permeabilidade de células endoteliais na dengue**

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

**Orientadora: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto**

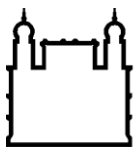
**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2014

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

Cipitelli, Márcio da Costa  
C577 Efeito das quimiocinas na alteração da permeabilidade de células endoteliais na dengue /  
Márcio da Costa Cipitelli. – Rio de Janeiro, 2014. xvi, 88 f. : il. ; 30 cm.  
Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária,  
2014.  
Bibliografia: f. 75-83  
1. Quimiocinas. 2. Dengue. 3. Ensaio de permeabilidade. I. Título

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: MÁRCIO DA COSTA CIPITELLI***

### **EFEITO DAS QUIMIOCINAS NA ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS NA DENGUE**

**ORIENTADORA: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto**

**Aprovada em: 23/12/2013**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior - Presidente**

**Prof. Dra. Carmen Penido Monteiro**

**Prof. Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira**

**Prof. Dra. Paula Mello de Luca**

**Prof. Dra. Flavia Barreto dos Santos**

Rio de Janeiro, 23 de Dezembro de 2014

Dedico esta dissertação a todas as  
pessoas e familiares que me  
deram força para continuar e  
sempre seguir em frente por maior  
que seja o obstáculo

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai Celso Cipitelli, minha mãe Cassia Maria da Costa Cipitelli e toda minha família, pelos sacrifícios e esforços para me ajudarem e que mesmo estando longe sempre me incentivaram a continuar lutando pelos meus objetivos.

A minha amiga e colega de trabalho Cintia Ferreira Marinho pela dedicação em me ajudar nos momentos de dificuldade durante este projeto.

Aos meus amigos Jessica Badolato e Iury Paiva pela ajuda em meus experimentos.

Aos demais amigos e também companheiros de trabalhos do LIV por sempre me ajudarem profissionalmente e pessoalmente de forma essencial.

A doutoranda Nieli Faria, Dra. Rita Nogueira e toda a equipe do laboratório de Flavivírus pela realização dos diagnósticos dos pacientes desta epidemia que foram essenciais para este projeto.

Aos médicos Dr Rivaldo Venâncio e Dr. Luis José de Souza pela colaboração e auxílio durante os trabalhos de campos realizados nesta epidemia.

A todos os pacientes voluntários que colaboraram com este projeto.

A Dra Claire Kubelka e Dra Elzinandes pela ajuda e apoio científico

A Dra Luzia Maria de Oliveira Pinto não somente por ter me ajudado no mestrado e nesta etapa final, mas também por ter me acolhido e acreditado em mim. Sempre serei agradecido e lembrarei de todo esforço e dedicação dado para mim.

A minha amiga, companheira e namorada Nathália Vinagre, por ter me mostrado o caminho que sigo hoje e pela ajuda e incentivo nos momentos mais difíceis neste trajeto.

À Pós-graduação em Biologia Parasitária

A nossa banca avaliadora a Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira, Dra. Carmen Penido Monteiro, Dra. Flavia Barreto dos Santos, Dra. Paula Mello de Luca e ao presidente e revisor da banca Dr. Josué da Costa Lima Junior pela gentileza de aceitar nosso convite de defesa neste período natalino

Aos suportes financeiros, CAPES e FAPERJ durante o desenvolvimento de minha dissertação e ao CNPq, FAPERJ, IOC/FIOCRUZ pelos auxílios nos materiais necessários para o projeto.

*“De tudo, ficaram três coisas:*

*A certeza de que estamos sempre começando...*

*A certeza de que precisamos continuar...*

*A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar....*

*Portanto devemos:*

*Fazer da interrupção um caminho novo ...*

*Da queda um passo de dança...*

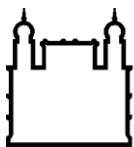
*Do medo, uma escada...*

*Do sonho, uma ponte...*

*Da procura, um encontro...”*

*Fernando Pessoa*





Ministério da Saúde

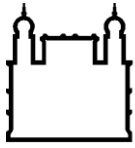
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## EFEITO DAS QUIMIOCINAS NA ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS NA DENGUE

### RESUMO

Quimiocinas são citocinas envolvidas em processos inflamatórios e homeostáticos. Estudos *in vitro* vêm demonstrando a influência desses mediadores na alteração da permeabilidade endotelial na infecção pelo vírus dengue (DENV). Dengue é uma doença de amplo espectro clínico, variando desde uma infecção assintomática a casos graves, com manifestações hemorrágicas e/ou extravasamento plasmático e, em menor frequência, ao óbito de pacientes. O objetivo de nosso projeto foi avaliar o envolvimento de quimiocinas séricas presentes em pacientes infectados pelo DENV na alteração da permeabilidade transendotelial, utilizando células endoteliais primárias num sistema *in vitro*. Para isso realizamos estudo populacional para obtenção de amostras de sangue de casos suspeitos de dengue durante epidemia de 2013 e de indivíduos sadios. Após confirmação laboratorial, foi realizada classificação clínica dos casos segundo a OMS 2009. No soro dos pacientes e controles foi realizada quantificação dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 e das quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES e CX3CL1/Fractalcina por ELISA ou LUMINEX. Para os ensaios de permeabilidade, foram feitos cultivo e manutenção de células endoteliais primárias HMVEC-d para padronização do ensaio, através da medida da resistência elétrica transendotelial (TEER). Na tentativa de avaliar a contribuição das quimiocinas na medida do TEER, foram adicionados sobre monocamada de HMVEC-d com 80% de confluência em sistema Transwell, 20% de soro de pacientes pré-tratados ou não com bloqueadores de CCL4/MIP-1 $\beta$ , CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalcina, CCL5/RANTES e IgG e feito uma cinética. Brevemente, foram confirmados 181 pacientes, com predominância do DENV-4, distribuídos segundo a OMS em: 125 febre do dengue sem sinais de alarme (FD), 54 FD com sinais de alarme (FDSA) e 2 dengue grave (FDSA/Grave). De forma interessante, a infecção pelo DENV-4 sugeriu características clínicas e laboratoriais mais brandas comparadas a epidemias por outros sorotipos. Independentemente da gravidade, os pacientes DENV-4 apresentaram altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-10, CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 e CX3CL1/Fractalcina, mas não de IL-1 $\beta$  e CCL5/RANTES comparado aos controles saudáveis. Nossa estratégia para avaliar a capacidade de alterar a permeabilidade das monocamadas de HMVEC-d foi agrupar os pacientes em dois grupos, altos (n=5) e baixos (n=5) produtores de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL8/IL-8. Surpreendentemente, os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL8/IL-8 parecem não influenciar a medida do TEER. Dos 10 pacientes, 4 não alteraram a medida do TEER e 6 alteraram em algum momento da cinética. O bloqueio das quimiocinas parece não ter influenciado a medida do TEER nas condições estabelecidas. Análises de correlação indicaram uma tendência dos níveis séricos de IL-1 $\beta$  e CXCL8/IL-8 e CX3CL1/Fractalcina protegerem a monocamada das alterações, enquanto essa proteção parece ter sido mais efetiva em relação aos níveis séricos CCL5/RANTES. O conjunto desses dados nos indica que o DENV-4 parece levar a uma dengue na forma mais branda nos pacientes, aliado a uma redução de parâmetros clínico-laboratoriais associados à gravidade. Citocinas e quimiocinas estão presentes em altos níveis séricos nestes pacientes e parecem ser autorreguladas. Dentre os mediadores inflamatórios, quimiocinas como CCL5/RANTES parece influenciar de forma impactante a alteração da permeabilidade de células endoteliais, o que não foi confirmado pelos ensaios de bloqueio, mas pela correlação direta dos níveis séricos de CCL5/RANTES com a medida do TEER.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## EFFECT OF CHEMOKINES IN ALTERATION OF ENDOTHELIAL CELL PERMEABILITY IN DENGUE

### ABSTRACT

Chemokines are cytokines involved in homeostatic and inflammatory processes. *In vitro* studies have demonstrated the influence of these mediators in the alteration of endothelial permeability in Dengue virus (DENV) infection. Dengue is a wide clinical spectrum disease, ranging from an asymptomatic infection to severe cases with hemorrhagic manifestations and / or plasma extravasation that could result in death of patients. The aim of our project was to evaluate the involvement of serum chemokines present in patients infected with DENV in changing the transendothelial permeability using primary endothelial cells *in vitro* system. To population-based study conducted to obtain blood samples from suspected dengue cases during the epidemic of 2013 and the control group. After laboratory confirmation, clinical classification was made of the cases according to the WHO 2009. In the serum of patients and controls was performed quantification of levels of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 and chemokines CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES and CX3CL1/Fractalkine by ELISA or LUMINEX. For the permeability tests were made cultivation and maintaining primary endothelial cell (HMVEC-d) and measuring transendothelial electrical resistance (TEER). In order to assess the contribution of chemokines in the extent TEER were added to monolayer HMVEC-d at 80% confluence in Transwell System, 20% serum from patients pretreated or not with blocking CCL4/MIP-1 $\beta$ , CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine, CCL5/RANTES and IgG made kinetics. Briefly, 181 patients were confirmed, with a predominance of DENV-4, distributed according to the WHO in: 125 dengue fever without warning signs (FD), 54 FD with alarm signals (FDSA) and 2 severe dengue (FDSA/Severe). Interestingly, infection with DENV-4 suggested clinical and laboratory characteristics milder compared to epidemics by other serotypes. Regardless of gravity, DENV-4 patients presented high levels of TNF- $\alpha$ , IL-10, CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 and CX3CL1/Fractalkine, but not IL-1 $\beta$  and CCL5/RANTES compared to healthy controls. Our strategy to assess the capacity change the permeability of monolayers HMVEC-d was to group the patients into two groups, high (n = 5) and low (n = 5) TNF- $\alpha$  producers, IL-1 $\beta$  and CXCL8 / IL -8. Surprisingly, the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8 did not significantly influence the measurement of TEER. Of the 10 patients, 4 did not alter the extent TEER and 6 changed at some point in kinetics. Blocking chemokine did not influence the measurement of TEER on the established conditions. Correlation analysis indicated a trend of serum levels of IL-1 $\beta$  patients and CXCL8/IL-8 and CX3CL1/Fractalkine protect monolayer of changes, while this protection appears to have been more effective with respect to serum CCL5/RANTES. These data suggest that the DENV-4 appears to lead to dengue in milder form in patients, combined with a reduction of clinical and laboratory parameters associated with severity. Chemokines and cytokines are present in high serum levels in these patients and seem to be autorregulated. Among inflammatory mediators, such as chemokine CCL5/RANTES impactful seems to influence the change in permeability of endothelial cells, which was not confirmed by blocking assays, but for the direct correlation of serum levels of CCL5/RANTES with the measure of TEER.

## Lista de abreviaturas

ABTS: ácido sulfônico  
ACKR: receptor de quimiocina atípica  
ACKR1/Duffy: receptor 1 de quimiocina atípica/ receptor do antígeno Duffy  
ACKR2/D6: receptor 2 de quimiocina atípica/ receptor D6 de quimiocina CC  
ACKR3/CXCR7: receptor 3 de quimiocina atípica/ receptor 7 para quimiocina CXC  
ACKR4/CCRL1: receptor 4 de quimiocina atípica/ receptor de quimiocina CC semelhante ao tipo 1  
ACKR5/CCRL2: receptor 5 de quimiocina atípica/ receptor de quimiocina CC semelhante ao tipo 2  
ADE: aumento da infecção dependente de anticorpo  
ALT/TGP: alanina aminotransferase/transaminase glutâmico-pirúvica  
ART: terapia antirretroviral  
AST/TGO: aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico-oxalacética  
BSA: albumina sérica bovina  
C: família C quimiocina  
cAMP: 3', 5'-monofosfato de adenosina cíclico  
CC: família CC quimiocina  
CCL2/MCP-1: ligante 2 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos 1  
CCL3/MIP-1 $\alpha$ : ligante 3 de CC quimiocina/proteína 1 $\alpha$  inflamatória de macrófagos  
CCL4/MIP-1 $\beta$ : ligante 4 de CC quimiocina/proteína 1 $\beta$  inflamatória de macrófagos  
CCL5/RANTES: ligante 5 de CC quimiocina/regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais  
CCL6/MRP-1: ligante 6 de CC quimiocina/proteína 1 relacionada a macrófagos  
CCL7/MCP-3 : ligante 7 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos 3  
CCL8/MCP-2: ligante 8 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos 2  
CCL9/MIP-1: ligante 9 de CC quimiocina/ proteína 1 inflamatória de macrófagos  
CCL11/Eotaxin: ligante 11 de CC quimiocina/quimiocina seletiva para eosinófilo  
CCL13/MIP-3: ligante 13 de CC quimiocina/proteína 3 inflamatória de macrófagos  
CCL15/MIP-5: ligante 15 de CC quimiocina/proteína 5 inflamatória de macrófagos  
CCL16/LEC: ligante 16 de CC quimiocina/quimiocina expressa no fígado  
CCL19/MIP-3 $\beta$ : ligante 19 de CC quimiocina/proteína 3 $\beta$  inflamatória de macrófagos  
CCL21/SLC: ligante 21 de CC quimiocina/quimiocina expressa em tecido linfóide secundário  
CCL23/MIP-3: ligante 23 de CC quimiocina/proteína 3 inflamatória de macrófagos  
CCL26/Eotaxin-3: ligante 26 de CC quimiocina/quimiocina seletiva para eosinófilo 3  
CCL25/TECK: ligante 25 de CC quimiocina/quimiocina expressa no Timo  
CCL27/CTAK: ligante 27 de CC quimiocina/quimiocinas atrativas de células T cutânea

CCL28/MEC: ligante 28 de CC quimiocina/quimiocina associada a mucosa epitelial  
CCR: receptor para família CC quimiocina  
CCR1: receptor de quimiocina do tipo CC 1  
CCR2: receptor de quimiocina do tipo CC 2  
CCR4: receptor de quimiocina do tipo CC 4  
CCR5: receptor de quimiocina do tipo CC 5  
CCR6: receptor de quimiocina do tipo CC 6  
CCR7: receptor de quimiocina do tipo CC 7  
CCR8: receptor de quimiocina do tipo CC 8  
CCR9: receptor de quimiocina do tipo CC 9  
CCR10: receptor de quimiocina do tipo CC 10  
CE: célula endotelial  
CLEC5A: do inglês "*C-type lectin domain Family 5 member A*"  
CMSP: células mononucleares do sangue periférico  
CX3C: família CX3C quimiocina  
CX3CL1/Fractalcina: ligante 1 de CX3C quimiocina  
CX3CR1: receptor para família CX3C quimiocina  
CXC: família CXC quimiocina  
CXCL1/GRO- $\alpha$ : ligante 1 de CXC quimiocina/proteína  $\alpha$  reguladora de crescimento  
CXCL2/MIP-2 $\alpha$ : ligante 2 de CXC quimiocina/proteína 2 $\alpha$  inflamatória de macrófagos  
CXCL3/MIP-2 $\beta$ : ligante 3 de CXC quimiocina/proteína 2 $\beta$  inflamatória de macrófagos  
CXCL4/PF4: ligante 4 de quimiocina CXC/fator plaquetário 4  
CXCL5/ENA-78: ligante 5 de CXC quimiocina/peptídeo ativador de neutrófilo derivado de células epiteliais  
CXCL6/GCP-2: ligante 6 de CXC quimiocina/proteína quimiotática de granulócitos 2  
CXCL7/NAP-2: ligante 7 de CXC quimiocina/peptídeo ativador de neutrófilos 2  
CXCL8/ IL-8/MDNCF: ligante 8 de CXC quimiocina/ interleucina-8/ fator quimiotático de neutrófilo derivado de monócitos:  
CXCL9/MIG: ligante 9 de quimiocina CXC/monócina induzido por IFN- $\gamma$   
CXCL10/IP-10: ligante 10 de quimiocina CXC/proteína induzida por IFN- $\gamma$   
CXCL11/I-TAC: ligante 11 de quimiocina CXC/quimiocina de linfócito T induzida por IFN  
CXCL12/SDF-1: ligante 12 de CXC quimiocina/fator 1 derivado de células do estroma  
CXCR: receptor para família CXC quimiocina  
CXCR1: receptor de quimiocina do tipo CXC 1  
CXCR2: receptor de quimiocina do tipo CXC 2  
CXCR3: receptor de quimiocina do tipo CXC 3  
CXCR4: receptor de quimiocinas do tipo CXC 4  
CXCR5: receptor de quimiocinas do tipo CXC 5  
CXCR6: receptor de quimiocinas do tipo CXC 6  
CXCR7: receptor de quimiocinas do tipo CXC 7  
DC: célula dendrítica  
DC-SIGN: ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de células dendríticas

DENV: vírus da dengue  
DMSO: sulfóxido de dimetilo  
DRYLAIV: sequencia de aminoácidos do domínio 3 transmembranar  
EBM-2: meio endotelial basal  
ECV304: célula endotelial da veia do cordão umbilical humana  
EGM-2MV: meio de crescimento de célula endotelial 2  
ELISA: ensaio imuno-enzimático  
ELR: sequencia de aminoácidos: ácido glutâmico-leucina-arginina  
FD: dengue sem sinal de alarme  
FDSA: dengue com sinais de alarme  
FHD: febre hemorrágica do dengue  
GRP78: proteína reguladora de glicose de 78kDa  
HIV: vírus da imunodeficiência humana  
HLA: antígeno leucocitário humano  
HMEC-1: do inglês “*human mammary epithelial cells*”  
HMGB1: do inglês “*high-mobility group protein 1*”  
HMVEC: célula endotelial da microvasculatura dermal humana  
Hsp70/90: família de chaperona 70 e 90  
HSPG: proteoglicanos de heparan sulfato  
HUVEC: célula endotelial da veia umbilical humana  
ICAM-1: molécula de adesão intracelular-1  
ICAM-3: molécula de adesão intracelular-3  
IFN- $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ : interferon- $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$   
IgA: imunoglobulina A  
IgM: imunoglobulina M  
IL-10: interleucina-10  
IL-12: interleucina-12  
IL-1RA: receptor antagonista para interleucina-1  
IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$   
IL-4: interleucina-4  
IL-6: interleucina-6  
JEV: vírus da encefalite japonesa  
K562: do inglês “*human erythromyeloblastoid leukemia cell line*”  
LPS: lipopolissacarídeo  
L-SIGN: ligande de molécula de adesão intercelular não integrina específica de fígado/linfonodo  
MBL: lectina ligadora de manose  
MIF: fator inibidor de migração  
NK: célula citotóxica natural  
NKT: linfócitos T citotóxica natural  
NS: proteína não estrutural do vírus Dengue  
OMS: organização mundial de saúde  
PBS: tampão fosfato-salino  
prM: proteína precursora de membrana do vírus Dengue  
Proteína C: proteína do capsídeo viral  
Proteína E: proteína de envelope  
Proteína M: proteína de membrana  
R<sup>3</sup>-IGF-1: do inglês “*endothelial growth factor vascular human*”  
RBL: do inglês “*basophilic leukemia-2H3 cells*”  
rhEGF: do inglês “*epidermal growth factor human*”

rhFGF-B: do inglês “*human fibroblast growth factor-B*”  
RNA: ácido ribonucleico  
RT-PCR: reação da transcriptase reversa  
SARS: síndrome respiratória aguda grave  
SC: sistema complemento  
SCD: síndrome do choque por dengue  
SFB: soro fetal bovino  
SNC: sistema nervoso central  
TBEV: vírus da encefalite causada por carrapatos  
TDR: pesquisa e treinamento em doenças infecciosas  
TEER: medida da resistência elétrica transendotelial  
TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento  $\beta$   
Th-1, -2, -17, 22: células T CD4+ auxiliares de perfil -1, -2, -17, -22  
THP-1: linhagem celular monocítica de leucemia aguda  
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina  
TNF: fator de necrose tumoral  
UPR: resposta de proteínas desenovelada  
UTRs: região 5' e 3' não-traduzida  
VCAM-1: proteína de adesão celular vascular-1  
VEGF: fator de crescimento vascular endotelial  
WNV: vírus do Oeste do Nilo  
XCL1/Linfotactina- $\alpha$ : ligante 1 de quimiocina C/fator quimiotático de linfócitos  $\alpha$   
XCL2/Linfotactina- $\beta$ : ligante 2 de quimiocina C/fator quimiotático de linfócitos  $\beta$   
XCR: receptor para família C quimiocina  
XCR1: receptor para a família C quimiocina  
YFV: vírus da Febre Amarela

# Sumário

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| <b>1. Introdução</b>   | <b>1</b>                             |
| 1.1. Quimiocinas e Receptores de Quimiocinas   | 1                                    |
| 1.1.1. Classificação das Quimiocinas e Receptores de Quimiocinas quanto à Estrutura e Funcionalidade   | 2                                    |
| 1.1.1.1. Classificação quanto à Estrutura  | 6                                    |
| 1.1.1.2. Classificação quanto à Funcionalidade   | 8                                    |
| 1.1.2. Participação das Quimiocinas na Fisiologia  | 9                                    |
| 1.1.3. Participação das Quimiocinas na Resposta Imunológica  | 11                                   |
| 1.2. Dengue  | 15                                   |
| 1.2.1. História e Epidemiologia da Dengue no Brasil  | 15                                   |
| 1.2.2. Vírus Dengue (DENV)   | 18                                   |
| 1.2.3. Classificação Clínica da Dengue   | 22                                   |
| 1.2.4. Teorias envolvidas com a Patogênese da Dengue   | 24                                   |
| 1.3. Contribuição das Quimiocinas na Alteração da Permeabilidade Endotelial na Dengue  | 28                                   |
| <b>2. Justificativa</b>  | <b>32</b>                            |
| <b>3. Objetivos</b>  | <b>33</b>                            |
| 3.2. Objetivo Geral  | 33                                   |
| 3.3. Objetivo específicos  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| <b>4. Materiais e métodos</b>  | <b>34</b>                            |
| 4.1. Estudo Populacional   | 34                                   |
| 4.2. Obtenção de Plasma e Soro de Pacientes e Controles Saudáveis  | 34                                   |
| 4.3. Confirmação do Diagnóstico Laboratorial e Classificação Clínica dos Casos Confirmados   | 35                                   |
| 4.4. Quantificação de Citocinas e Quimiocinas Plasmáticas pelas Técnicas de Multiplex em Microarranjo Líquido ou ELISA   | 36                                   |
| 4.5. Manutenção das Culturas de Células Primárias HMVEC-d oriundas do Endotélio Microvascular da Derme ( <i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i> ) | 38                                   |
| 4.6. Padronização do Ensaio de Permeabilidade através da Medida da Resistência Elétrica Transendotelial (TEER)   | 40                                   |
| 4.6. Ensaio de Permeabilidade da Cultura das HMVEC-d na Presença de Soro de Pacientes Pré-tratados ou Não com Bloqueadores das Quimiocinas                     | 43                                   |
| 4.7. Análise Estatística   | 44                                   |
| <b>5. Resultados</b>   | <b>45</b>                            |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.1.Perfis Demográfico, Clínico e Laboratorial de Pacientes e Controles .....   | 45        |
| 5.2.Correlação entre Parâmetros Laboratoriais em Pacientes Infectados pelo DENV.....  | 48        |
| 5.3.Avaliação do Perfil das Citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 e Quimiocinas: CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 e CX3CL1/Fractalcina em Pacientes Infectados pelo DENV e Controles.....       | 50        |
| 5.4.Correlação das Citocinas e Quimiocinas em pacientes infectados pelo DENV..  | 52        |
| 5.5.Correlação entre as Citocinas/Quimiocinas com Parâmetros Laboratoriais em Pacientes Infectados pelo DENV.....   | 54        |
| 5.6.Medida da Resistência Elétrica Transendotelial (TEER) em Monocamada de Células Endoteliais HMVEC-d na Presença de Soro de Pacientes Infectados pelo DENV.....   | 55        |
| 5.7.Medida da Resistência Elétrica Transendotelial (TEER) em Monocamada de Células Endoteliais HMVEC-d na Presença de Soro de Pacientes Infectados pelo DENV pré-tratados com Anticorpos Bloqueadores de Quimiocinas..... | 59        |
| 5.8.Correlação das Medidas do TEER com os Diferentes Perfis de Pacientes dos Grupo 1 e 2.....   | 60        |
| <b>6. Discussão.....</b>  | <b>63</b> |
| 6.1.Análise Comparativa dos Parâmetros Clínicos e Laboratoriais de Pacientes Infectados pelo DENV-4 durante Epidemia de 2013.....   | 63        |
| 6.2.Perfil de Secreção de Citocinas e Quimiocinas na Infecção pelo DENV-4.....  | 66        |
| 6.3.Alteração da Permeabilidade de Células Endoteliais Associada às Quimiocinas.....  | 69        |
| <b>7. Conclusão .....</b>   | <b>74</b> |
| <b>8. Referências Bibliográficas .....</b>  | <b>75</b> |
| <b>Anexos.....</b>  | <b>83</b> |



## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1.1. Receptores de quimiocinas, expressão e funcionalidade.....   | 5  |
| Tabela1.2. Classificação da dengue quanto à gravidade clínica .....  | 23 |
| Tabela 4.1. Especificações do kit de ELISA e diluição das amostras séricas de pacientes e controles.....                           | 37 |
| Tabela 5.1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes e controles envolvidos no estudo.....              | 47 |
| Tabela 5.2. Correlação entre os dados laboratoriais de pacientes infectados pelo DENV.....   | 49 |
| Tabela 5.3. Correlação das citocinas e quimiocinas séricas em pacientes infectados pelo DENV.....                                  | 53 |
| Tabela 5.4. Correlação entre as citocinas/quimiocinas com parametros clínico laboratoriais nos pacientes infectados pelo DENV..... | 55 |
| Tabela 5.5. Características dos pacientes infectados pelo DENV para análise do TEER.....   | 57 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1. Quimiocinas e seus receptores.....   | 4  |
| Figura 1.2. Quimiocinas na fisiologia.....   | 10 |
| Figura 1.3. Interação das Quimiocinas no endotélio e na angiogênese.....   | 12 |
| Figura 1.4. Quimiocinas na homeostasia e inflamação.....   | 13 |
| Figura 1.5. Dados epidemiológicos dos casos de Dengue na época de 2002-2013.....   | 17 |
| Figura 1.6. Vírus da Dengue (DENV).....  | 19 |
| Figura 1.7. Resposta do hospedeiro a infecção pelo DENV na pele.....   | 21 |
| Figura 1.8. Mecanismos Imunopatogenico relacionados ao desfecho clínico da Dengue.....   | 27 |
| Figura 4.1. Padronização do ensaio de permeabilidade.....  | 41 |
| Figura 4.2. Padronização do ensaios permeabilidade.....  | 42 |
| Figura 5.1. Níveis séricos de citocinas e quimiocinas em pacientes infectados pelo DENV.....   | 51 |
| Figura 5.2. Medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) de $2 \times 10^5$ HMVECs cultivadas em insertos de $3 \mu\text{m}$ de porosidade.....                     | 58 |
| Figura 5.3. Medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) em soro de pacientes pré-tratados com os anticorpos neutralizantes das quimiocinas no tempo de 1 hora..... | 60 |
| Figura 5.4. Correlações dos níveis séricos de CCL5/RANTES com os valores do TEER relativo dos pacientes infectados pelo DENV.....  | 62 |

# 1. Introdução

## 1.1. Quimiocinas e Receptores de Quimiocinas

A habilidade do sistema imune de responder à presença de patógenos e aos danos teciduais é uma tentativa de assegurar a homeostasia do organismo. Para isso, o sistema imune conta com a participação de mediadores, como as quimiocinas, que se caracterizam primordialmente por suas propriedades quimiotáticas (revisado por (1)). As primeiras observações recordadas do fenômeno de quimiotaxia em populações celulares foram realizadas por Leber em 1888, que verificou a migração de leucócitos para uma região lesionada da córnea de coelhos. Tubos capilares contendo substâncias nocivas, como bactérias, eram inseridos dentro da câmara anterior do olho do coelho. Subsequentemente, os tubos eram retirados e a identificação e quantificação de leucócitos eram realizadas. Esta observação originou a hipótese de que substâncias difusíveis geradas em locais lesionados estabelecem gradientes que resultam na migração leucocitária para o local (revisado por (2)). O conceito de que gradientes constituídos pela difusão de substâncias químicas atraem células eucarióticas foi marcado nos anos de 1900 quando o 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), um dos primeiros agentes quimiotáticos, foi relatado (3).

Deuel e colaboradores em 1981 descreveram o primeiro membro da família de quimiocinas, o Fator Plaquetário 4 (atualmente denominado CXCL4) (4). No final dos anos 80, Yoshimura e colaboradores identificaram e caracterizaram uma proteína básica, com peso de aproximadamente 10kDa, que era obtida em culturas de monócitos estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) e a denominaram de MDNCF (Monocyte-Derived Neutrophil Chemotactic Fator), atualmente denominado CXCL8 ou IL-8. Foi verificado que esta proteína atuava de maneira seletiva na migração de neutrófilos, sendo, portanto, CXCL8/IL-8 a primeira quimiocina a ser identificada e caracterizada estrutural- e funcionalmente (5). Iniciou-se uma era de estudos à procura de novas quimiocinas e na elucidação de seus papéis em processos fisiológicos, patológicos e imunológicos e da especificidade de diferentes tipos celulares.

O termo “Quimiocinas”, que significa citocinas quimiotáticas, foi definido em 1992 no 8º Encontro Internacional de Imunologia realizado em Budapeste (6). Essas

moléculas medeiam suas funções através da interação com receptores específicos presentes na superfície de células-alvo, como leucócitos e células não-hematopoéticas. No ano de 2000, uma nova nomenclatura foi introduzida para classificação das quimiocinas, no qual cada ligante e receptor foram identificados de acordo com sua subfamília e dado um determinado número de identificação para estes (veremos com mais detalhe no tópico 1.1.1). Por exemplo, CCL2 refere-se à quimiocina da subfamília CC número 2. Esta quimiocina era previamente denominada MCP-1 ou “monocyte chemoattractant protein 1”. Similarmente, seu receptor é referido com a letra R e identificado por um número, por exemplo, no caso de CCL2 seu receptor denomina-se CCR2 (revisado por (7)).

Embora as quimiocinas tenham sido inicialmente definidas como importantes mediadores da inflamação aguda, uma vez que controlam o padrão migratório e o posicionamento de todas as células imunes em situações patológicas, suas funções vão além destas. Destacamos rapidamente algumas delas procurando enfatizar a importância desse sistema na busca do controle da homeostasia: (i) geração da resposta imune celular adaptativa primária e secundária e da resposta imune humoral, (ii) *priming* de linfócitos T naives, (iii) diferenciação de linfócitos T efetores e de memória, (iv) funcionalidade de linfócitos T reguladores, (v) controle do desenvolvimento e da diferenciação de precursores de células imunes nos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) (revisado por (8)).

Neste capítulo, abordaremos o sistema quimiocinas e seus receptores quanto aos aspectos importantes para o entendimento de nosso trabalho.

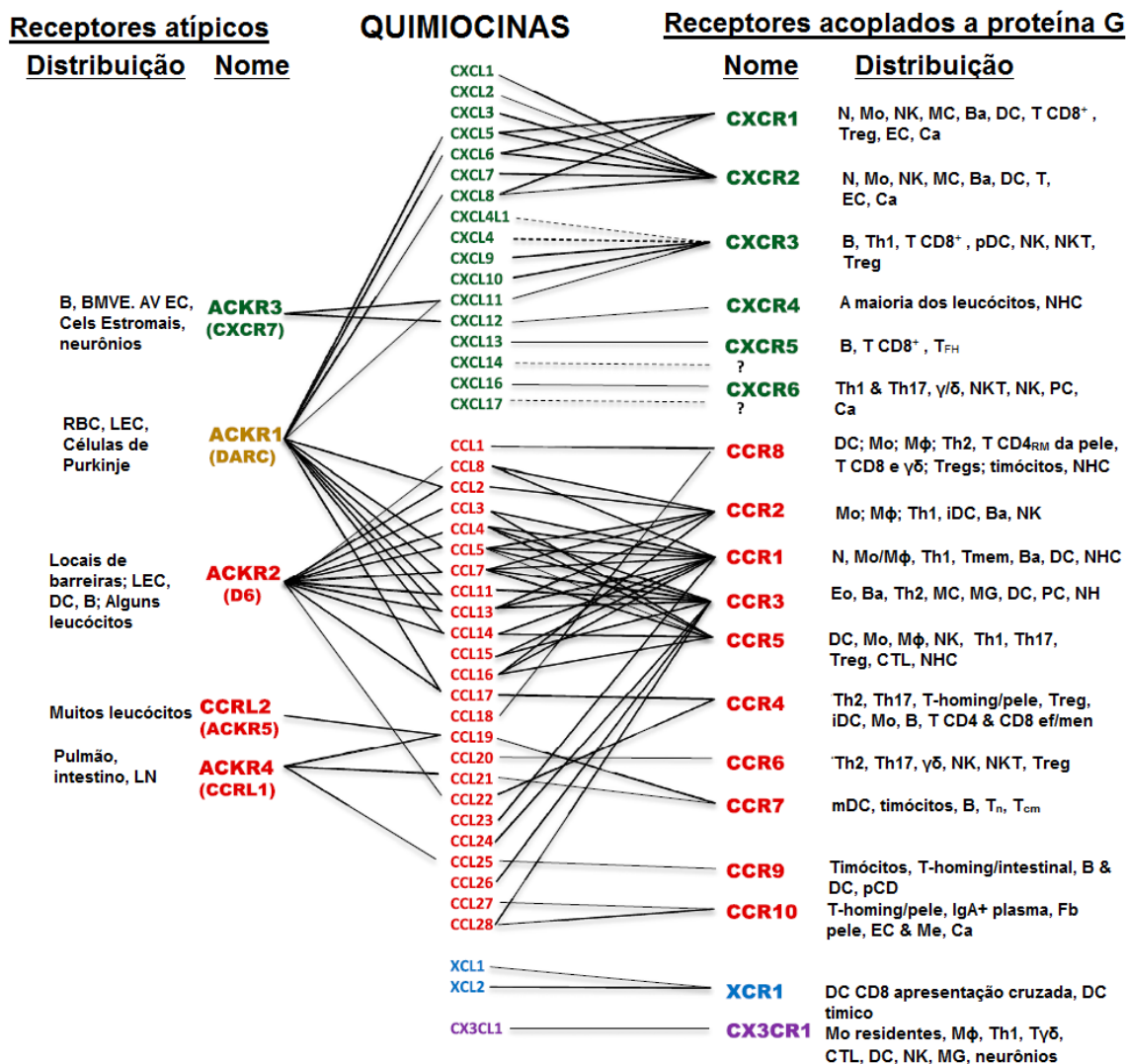
### **1.1.1 Classificação das Quimiocinas e Receptores de Quimiocinas quanto à Estrutura e Funcionalidade**

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular, entre 7-14 kDa, e constituem a maior família de citocinas. Atualmente temos descritas 50 tipos diferentes de quimiocinas que podem ser inicialmente agrupadas de acordo com sua organização estrutural em 4 subfamílias: C, CC, CXC e CX3C, de acordo com as posições do resíduo de cisteína (C) e dos resíduos de aminoácido X presente em sua estrutura. Uma segunda forma de classificação foi agrupá-las em 3 subfamílias de acordo com a funcionalidade: homeostáticas, pró-inflamatórias e de função mista (revisado por (9)).

As quimiocinas medeiam suas funções através da interação com receptores específicos diferencialmente expressos em todos os leucócitos e que podem ser divididos em 2 grupos: receptores transmembranares acoplados à proteína G e receptores atípicos, que parecem mediar um gradiente de quimiocinas e assim controlar a inflamação de maneira independente à proteína G. Até o momento são descritos 20 receptores de quimiocinas que sinalizam e 5 que não sinalizam (Tabela 1.1).

Ainda, os receptores de quimiocinas acoplados à proteína G estão agrupados em 4 subfamílias de acordo com a família de quimiocinas nos quais se ligam: CCR, CXCR, XCR e CX3CR. Esses receptores apresentam uma sequência de aminoácidos DRYLAIV, localizada no final do domínio 3 transmembranar, crucial para o acoplamento da proteína G. Esta característica é um determinante estrutural chave para distingui-los dos receptores atípicos. Os receptores atípicos são homólogos aos receptores acoplados à proteína G, porém, como dito anteriormente, independem dessa via para atuarem. Está atualmente dividido de acordo com nova nomenclatura estabelecida pelo Comitê da União Internacional de Farmacologia e pelo Comitê de Nomenclatura da Organização do Genoma Humano pelas letras ACKR (*Atypical chemokine receptors*), seguida da ordem de descoberta: ACKR1/Duffy antigen receptor, ACKR2/D6, ACKR3/CXCR7, ACKR4/CCRL1 e ACKR5/CCRL2 (revisado por (9)).

Interessante ressaltar que a interação Quimiocina/Receptor de Quimiocina é bastante “promíscua”, ou seja, diferentes quimiocinas podem se ligar a um único receptor, enquanto diferentes receptores se ligam a uma quimiocina (Figura 1.1) (revisado por (9)).



**Figura 1.1. Quimiocinas e seus receptores.** Abreviaturas: Ba, basófilos; Ca, câncer; CD4<sub>RM</sub>, células T CD4 de memória residente; CE, células endoteliais; Eo, eosinófilos; Fb, fibroblastos; iDC, célula dendrítica imatura; MC, mastócitos; Me, melanócitos; MG, célula da microglia; Mo, monócitos; M $\phi$ , macrófagos; N, neutrófilos; NHC, células não-hematopoiéticas; PC, plasmócitos; pDC, células dendríticas plasmocitoides; T<sub>CM</sub>, células T de memória central; Th1 ou 2, células T helper do tipo 1 ou 2; T<sub>n</sub>, células T naive; ef/mem, células T efetoras e de memória. Adaptado de Bachelierie *et al.*, 2014.

**Tabela 1.1. Receptores de Quimiocinas, expressão e funcionalidade**

| Receptores                               | Expressão em células imune   | Função imune chave  |
|--|--|---|
| <b>Receptores acoplados à proteína G</b> |  |   |
| <b>CXCR1</b>                             | Neutrófilo> monócito, NK, mastócitos, basófilo, T CD8 <sup>+</sup> <sub>EFE</sub>                | Tráfego de neutrófilos  |
| <b>CXCR2</b>                             | Neutrófilo> monócito, NK, mastócitos, basófilo, T CD8 <sup>+</sup>                               | Linfopoiese de células B, egresso de neutrófilos para a medula óssea, tráfego de neutrófilos                          |
| <b>CXCR3</b>                             | Th1, CD8 <sup>+</sup> T <sub>CM</sub> and T <sub>EM</sub> , NK, NKT, pDC, B cell, Treg, Tfh      | Polarização para o perfil Th1   |
| <b>CXCR4</b>                             | Maioria dos leucócitos   | Hematopoiese, organogênese, <i>homing</i> para medula óssea   |
| <b>CXCR5</b>                             | B cel, Tfh, Tfr, T CD8 <sub>EM</sub>   | Tráfego de células T e B para o tecido linfóide   |
| <b>CXCR6</b>                             | Th1, Th17, $\gamma\delta$ T, ILC, NKT, NK, plasmócitos I   | Função ILC, imunidade adaptativa  |
| <b>CCR1</b>                              | Monócito, macrófago, neutrófilo, Th1, basófilo, DC   | Imunidade inata e adaptativa  |
| <b>CCR2</b>                              | Monócito, macrófago, Th1, iDC, basófilo, NK  | Tráfego de monócitos, resposta adaptativa do tipo Th1   |
| <b>CCR3</b>                              | Eosinófilo> basófilo, mastócito  | Resposta adaptativa do tipo Th2, distribuição e tráfego de eosinófilos  |
| <b>CCR4</b>                              | Th2, Treg > Th17, T CD8 <sup>+</sup> , monócito, cél. B, iDC                                     | Homing de células T para a pele e pulmão, resposta adaptativa do tipo Th2   |
| <b>CCR5</b>                              | Monócito, macrófago, Th1, NK, Treg, T CD8 <sup>+</sup> , DC, neutrófilo                          | Resposta adaptativa do tipo Th1   |
| <b>CCR6</b>                              | Th17> iDC, $\gamma\delta$ T, NKT, NK, Treg, Tfh  | Tráfego iDC, desenvolvimento GALT, resposta adaptativa do tipo Th17   |
| <b>CCR7</b>                              | T naive, T <sub>CM</sub> , T <sub>RCM</sub> , mDC, cel B   | Tráfego de mDC, célula B e T no tecido linfóide para a zona de célula T, egresso de DC e células T para o tecido      |
| <b>CCR8</b>                              | Th2, Treg, T <sub>RM</sub> , $\gamma\delta$ T, monócito, macrófago                               | Vigilância imunológica na pele, resposta adaptativa do tipo Th2, timopoiese   |
| <b>CCR9</b>                              | T, timócitos, cél.B, DC, pDC   | Homing de células T para o intestino, desenvolvimento e função GALT, timopoiese                                       |
| <b>CCR10</b>                             | T, plasmócitos produtores de IgA   | Resposta humoral para regiões de mucosa, imunovigilância na pele  |
| <b>XCR1</b>                              | DC, T CD8  | Apresentação cruzada de antígenos por DC CD8 <sup>+</sup>   |
| <b>CX3CR1</b>                            | Monócitos residentes, macrófagos, micróglia, Th1, T CD8 <sub>EM</sub> , NK, $\gamma\delta$ T, DC | Patrulhamento de monócitos na imunidade inata, migração de células da micróglia e NK, resposta adaptativa do tipo Th1 |

| Receptores atípicos       |                           |  |
|---------------------------|---------------------------|--|
| <b>ACKR1(DARC; Duffy)</b> | RBC, LEC                  | Transcitose de quimiocinas, quimiocinas “scavenging” |
| <b>ACKR2 (D6)</b>         | LEC, DC, cél. B           | Quimiocinas “scavenging”                             |
| <b>ACKR3 (CXCR7)</b>      | Células estromais, cél. B | Moldar gradientes de quimiocinas para CXCR3          |
| <b>ACKR4 (CCRL1; CKR)</b> | Epitélio Tímico           | Quimiocinas “scavenging”                             |

Abreviações: DC, células dendríticas; GALT, tecido linfóide associado ao intestino; iDC, células dendríticas imaturas; ILC, células linfóides inatas; LEC, endotélio linfático; NK, células natural killer; NKT, células T natural killer; RBC, células vermelhas; T<sub>CM</sub>, células T de memória central; T<sub>EF</sub>, células T efetoras; T<sub>EM</sub>, células T de memória efetora; Tfh, células T helper foliculares; Tfr, células T regulatórias foliculares; Th, T helper; T<sub>RCM</sub>, células T de memória recirculantes; Treg, células T regulatórias; T<sub>RM</sub>, células T residentes de memória; > indica maior expressão do receptor. Adaptado de Griffith *et al.*, 2014.

### 1.1.1.1. Classificação quanto à Estrutura

#### 1.1.1.1.1. Família CC

Maior grupo entre as 4 famílias. Possuem dois resíduos de cisteína adjacentes em suas moléculas. Algumas quimiocinas deste grupo, como CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin, CCL16/LEC e CCL21/SLC possuem envolvimento na angiogênese (revisado por (10)). Dentre os principais receptores desta família podemos mencionar CCR1, amplamente expresso em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas. Ligam-se ao CCR1 as quimiocinas CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CCL6/MRP-1, CCL9/MIP-1, CCL15/MIP-5 e CCL23/MIP-3, tendo um importante papel na defesa contra doenças infecciosas (revisado por (9)). CCR2, expresso em células dendríticas imaturas, basófilos, células NK e linfócitos T cujos ligantes são CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL11/Eotaxin, CCL13/MIP-3, CCL16/LEC, CCL24/Eotaxin-2 e CCL26/Eotaxin-3, que influenciam no tráfego de monócitos e na resposta adaptativa do tipo Th1 (revisado por (11)). O CCR5, expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T, está relacionado a resposta imune adaptativa do tipo Th1, tendo como ligantes CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCL13/MCP-4 e CCL16/LEC (revisado por (8)).



#### **1.1.1.1.2. Família CXC**

A segunda maior família é a CXC que possui um único resíduo de aminoácido interposto entre as duas primeiras cisteínas. São divididos em 2 subfamílias de acordo com a presença ou não da sequência de aminoácidos ácido glutâmico-leucina-arginina (ELR) na região N-terminal de sua estrutura. As CXC ELR+, como a CXCL8/IL-8, atraem leucócitos polimorfonucleares para sítios específicos em processos agudos de inflamação. Mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e LPS induzem a produção destas quimiocinas, tendo papel importante nas primeiras fases de cicatrização e atuando na angiogênese. As quimiocinas relacionadas à angiogênese são CXCL1/GRO- $\alpha$ , CXCL2/MIP-2 $\alpha$ , CXCL3/MIP-2 $\beta$ , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2 e CXCL8/IL-8 que atuam via receptores CXCR1 e CXCR2. O grupo ELR- atua de forma antagônica ao grupo ELR+, tendo papel angiostático. Dentre as quimiocinas angiostáticas, podemos mencionar CXCL4/PF4, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 e CXCL11/I-TAC, os três últimos ligantes de CXCR3. Essas quimiocinas também possuem capacidade de quimioatração de linfócitos T para sítios específicos (revisado por (10, 12)).

#### **1.1.1.1.3. Família C**

A família C possui um único resíduo de cisteína em sua estrutura, tendo como representantes a XCL1/Linfotactina- $\alpha$  e a XCL2/Linfotactina- $\beta$ , secretadas por células T, NK, NKT, particularmente durante o perfil de resposta Th1. Essa família tem como único receptor XCR1 que é expresso exclusivamente em subpopulações de células dendríticas. A expressão elevada desta quimiocina já mostrou ter envolvimento em diversos processos infecciosos, autotolerância tímica e doenças autoimunes. Em modelo experimental de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos, foi demonstrado aumento da expressão de XCL1/Linfotactina- $\alpha$  em linfócitos T CD8 ativados presentes no pulmão (13, 14).

#### **1.1.1.1.4. A Família CX3C**

Por último, a família CX3C possui em sua estrutura três resíduos de aminoácidos entre os dois resíduos de cisteínas. Tem como único membro a CX3CL1/Fractalcina, uma quimiocina multimodular atípica que existe tanto na forma membrana quanto solúvel, é expressa em células endoteliais e células da musculatura lisa em condições inflamatórias. Esta quimiocina possui efeito anti-apoptótico e proliferativo sobre células da musculatura lisa e induz a angiogênese (revisado por (15)). Seu receptor CX3CR1 é um marcador bem estabelecido de

monócitos anti-inflamatórios, e, portanto, está menos expresso em monócitos pró-inflamatórios. O CX3CR1 desempenha papel importante na promoção da adesão mediada pelas integrinas no interior do vaso, auxiliando no patrulhamento de monócitos de perfil anti-inflamatório na região (16).

### **1.1.1.2. Classificação quanto à Funcionalidade**

Com relação à classificação das quimiocinas quanto a sua funcionalidade podemos dividir em 3 grupos: homeostáticas, expressas constitutivamente em microambientes linfóides e não-linfóides; pró-inflamatórias, expressas após ativação por leucócitos da circulação e outros tipos celulares e por fim, as mistas (revisado por (17)).

#### **1.1.1.2.1. Quimiocinas homeostáticas**

Quimiocinas homeostáticas mantém o nível basal e contínuo de migração celular, a fim de manter o bom funcionamento do sistema imune em diversos processos como maturação e tráfego de leucócitos, diferenciação de linfócitos e células dendríticas, reparo tecidual e angiogênese em processos não inflamatórios (revisado por (17)). Também promovem “imunovigilância” em tecidos considerados “áreas de riscos”, como a pele, mucosa intestinal e pulmões (revisado por (7)). As CCL19/MIP-3 $\beta$  e CCL21/SLC, produzidas no linfonodos, são as principais indutoras de migração de células dendríticas imaturas que expressam CCR7 da região dermal para o linfonodo (revisado por (18)). A CXCL1/GRO- $\alpha$  medeia o processo de rolamento e adesão dos leucócitos nas células endoteliais, através de integrinas presentes nos leucócitos (19). A CXCL12/SDF-1 e seus receptores CXCR4 e CXCR7, possuem importante papel no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Já foi visto *in vitro* que CXCL12/SDF-1 pode atrair e aumentar a migração de células progenitoras neurais dentro de um universo de tipos celulares do SNC (revisado por (20)).

As quimiocinas homeostáticas também participam da regulação de linfócitos T. Por exemplo, células T regulatórias, que expressam fortemente CCR7, migram para áreas de células T nos linfonodos e baço via CCL19/MIP-3 $\beta$  e CCL21/SLC (21, 22). O processo de diferenciação tímica depende da interação com células epiteliais que expressam CCL21/SLC, CCL25/TECK e CXCL12/SDF-1 com os receptores CCR7, CCR9 e CXCR4 expresso nas células T progenitoras (revisado por (8)).

### **1.1.1.2.2. Quimiocinas Pró-inflamatórias**

As quimiocinas pró-inflamatórias são secretadas em resposta a qualquer estímulo que altere a homeostase celular, que podem ser tanto em razão da presença de um organismo patogênico, quanto em resposta as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  (revisado por (11)). As citocinas pró-inflamatórias podem estimular células imunes da vizinhança ou até mesmo células epiteliais, levando à produção de uma série de quimiocinas pró-inflamatórias, como CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CXCL1/GRO- $\alpha$ , CXCL2/MIP-2 $\alpha$ , CXCL3/MIP-2 $\beta$  e CXCL8/IL-8 (23). Uma observação importante neste grupo é que a produção das quimiocinas e/ou a expressão de seus receptores estão relacionadas a perfis celulares diferentes (mais detalhes serão vistos no item 1.1.3).

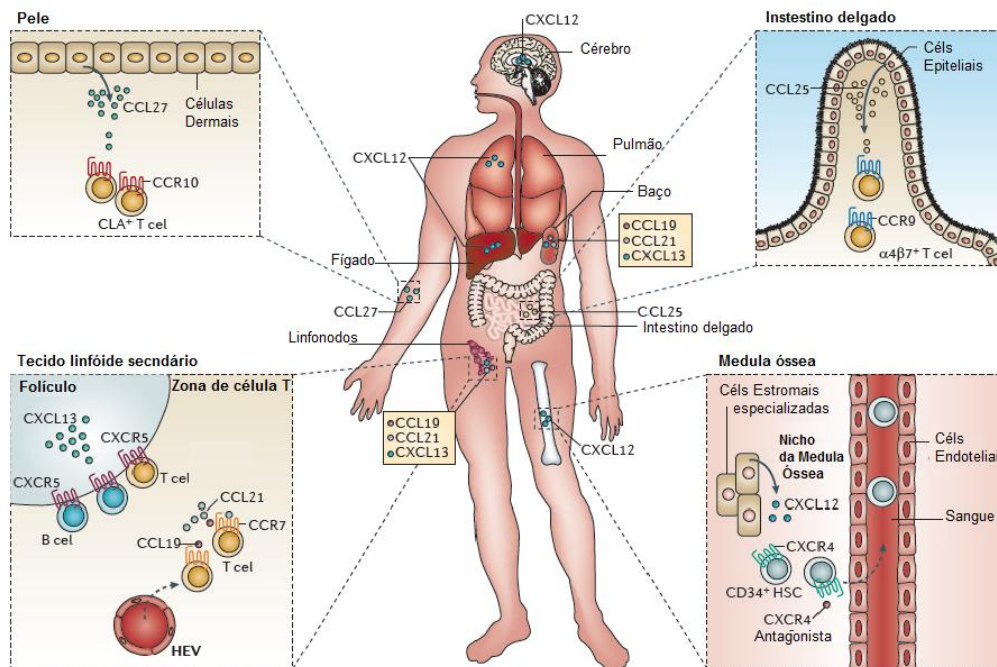
### **1.1.1.2.3. Quimiocinas mistas**

As Quimiocinas mistas possuem funcionalidades tanto de caráter homeostática quanto inflamatórias (revisado por (17)). Elas atuam no tráfego leucocitário basal, desenvolvimento do sistema imunológico e/ou tráfego emergencial de leucócitos para sítios específicos de lesão. Neste caso temos a CCL27/CTAK que é expressa de forma constitutiva na pele e também medeia o tráfego de células T durante inflamações cutâneas (24).

## **1.1.2. Participação das Quimiocinas na Fisiologia**

Apesar das quimiocinas terem sido inicialmente definidas como moléculas de defesa do hospedeiro contra injúrias e patógenos, seu papel no desenvolvimento e fisiologia do organismo é fundamental (revisado por (25)). No desenvolvimento de embriões de vertebrados, a sinalização através das quimiocinas entre o trofoblasto e o endométrio é importante na implantação do embrião. CXCR4 e seu ligante CXCL12/SDF-1 apresentam papel fundamental na migração de células germinativas durante o desenvolvimento embrionário em *zebrafish* (26). Os CXCR4 e CXCR7 também receptores da CXCL12/SDF-1 estão relacionados com o desenvolvimento de células hematopoiéticas, neurogênese e cardiogênese, organização tecidual, *homing* de células-tronco e comunicação intercelular entre células endodermis e mesodérmicas (revisado por (12)). Com relação à gênese dos órgãos linfáticos secundários, CCL19/MIP-3 $\beta$  e CCL21/SLC ligantes de CCR7 e CXCL21/SLC ligante

de CXCR5, são algumas das quimiocinas de extrema importância nesse processo. Ressaltamos que CCR7 auxilia no recrutamento de células T naive para os linfonodos, enquanto que CXCR5 realiza a mesma função, mas para as células B. CCL25/TECK recruta células T progenitoras que expressam CCR9 para o timo e células T que coexpressam CCR9 e a integrina  $\alpha 4\beta 7$  para a região intestinal. CCL27/CTAK induz a migração de subpopulações de células T que expressam CCR10 para a pele e CCL28/MEC recruta células que coexpressam CCR10 e IgA para as glândulas mamárias (revisado por (25)). A figura 1.2 demonstra esquematicamente a participação das quimiocinas no desenvolvimento de órgãos e na migração de diversos tipos celulares para tecidos específicos.



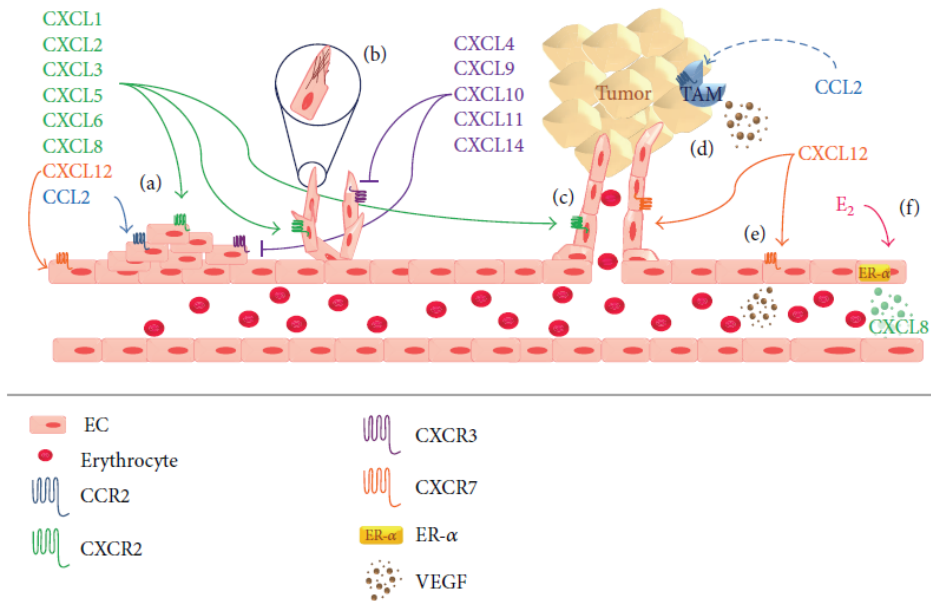
**Figura 1.2. Quimiocinas na fisiologia.** Em condições fisiológicas, as quimiocinas homeostáticas regulam o tráfego celular, orientando as células para locais específicos. Na pele, CCL27 recruta células CCR10+ CLA+; No intestino delgado, CCL25 recruta células T CCR9+ que expressam a integrina  $\alpha 4\beta 7$ ; Nos linfonodos, CCL21 e CCL19 recrutam células T CCR7+ e CXCL13 recruta células T e B CXCR5+; Na medula óssea, CXCL12 recruta células-tronco hematopoiéticas (HSCs) CXCR4+ criando um nicho para estas células. Antagonização de CXCR4 induz a migração das HSCs para a circulação. Adaptado de Zlotnik *et al.*, 2011

### 1.1.3. Participação das Quimiocinas na Resposta Imunológica

A influência das quimiocinas na resposta imunológica e em processos inflamatórios de desordens neurológicas, câncer e em diferentes tipos de infecções virais tem sido bastante descrita na literatura científica e será discutida a seguir (revisado por (27)).

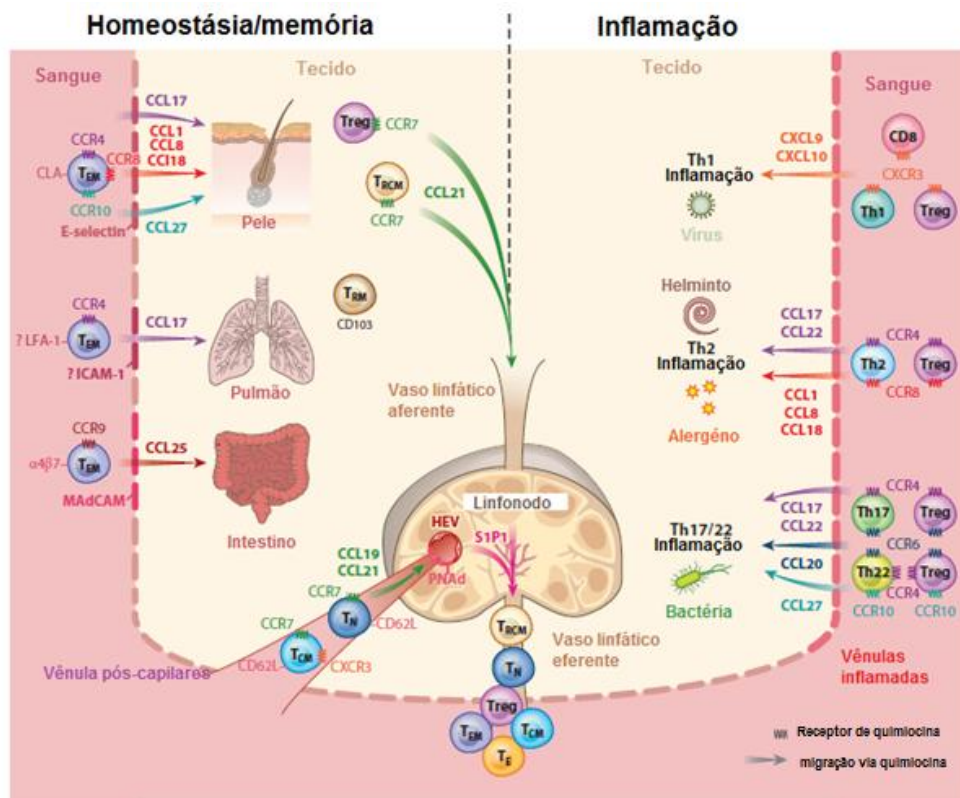
Em modelos de inflamação, CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin e CCL7/MCP-3 ativam eosinófilos promovendo liberação de grânulos, como histamina e leucotrienos, potencializando reações alérgicas ou asmáticas (revisado por (28)). Em pacientes com quadro de artrite reumatóide já foram encontrados níveis elevados das CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8 e CXCL10/IP10 no líquido sinovial das articulações. Nestas regiões, encontravam-se grandes infiltrados inflamatórios compostos por leucócitos e células sinoviais que expressavam os CCR2, CCR5, CXCR2 e CXCR3, sugerindo forte caráter migratório dessas células, provavelmente em decorrência da produção das quimiocinas (revisado por (27)). Camundongos geneticamente deficientes de CX3CL1/Fractalcina ou de CX3CR1, comparado aos animais selvagens, apresentam redução significativa no recrutamento de macrófagos para a parede do vaso e diminuição da placa de ateroma na região, sugerindo a participação da CX3CL1/Fractalcina na patogênese da aterosclerose (29).

Dentre as diversas doenças nas quais as quimiocinas possuem envolvimento, as mais descritas são em relação à gênese do câncer, principalmente pela forte indução de angiogênese em decorrência da necessidade do tumor em obter nutrientes e oxigênio para o seu crescimento (30). Quimiocinas angiogênicas produzidas por células cancerígenas como CXCL1/GRO- $\alpha$ , CXCL2/MIP-2 $\alpha$ , CXCL3/MIP-2 $\beta$ , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2 e CXCL8/IL-8 medeiam esse processo mediante interação com CXCR2 e também com outros fatores angiogênicos, como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Figura 1.3) (revisado por (31)).



**Figura 1.3. Interação das quimiocinas no endotélio e na angiogênese.** Quimiocinas angiogênicas ELR+ atuam através de receptores CXCR2 para promover (a) proliferação das células endoteliais (EC), (b) formação de fibras de contração e (c) de novos vasos. Em contraste, quimiocinas angiostáticas ELR- atuam através CXCR3 para inibir a angiogênese. CCL2 também promove a angiogênese via CCR2, (a) estimulando a proliferação de EC e (d) atuando de forma indireta aumentando a infiltração de macrófagos associados a tumores (TAMs), que secretam fatores angiogênicos como VEGF. CXCL12 atua através de CXCR7 para promover (a) proliferação de EC e (e) produção de VEGF pelas EC. Alguns relatos mostram que (f) estrogênio (E<sub>2</sub>) estimula a secreção de CXCL8/IL-8 pelas EC. Adaptado de Palacios-Arreola *et al.*, 2014.

Durante a resposta imune, CCR7 tem a sua expressão diminuída em células T ativadas, assim como a produção de seu ligante CCL21/SLC. Essa mudança de perfil facilita a saída dessas subpopulações T efetoras dos tecidos linfóides, guiada por outras quimiocinas, para tecidos periféricos infectados e/ou inflamados. Após a ativação, células T CD8 efetoras aumentam a expressão de CXCR1, CXCR3, CXCR6, CCR1, CCR5, CCR6 e CX3CR1, que variam conforme o estado de diferenciação da célula. A regulação desses receptores nas células são peças chaves para a migração direcionada a sítios inflamatórios. Com relação às células T CD4, a expressão de receptores de quimiocinas varia de acordo com o seu estágio de polarização. Células T CD4 de perfil Th1 expressam CCR5, CXCR3 e CXCR6, enquanto as células T CD4 de perfil Th2 expressam CCR4, CCR8 e CX3CR1. Outros perfis são característicos de células Th17 que expressam CCR6 e CCR4 e as células Th22, que expressam CCR4, CCR6 e CCR10. Assim, esse perfil diferencial influencia a migração para sítios inflamatórios específicos, assim como para o tráfego homeostático (Figura 1.4) (revisado por (8)).



**Figura 1.4. Quimiocinas na homeostasia e inflamação.** Células T naive ( $T_N$ ) expressam CCR7 e CD62L o mantém um perfil de recirculação entre sangue e órgãos linfoides secundários (SLOs). Células T de memória central ( $T_{CM}$ ) possuem um padrão semelhante ao tráfego de células T naive, expressando fortemente CCR7 e CD62L, o que permite o acesso as CCL19, CCL21 e adressinas do nóculo periférico (Pnad) nas vênulas endoteliais altas (HEVs). Células T de memória efetoras ( $T_{EM}$ ) são encontradas no sangue e por ausência de expressão de CCR7, mas com alta expressão de receptores de *homing* tecidual e moléculas de adesão, o que permite a migração de células  $T_{EM}$  específicas para tecidos periféricos específicos, com base em uma única quimiocina e expressão de molécula de adesão do determinado tecido. Células T de memória residentes ( $T_{RM}$ ) expressam CD103 e persistem por longos períodos no interior de tecidos, ao passo que células T de memória ( $T_{RCM}$ ) recirculam nos tecidos, mas retornam para o SLO por uma via dependente de CCR7. As células regulatórias (Tregs) parecem ter distribuição semelhante às células T efetoras e de memória e formam uma população de células que recirculam, mas residentes nos tecidos (à direita). Quando no recrutamento de células T efetoras para tecidos inflamados, células T CD4 naive diferenciam-se em Th1, Th2 e Th17/22 mudando a expressão de receptores de quimiocinas permitindo serem recrutadas para tecidos específicas. Dentro do tecido, as células T aumentam a produção de citocinas T helper específicas que aumentam a produção de quimiocinas específicas num mecanismo de retroalimentação. As células Tregs também diferenciam-se em subgrupos heterogêneos de acordo com a expressão de receptores de quimiocinas. Esta diferenciação de expressão permite o recrutamento específico, como mencionado anteriormente, modulando a resposta inflamatória e o mecanismo de retroalimentação mencionado. Adaptado de Griffith *et al.*, 2014.

Particularmente nas infecções virais, um dos primeiros trabalhos datado de 1995 introduziu o efeito das quimiocinas na infecção pelo HIV-1. Neste estudo foi demonstrado que CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP-1 $\beta$  secretadas por linfócitos T CD8 eram capazes de reduzir a replicação de certas cepas de HIV-1 em ensaios *in vitro* (32). Posteriormente em 1996, foram descobertos os mecanismos de entrada do HIV-1 em linfócitos T CD4 via CCR5 e CXCR4 (33, 34).

Além de servirem como receptores virais, na infecção pelo HIV as quimiocinas atuam na modulação da resposta imune celular de pacientes. Neste contexto, mais recentemente foi demonstrado níveis aumentados de CXCL10/IP-10 em indivíduos infectados pelo HIV não-tratados e níveis ainda maiores desta quimiocina naqueles pacientes em terapia antirretroviral (ART). O tratamento *in vitro* das células mononucleares de pacientes-HIV+ sob ART com anticorpos CXCL10/IP-10 diminuiu a capacidade dessas células produzirem IFN- $\gamma$  frente a antígenos relacionados ou não ao HIV, enquanto que a inibição do CXCL10/IP-10 com anticorpos bloqueadores, restaurou a resposta celular *in vitro* desses mesmos pacientes (35).

Desta forma, nas infecções virais, quimiocinas/receptores de quimiocinas atuam tanto como receptores de reconhecimento viral, quanto como imunomoduladores de uma resposta imune antiviral. Destacamos a participação das quimiocinas/receptores nos processos de homing, recirculação e migração de células pelo endotélio vascular para diferentes tecidos. Considerando que o endotélio é alvo do vírus dengue, a interação vírus-endotélio-quimiocinas poderá ser um dos mecanismos de extrema importância no entendimento da imunopatogênese da dengue.



## 1.2. Dengue

### 1.2.1. História e Epidemiologia da Dengue no Brasil.

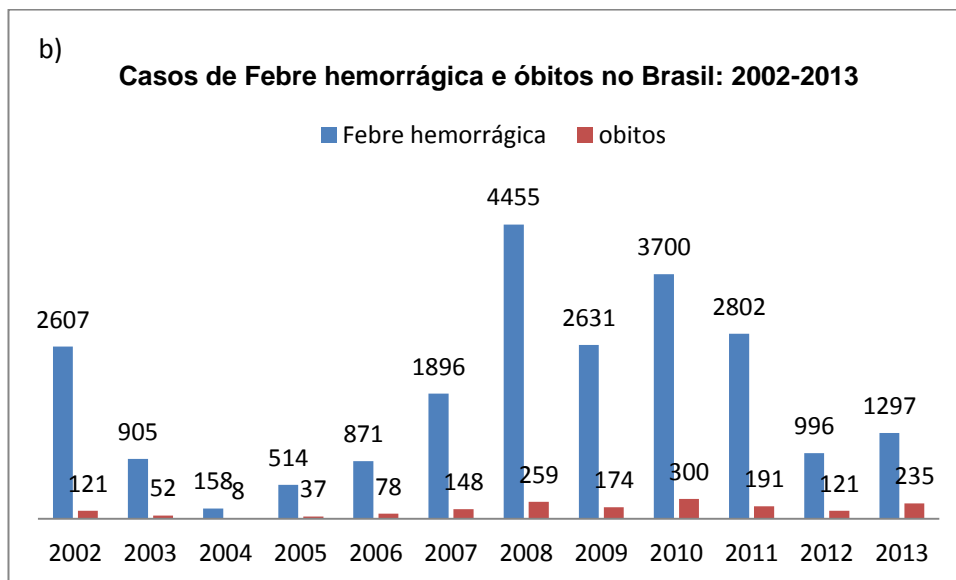
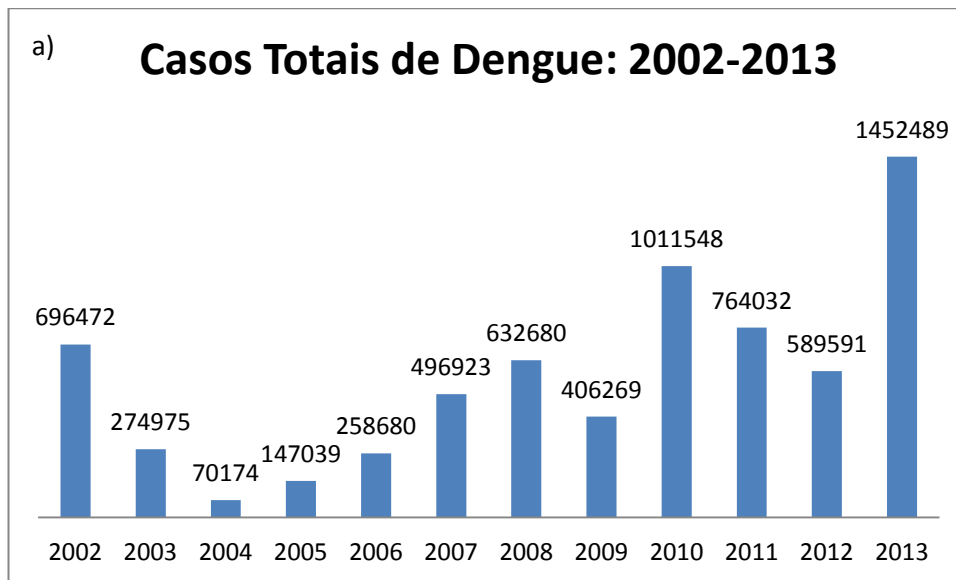
Os primeiros indícios sobre a dengue remetem ao período de 992 d.C. (depois de Cristo), aonde sintomas compatíveis com a dengue foram descritos em uma enciclopédia médica chinesa originalmente publicados na dinastia Chin (265-420 d.C.). As descrições mencionavam uma doença designada “veneno da água” em referência aos insetos voadores associados à água (revisado por (36)). A história evolutiva do vírus dengue (DENV) é bastante recente e existem algumas evidências de que o DENV tenha sido originalmente um vírus que acometia primatas não-humanos. Tem sido discutido que uma transmissão cruzada para a espécie humana tenha ocorrido de forma independente para os 4 sorotipos nos últimos 100 anos, em que a transmissão saiu da floresta para o ambiente peridomiciliar em decorrência da derrubada das matas e dos assentamentos de pessoas próximos a essas regiões (revisado por (37)).

Com relação ao vetor primário da doença, o *Aedes aegypti*, acredita-se que sua origem veio a partir da África ou Ásia, junto com o próprio DENV, tendo por volta de 1800 começado a sua disseminação de forma gradativa por todas as cidades costeiras do mundo. Isso, em decorrência do comércio marítimo daquela época, o que permitiu a introdução do vírus e do mosquito para diversos destinos costeiros ao redor do planeta, sendo agravado por outros eventos como a Segunda Guerra Mundial. A origem etmológica do termo “dengue” percorreu diversos países tendo diversas designações para a doença. Durante a epidemia de Zanzibar, em 1822, a doença passou a ser denominada pelos moradores de “ki-dinga pepo”, que em Swahili, língua nativa daquela região, significa “Convulsão de câibras repentinas causadas por um espírito do mal”. Posteriormente, ao chegar ao território de Cuba em 1829, a doença passou a ser chamada de “Dunga” e posteriormente de Dengue, que foi adotado como termo universal da enfermidade (revisado por (38)).

A primeira epidemia de dengue no Brasil foi descrita no ano de 1846, na cidade do Rio de Janeiro (39). As campanhas de erradicação do vetor *Ae. Aegypti* lançadas posteriormente por Emílio Ribas e Oswaldo Cruz, em 1903 e 1904 respectivamente, contra a febre amarela resultaram na eliminação das duas doenças, que possuíam o mesmo vetor (revisado por (40)). Entretanto, a falta de investimento nos programas de erradicação do vetor contra o combate a febre amarela em áreas urbanas permitiu a reinfestação do vetor com a predominância de apenas um sorotipo

(revisado por (41)). Posteriormente outros sorotipos do DENV acabaram sendo introduzidos no Brasil (42, 43).

Atualmente a dengue continua sendo uma das doenças que mais se alastram em nossa população (figura 1.1). Em 2002, a epidemia de dengue atingiu um total de 696.472 casos sendo 355.587 dentro do Estado do Rio de Janeiro, com prevalência do sorotipo 3 do DENV. Neste mesmo ano, foram confirmados 2.607 casos de dengue hemorrágica e 121 óbitos no Brasil, atingindo dados que não tinham sido excedido desde a introdução do vírus no Brasil. Em 2008, a epidemia de dengue atingiu números alarmantes de casos graves tendo 632.680 casos confirmados de dengue no Brasil, 2.035 casos de dengue hemorrágica e 123 óbitos no sudeste sendo 1.859 dentro do Estado do Rio de Janeiro com 106 óbitos, com prevalência dos sorotipos 2 e 3 do DENV. No ano de 2010 tivemos um total de 1.011.548 de casos de dengue no Brasil sendo a região sudeste a mais afetada com 478.003 casos. Desse total tivemos 3700 casos de dengue hemorrágica com 300 casos de óbitos no Brasil, e 499 casos de dengue hemorrágica e 126 óbitos no Estado do Rio de Janeiro, cuja prevalência também foi do sorotipo 2 do DENV. No ano passado (2013), tivemos a prevalência do sorotipo DENV-4 que foi reintroduzido em 2010 no estado de Roraima após ficar 28 anos sem notificação de nenhum caso deste sorotipo. Constatados um total de 1.452.489 casos confirmados de dengue no país, com 1.297 de casos de dengue hemorrágica e 235 óbitos. A região Sudeste teve maior número de casos com 478.003 sendo 513 casos hemorrágicos e 91 óbitos (44). Um dado bastante intrigante ocorreu em decorrência de um estudo sobre o ciclo da transmissão silvestre do DENV em 2007 realizado na Malásia, que leva a acreditar na existência de um novo sorotipo, DENV-5 naquela região (45). Entretanto novos estudos devem ser realizados para a confirmação deste achado.



**Figura 1.5. Dados epidemiológicos dos casos de Dengue na época de 2002-2013.**

Dados levantados de acordo com o levantamento epidemiológicos do Ministério da Saúde.

a) Casos confirmados de dengue no Brasil e b) número de casos de febre hemorrágica e de óbitos durante os períodos de 2002-2013.

## 1.2.2. Vírus Dengue (DENV)

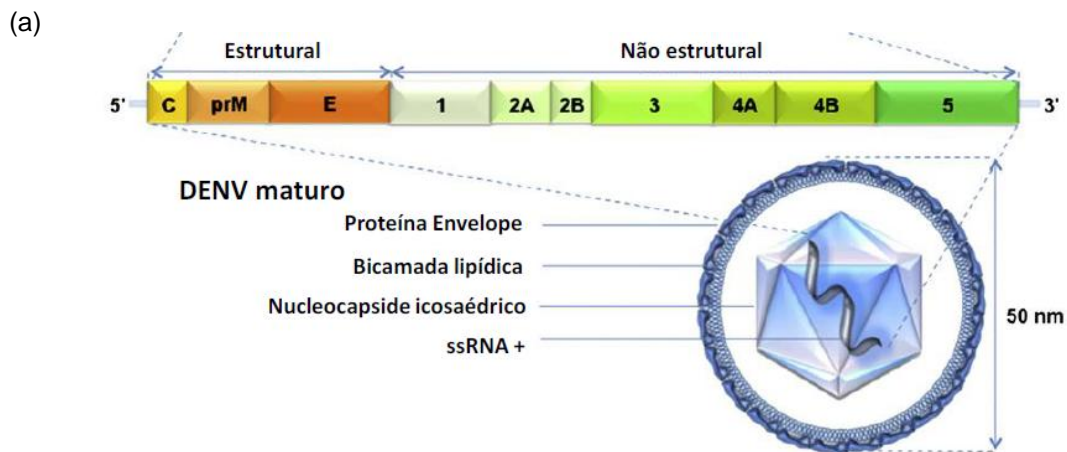
### 1.2.2.1. Classificação, Estrutura e Replicação Viral

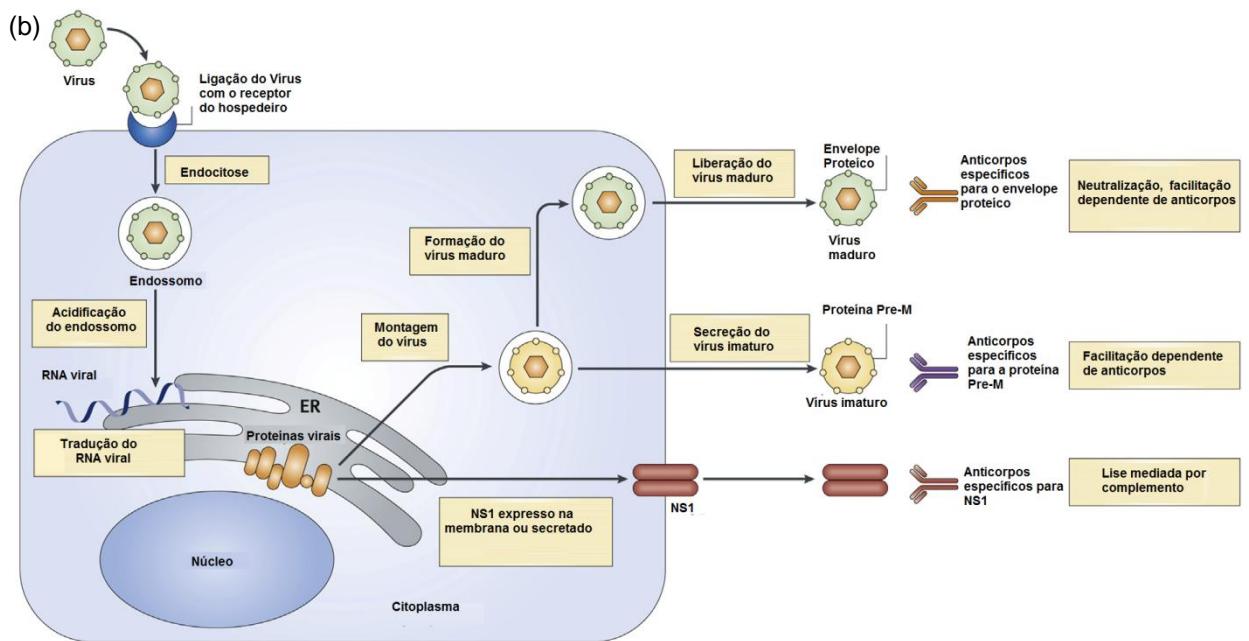
O vírus dengue (DENV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que incluem diversos vírus considerados uma ameaça para a saúde pública, como o vírus da febre amarela (YFV), do Oeste do Nilo (WNV), da encefalite japonesa (JEV) e vírus da encefalite causada por carrapatos (TBEV) (revisado por (46)). O DENV tem como vetor principal o *Aedes aegypti*, possuindo 4 sorotipos antígenicamente distintos (DENV-1-4), dentro os quais existem variações genéticas que definem os genótipos virais. Dentro dessas variações temos dois genótipos conhecidos: o Americano, que possui característica de ser intrinsecamente de baixa virulência em comparação ao genótipo Asiático, que parece estar mais relacionado às formas mais graves da dengue, como a febre hemorrágica do dengue (FHD) e a síndrome do choque do dengue (SCD) (revisado por (47)).

O DENV possui estrutura esférica de 50nm de diâmetro e é composto por uma cadeia simples de RNA senso positivo. Seu genoma compreende cerca de 10.600 nucleotídeos, sendo as regiões 5' e 3' não-traduzidas (UTRs) responsáveis pela regulação da tradução e síntese do RNA genômico. Essa tradução do RNA viral resulta na produção de um polipeptídeo que é co-transducionalmente processado por proteases celulares e virais, gerando três proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M, transcrita como precursor prM) e a proteína de envelope (E) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e NS5 (figura 1.6) (revisado por (46)).

A proteína E, sendo uma proteína exposta na superfície do vírus, atua como ligante de receptores relacionados à entrada do vírus na célula do hospedeiro. Evidências indicam que a principal forma de entrada do vírus é via endocitose mediada por clatrina. O pH ácido do endolisossomo induz alterações conformacionais na proteína E, levando a formação de poros na membrana lisossomal e liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (revisado por (48)). As proteínas estruturais estão envolvidas com a montagem do capsídeo ao redor do RNA e num processo de maturação do vírus que se inicia com a clivagem da prM, pela protease furina e orientada pela proteína E, na rede trans-Golgi. Durante esse processo de maturação viral no interior do lisossomo, o vírus sofre modificações em razão do pH baixo (5,8-6,0). Essa modificação conformacional permite o escape do RNA viral a partir do endossoma, e

possibilitando a sua tradução no retículo endoplasmático e sua replicação. Durante esta etapa, algumas proteínas não estruturais (NS4A NS2B/3) induzem a resposta de proteínas desenovelada (UPR) para impedir a morte da célula hospedeira. Em seguida, ocorre a associação do RNA viral com a proteína do capsídeo e o brotamento para o retículo endoplasmático para adquirir sua membrana lipídica, revestida com as proteínas de membrana (prM/M) e do envelope (E), a saída das partículas virais ocorrem pela via secretora do hospedeiro (revisado por (49)). A proteína E, além do seu papel no processo de maturação viral, é também, muito relacionada ao desencadeamento de resposta imune humoral do hospedeiro, sendo a maior parte da resposta via anticorpos dirigida para epítopos específicos desta região (revisado por (50)). Além de participarem no processo de replicação viral as proteínas não estruturais como a NS1 apresenta-se tanto na forma membranar quanto na forma solúvel, podendo induzir a cascata de ativação do Sistema Complemento (SC), e com isso promovendo produção de citocinas inflamatórias relacionadas com a FHD/SCD. Outras proteínas como a NS2A, NS4A e NS4B atuam inibindo a transdução de sinalização do IFN do tipo 1, que está envolvida no controle de infecções virais. Demais proteínas não estruturais estão vinculadas a replicação viral e síntese de RNA (revisado por (49)).





**Figura 1.6 Vírus da Dengue (DENV).** (a) A Partícula viral do DENV mede entre 40-65nm, sendo composto por uma fita de RNA simples que possui uma região de leitura aberta que codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (b) Ciclo de replicação do DENV e mecanismos de resposta imune as proteínas virais. Adaptado de Guzman *et al.*, 2010 e Rothman AL, 2011.

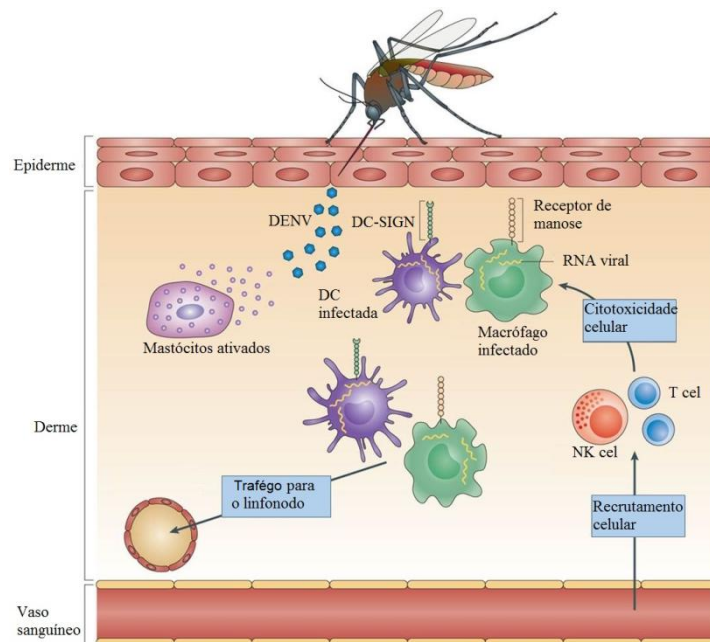
### 1.2.2.2. Principais células-alvo e receptores virais.

O início da infecção ocorre com a introdução do DENV pelo seu vetor *Ae. aegypti* na região subcutânea da pele do hospedeiro. Alguns aspectos da trajetória do início da infecção viral e replicação não estão totalmente esclarecidos, como a resposta imune desencadeada na região de inoculação ou o impacto que determinado sorotipo pode desempenhar nesse processo (revisado por (51)). Logo após a injeção subcutânea na pele do DENV pelo mosquito, partículas virais são liberadas infectando células adjacentes, que incluem células dendríticas (DC, *dendritic cells*) residentes, monócitos e macrófagos. As partículas virais podem migrar, através das células infectadas, para linfonodos de drenagem e estabelecer a viremia no hospedeiro (revisado por (52)) (Figura 1.7).

A infecção destes tipos celulares ocorre mediante a interação do vírus com receptores como DC-SIGN (*dendritic cell ICAM-3 grabbing nonintegrin*) /CD209, presente em subpopulações de células dendríticas; L-SIGN (*liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*), expresso em células endoteliais específicas como o endotélio sinusoidal do fígado, órgãos linfóides e capilares placentários que

interagem com a proteína E (53); receptores de manose, presentes em populações de macrófagos, que interagem com glicoproteínas de superfície do DENV; proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs), encontrados em células endoteliais; ICAM-3, CD14, HSP70/90, GRP78 e receptores de laminina (revisado por (48)).

Por outro lado, células do sistema imune auxiliam a eliminação de células infectadas pelo DENV. Dentre elas, células NK e linfócitos T, IgM naturais, DC, células Langherans. Mastócitos, células predominantes na pele, participam do processo de vigilância imunológica liberando mediadores pré-formados como a  $\beta$ -hexosaminidase, em resposta ao reconhecimento de proteínas estruturais do vírus e promovendo a regulação de citocinas e quimiocinas, como CCL5/RANTES e CX3CL1/Fractalcina. Essas quimiocinas promovem o recrutamento de outros tipos celulares, como células NK e células NKT limitando a propagação do viral (revisado por (51)).



**Figura 1.7. Resposta do hospedeiro a infecção pelo DENV na pele.** A maioria das infecções pelo DENV ocorre após a injeção subcutânea do vírus na pele. Partículas virais liberadas podem infectar células vizinhas (predominantemente monócitos e células dendríticas) ou ativar células imunes residentes, como mastócitos. Uma resposta inflamatória local anti-DENV na pele inicia o recrutamento de leucócitos, como células NK e linfócitos T, que promovem, no local, a morte de células infectadas pelo DENV. Após a infecção, o DENV é drenado para os linfonodos através dos vasos linfáticos estabelecendo uma infecção sistêmica. As repostas inflamatórias localizadas ocorrem muitos dias antes que haja qualquer sinal de infecção. Adaptado de St John *et al.*, 2013.

### **1.2.3. Classificação Clínica da Dengue.**

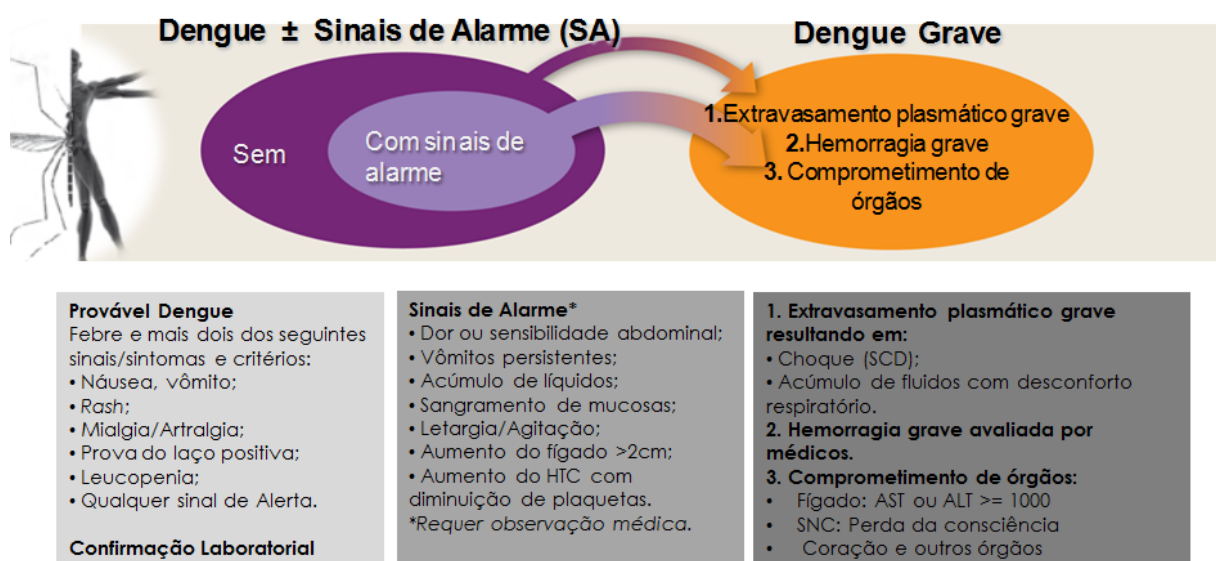
Dengue é uma doença com amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde uma infecção assintomática, casos sintomáticos sem maiores complicações (febre do dengue, FD), até formas graves (febre hemorrágica do dengue e síndrome do choque por dengue, FHD/SCD) (revisado por (54)).

Após um período de incubação de 4-8 dias, a infecção pelo DENV pode induzir um amplo espectro de manifestações clínicas, a maioria assintomáticas ou subclínicas. Grande parte dos pacientes se recupera sem maiores complicações, no entanto, alguns pacientes podem apresentar quadros graves, como extravasamento plasmático e/ou manifestações hemorrágicas até casos de óbito. A doença começa de maneira abrupta, seguindo por três fases: febril, crítica e a de recuperação. A fase febril dura entre 2-7 dias sendo muitas vezes acompanhada de rubor facial, eritema cutâneo, dor no corpo generalizada, mialgia, artralgia e cefaleia. Nesta fase, existe grande dificuldade de distinguir clinicamente a dengue de outras doenças febris. O período crítico ocorre próximo (aproximadamente 24-48 horas) a fase de recuperação, quando pode ocorrer aumento da permeabilidade capilar acompanhada por hemoconcentração (aumento do hematócrito), acarretando em choque hipovolêmico, insuficiência de órgãos, acidose metabólica, coagulação intravascular disseminada e hemorragias graves. A fase de recuperação é caracterizada por uma gradual reabsorção do fluido extravascular dentro de um período de 48-72 horas, seguido de melhora sintomática e estabilização do número de plaquetas, glóbulos brancos e valor do hematócrito. Caso não tratado, o nível de mortalidade dos pacientes pode ser superior a 20%, enquanto que um manejo terapêutico adequado e reidratação intravenosa podem reduzir esse percentual para menos de 1%(55).

Inicialmente a Dengue era classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em febre do dengue (FD), febre hemorrágica do dengue (FHD, grau I e II) e síndrome do choque da dengue (FHD, grau III e IV). Dentro desta diretriz os pacientes classificados em: grau I apresenta febre acompanhada de sintomas inespecíficos e prova do laço positiva; grau II, além dos sinais anteriores apresentam quadros hemorrágicos mais brandos, por exemplo, nas mucosas e outras regiões; grau III, colapso circulatório com fraca pulsação seguido de queda de pressão e grau IV, choque grave com queda importante da pressão arterial.



Entretanto com a Dengue se dispersando ao redor do mundo tornou-se evidente que esta classificação não era universalmente aplicável para o manejo clínico. Que foi revelado mediante estudo multicêntrico, realizado pela TDR/OMS (Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial de Saúde), que incluía uma análise comparativa das diretrizes clínicas da dengue em 13 países no ano de 2009, objetivando avaliar variações dessa classificação na América Latina e na Ásia. As diferenças observadas no uso destas diretrizes entre esses países sugeriram a necessidade de reavaliar e padronizar novas diretrizes clínicas para a Dengue (56). No ano de 2009, o TDR/OMS estabeleceu uma nova classificação clínica da dengue: dengue sem sinal de alarme (FD), dengue com sinal de alarme (FDSA) e dengue grave (55) (Tabela 1.2). A nova classificação demonstrou ter um potencial elevado para gestão dos casos de dengue e a vigilância dos pacientes. Além disso, esta classificação já foi mostrada ser mais sensível que a classificação anterior com relação a facilitação do reconhecimento de pacientes com dengue grave, diminuição da proporção de pacientes “não-classificáveis” e maior aplicabilidade em relação a triagem e gerenciamento de casos (56).



**Tabela 1.2. Classificação da Dengue quanto à Gravidade Clínica.** Adaptado de WHO/TDR 2009

## **1.2.4. Teorias envolvidas com a Patogênese da Dengue**

### **1.2.4.1. Teoria Multifatorial**

A teoria multifatorial discute a patogênese da dengue envolvendo diversos fatores: virulência, genética e resposta imunológica do hospedeiro e fatores ambientais (Figura 1.8). Variações genéticas entre os sorotipos e subtipos são importantes determinantes da virulência e do potencial de ocasionar epidemia, por exemplo, sorotipos com vantagem de replicação em humanos e mosquitos podem se espalhar mais rapidamente, substituindo sorotipos com baixa aptidão para tais eventos. Além disso, estudos baseados em levantamentos epidemiológicos em associação com os parâmetros laboratoriais apresentados pelos pacientes, reforçaram a virulência do DENV como um fator de risco importante para a doença e sugerindo que o sorotipo do vírus e seu genótipo podem influenciar no quadro sintomático da doença e sua evolução (revisado por(57)).

Com relação ao hospedeiro, a variedade de manifestações clínicas durante a dengue levanta a possibilidade do envolvimento genético do hospedeiro no quadro evolutivo da doença. Por exemplo, na epidemia de 2007 ocorrida em Cuba pelo DEN-2, verificou-se que populações de ascendência africana apresentavam uma incidência de 2% para FHD enquanto que essa incidência subia para 30% em populações de origem caucasianas, reforçando a influencia do fator genético na dengue (58). Outras associações já tem sido identificadas como no HLA, o polimorfismo no HLA de classe 1 foi associado com aumento da susceptibilidade à dengue hemorrágica no Vietnã onde crianças com HLA-A\*24 são mais suscetíveis a FHD em comparação com crianças com HLA-A\*33 (59).

Polimorfismo em cinco genes: IL-4, IL-1RA, MBL, VDR, e FccRII estão correlacionados com o aumento da susceptibilidade a DHF, em contraposição uma mutação funcional na região promotora do receptor DC-SIGN foi associado a susceptibilidade à dengue branda, mas não DHF. Polimorfismos de citocinas como: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF $\beta$  e IL-10 já foi verificado possuírem relação a DHF (revisado por (60)). Além disso, o receptor CLEC5A, presente em macrófagos, já foi demonstrado em ensaios experimentais contribuir para o aumento da letalidade em camundongos infectados pelo DENV (61).

Com relação aos fatores ambientais relacionados sabe-se que a transmissão da DENV é dependente do seu vetor primário *Ae. aegypti* e secundário *Ae.*

*albopictus*. A densidade desses mosquitos numa região é um importante parâmetro para previsões de epidemias de Dengue. Tais vetores são dependentes de água para o seu ciclo reprodutivo, sendo correlacionado o aumento da densidade populacional do vetor com as épocas de estação chuvosa na região. Tendo grande afinidade com o ser humano, podendo infectar várias pessoas num único dia (revisado por (57)). Uma das medidas atuais utilizadas para o controle do vetor envolve a infecção do vetor com a bactéria *Wolbachia*. Estudos iniciais sugerem que a infecção do mosquito com a *Wolbachia* reduz o tempo de vida adulta do mosquito em 50% e esta bactéria induz resistência a uma variedade de agentes patogênicos, que incluem a DENV. Além disso, os insetos infectados pela *Wolbachia* podem transmiti-los via transovariana para a próxima geração. Com isso reduzindo o tempo de vida do vetor, sua competência vírus-vetor e eficiência de transmissão do vírus (revisado por (62)).

#### **1.2.4.2. Teoria da facilitação dependente de anticorpo**

Em 1977 Halstead e Rourke durante seus ensaios experimentais observaram que macacos infectados pelo DENV-1, -3 ou -4 quando desafiados posteriormente pelo DENV-2 apresentavam maiores níveis do vírus presentes na circulação em comparação aos macacos que tinham sido expostos pela primeira vez pelo mesmo DENV-2 e com a mesma carga viral. Não obstante a isso, constatou *in vitro* que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidos de macacos e de humanos, infectados com determinado sorotipo eram mais permissivas a infecção por um sorotipo distinto quando comparadas com as culturas de PBMC obtidas de macacos e humanos que não tinham sido infectados pelo DENV (63).

Surgiu então a teoria da *facilitação dependente de anticorpo* (*antibody dependent enhancement, ADE*) propondo que a formação de imunocomplexos entre anticorpos heterólogos e o DENV aumentaria a sua infecção. O ADE ocorre através da interação da porção Fc do anticorpo heterólogo não-neutralizantes com o FcγR, principalmente a classe FcγRII (64), na superfície de células-alvo, monócitos, macrófagos e recentemente demonstrados em basófilo e mastócitos (65, 66). Estudos *in vitro* reforçam essa teoria, uma vez que foi visto que soros de crianças com infecção secundária promoviam o aumento da infecção pelo DENV em culturas de células K562 (*human erythromyeloblastoid leucemia cell line*), analisadas através do número de células infectadas em comparação com a quantidade de vírus infeccioso presente no soro. Já foi visto também que crianças nascidas de mães já

imunizadas contra determinado sorotipo do DENV apresentam carga viral elevadas em comparação a crianças nascidas de mães que não foram expostas ao vírus (67). Alguns mediadores inflamatórios como as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 e quimiocinas CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , e CCL5/RANTES são encontradas em maiores níveis após infecção por anticorpo dependente, podendo estar relacionadas as alterações da permeabilidade encontrado em pacientes com dengue grave (68).

#### **1.2.4.3. Teoria do Pecado Antigênico Original.**

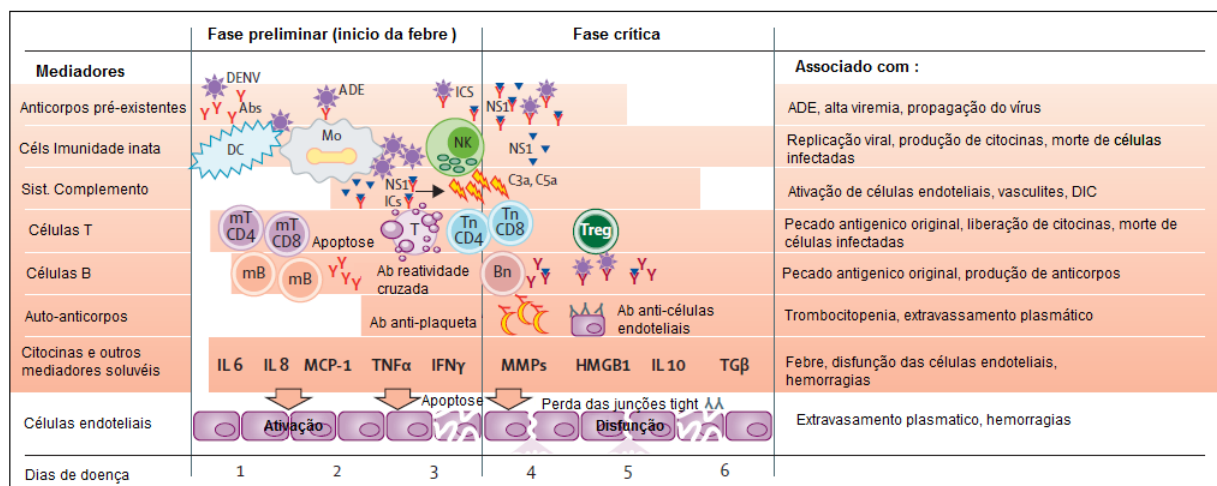
A hipótese do “Pecado Antigênico Original” postula que a infecção secundária por um sorotipo distinto do DENV resulta na expansão de células T de memória pré-existentes, com baixa avidéz, e de reatividade cruzada para o sorotipo da infecção secundária. Com isso, diminuindo a eficácia do sistema imune em desenvolver uma resposta imune celular específica para o DENV de forma adequada (revisado por (69)). Linfócitos T de memória, quando ativados nessa infecção heteróloga exibem baixa capacidade de degranulação e aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ (70). Um dado curioso é que se tem demonstrado correlação positiva do nível de ativação de células T de memória com a gravidade da doença e dados utilizando crianças vietnamitas sugerem que a ativação destas populações celulares no sangue não ocorre de modo sincronizado com o aumento da permeabilidade endotelial. Sugerindo a localização destas populações em tecidos específicos durante esse processo de alteração da permeabilidade (revisado por (69)).

#### **1.2.4.4. Tempestade de Citocinas**

A tempestade de citocinas refere-se a uma liberação excessiva ou descontrolada de citocinas pró-inflamatórias e tem sido associada com uma ampla variedade de doenças infecciosas (Citomegalovírus, Epstein-Barr, Influenza, Varíola, SARS) e não infecciosas (esclerose múltipla, pancreatite, disfunção múltipla de órgão). Na infecção pelo DENV uma das principais consequências dessa tempestade de citocinas e a extravasamento plasmático (revisado por (71)). O extravasamento plasmático é uma marca registrada em casos de FHD/SCD em decorrência a alterações do endotélio vascular. Entretanto, os mecanismos que levam a esse extravasamento não estão totalmente elucidados (72). Dentre as possíveis explicações, podemos mencionar o descontrole de produção de citocinas e quimiocinas que ocorre neste evento. Durante a fase crítica da doença, que antecede a fase de convalescência, altos níveis de citocinas e quimiocinas são observados nesses pacientes com dengue hemorrágica e síndrome do choque por

dengue. Além disso, sabe-se também que a infecção viral de células endoteliais não parece ser a principal etapa para a alteração da permeabilidade, sugerindo a influência de fatores solúveis produzidos por células T, monócitos, macrófagos e mastócitos que são estimulados por essa “tempestade de citocinas” (73).

Dentre os mediadores solúveis envolvidos no aumento da permeabilidade em células endoteliais primárias, podemos mencionar: TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8/IL-8, IL-10, IL-12, MIF, HMGB1 (high-mobility group protein 1)CCL2/MCP-1 e metaloproteínas de matriz (74) e proteínas como a NS1 secretada, em conjunto com anticorpos anti-NS1 e ativação do Sistema Complemento também podem estar envolvidos na alteração da permeabilidade vascular induzida pelo DENV durante este fenômeno (75).



**Figura 1.8. Mecanismos Imunopatogênico relacionados ao desfecho clínico da Dengue.** Dentre os processos possíveis temos a presença de anticorpos pré-existent que podem mediar ADE; infecção e ativação de células da imunidade inata; ativação do sistema complemento, de células T e B; produção de auto-anticorpos; liberação de citocinas e outros mediadores solúveis que são liberadas em decorrência da ativação do sistema imune e participando da patogênese mediando o extravasamento plasmático. A exacerbação da ativação do sistema imune está associado com a gravidade da doença. Níveis elevados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias agem sobre o endotélio promovendo alterações na monocamada que reflete no extravasamento plasmático. Legenda: Abs, anticorpos; ADE, facilitação dependente de anticorpos; ICS, imunocomplexos; DC, células dendríticas; Mo, monócitos/macrófagos; T<sub>M</sub>, células T de memória; T<sub>N</sub>, Células T naive; Treg, células T regulatórias. B<sub>M</sub>, células B de memória; B<sub>N</sub>, células B naive; DIC, coagulação intravascular disseminada. Adaptado de Guzman & Harris, 2014

### 1.3. Contribuição das Quimiocinas na Alteração da Permeabilidade Endotelial na Dengue

Células endoteliais (CE) infectadas pelo DENV (76-78) sofrem, por consequência, algum tipo de alteração em suas funções. Por exemplo, na regulação da barreira endotelial, ativação/migração de células imunes, aumento da produção de citocinas e quimiocinas e no controle da viremia, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (79, 80). Estudo demonstrou que o DENV foi capaz de infectar 80% das CE primárias humanas, via receptores celulares contendo heparan sulfato, com uma infecção rapidamente produtiva e liberação de aproximadamente  $10^5$  FFU/mL (unidades formadores de foco) de vírus no meio nas 24 horas de infecção (81). Células endoteliais infectadas pelo DENV induzem uma resposta aumentada de citocinas e quimiocinas inflamatórias, o que contribui para a “tempestade de citocinas” e na disfunção e alteração da permeabilidade endotelial (76, 82, 83). Kelley e colaboradores demonstraram que mediadores vasoativos, como TNF- $\alpha$  e CXCL8/IL-8 presentes no sobrenadante de células THP-1 (linhagem humana de células monocíticas) infectadas pelo DENV, promoviam alteração da permeabilidade da monocamada de células endoteliais humanas HMVECs (*human dermal microvascular endothelial cells*), através da diminuição da medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) e aumento da expressão de moléculas de superfície das CE como VCAM-1 e E-selectina (84).

Além das citocinas, quimiocinas são candidatos potenciais na modulação da permeabilidade vascular na dengue. Um dos trabalhos pioneiros neste sentido é o estudo de Avirutnan e colaboradores (1998) que caracterizaram a infecção pelo DENV-2 em linhagem de CE do tipo ECV304 (*human umbilical cord vein endothelial cell line*). Segundo os autores, quando infectadas essas CE levam a produção de CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8. Esses dados foram associados aos observados com pacientes nas formas FHD/SCD, nos quais foram encontrados altos níveis de IL-8. A hipótese dos autores é de que quimiocinas catiônicas, em conjunto com anafilatoxinas oriundas da ativação do Sistema Complemento, induzem um aumento da permeabilidade na vasculatura das serosas e apoptose na barreira endotelial, principalmente nas formas graves da dengue (85). Mais tarde, o envolvimento da CXCL8/IL-8 foi confirmado no estudo de Talavera e colaboradores (2004) que infectaram monocamadas confluentes da linhagem de CEs do tipo HMEC-1 (*human*

*mammary epithelial cells*) com o DENV e observaram que essas células aumentaram a permeabilidade, observada pela reorganização do citoesqueleto de actina e da proteína ocludina das junções *tight*, nas 72 horas após infecção. De forma interessante, essas modificações também foram observadas nas CE não-infectadas da cultura. Neste sistema, a CXCL8/IL-8 foi uma das quimiocinas identificadas em maior concentração na cultura e a neutralização desta inibiu parcialmente as modificações na monocamada (86). Além da CXCL8/IL-8, Lee e colaboradores (2006) demonstraram que a exposição à monocamada de CEs do tipo HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) a quimiocina CCL2/MCP-1 ou ao sobrenadante de monócitos humanos infectados pelo DENV-2, aumentou a permeabilidade da monocamada ou prejudicou as junções do tipo *tight* entre as células. De forma interessante, semelhante à neutralização da CXCL8/IL-8, a adição de anticorpos bloqueadores anti-CCL2/MCP-1 reverteu parcialmente essas alterações, sugerindo a participação desta quimiocina, em parte, neste processo (87). A indução da produção da quimiocina CXCL8/IL-8, assim como de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 já foram demonstradas em estudo posterior no contexto de infecção *in vitro* das CEs (88).

Importante destacar que outras células também são fontes de quimiocinas na infecção *in vitro* pelo DENV, como demonstrado em estudo no qual células dendríticas infectadas pelo DENV-2, assim como as *bystander*, secretam uma série de mediadores inflamatórios, incluindo CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin e CXCL10/IP-10 (89). Ainda, linhagem de mastócitos de ratos RBL (*basophilic leukemia-2H3 cells*) quando infectados *in vitro* pelo DENV, além de induzir ativação e degranulação dessas células, induz secreção de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ , e quimiocinas tais como CCL5/RANTES, CXCL12/SDF-1 e CX3CL1/Fractalcina (90).

De forma bastante interessante, a interação de células infectadas pelo DENV com outras células do sistema imune parece promover uma amplificação da produção de quimiocinas. Dejnirattisai e colaboradores (2008) observaram que linfócitos T de pacientes quando co-cultivadas com células dendríticas infectadas pelo DENV produziam mais CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10, mas menos CXCL11/I-TAC e TNF- $\alpha$ . De forma similar, células endoteliais primárias do tipo HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) quando co-cultivadas com células mononucleares do sangue periférico ativadas de pacientes ou com células dendríticas infectadas pelo

DENV, aumentaram a produção de CXCL10/IP-10 (91). Mais recentemente foi demonstrado que monócitos de doadores saudáveis em contato com plaquetas de pacientes infectados pelo DENV induziram a secreção dos mediadores IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8, IL-10 e CCL2/MCP-1, enquanto que a interação de monócitos e plaquetas de doadores induziu apenas CCL2/MCP-1 (92).

Em pacientes infectados pelo DENV têm sido encontradas diferentes quimiocinas circulantes. Estudo demonstrou níveis aumentados de CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG e CXCL11/I-TAC em pacientes FHD comparados aos pacientes FD. CCL2/MCP-1 também foi detectada, mas sem diferença entre os grupos FHD e FD. De forma interessante, uma vez que esses autores encontraram as CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG e CXCL11/I-TAC, todos ligantes do CXCR3, eles demonstraram um aumento da frequência de linfócitos T de pacientes expressando CXCR3 com perfil de ativação através da coexpressão da molécula CD38. Os autores sugerem uma correlação desses níveis aumentados das quimiocinas com a gravidade da doença (91). Outro estudo confirmatório sobre a magnitude da resposta inflamatória mediada por citocinas e quimiocinas na gravidade da dengue e, de forma importante, na permeabilidade vascular, foi o de Chau e colaboradores (2008). Os autores detectaram altos níveis de IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1 e CXCL9/MIG em pacientes com SCD comparado aos pacientes com FHD e pacientes com outras doenças febris. De forma surpreendente, CCL5/RANTES foi a única quimiocina com níveis diminuídos nos SCD comparado aos demais pacientes. Análises de correlação com diferentes parâmetros laboratoriais dos pacientes indicaram que CXCL10/IP-10 foi diretamente correlacionado com a viremia. Em relação à dosagem das transaminases relacionadas à disfunção hepática, autores observaram uma correlação positiva com CXCL9/MIG, mas negativa com CCL5/RANTES (67).

Raros estudos tem abordado a expressão de receptores de quimiocinas em modelos de infecção *in vitro* pelo DENV ou em pacientes naturalmente infectados. Em 2012 nosso grupo publicou dados originais nos quais vimos um aumento da frequência de linfócitos T CD4 e CD8 do sangue expressando CCR5, de linfócitos T CD4 expressando CXCR3 e de linfócitos T CD8 expressando CCR4. De forma interessante, subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 CCR5+ ou CXCR3+ coexpressavam marcadores de citotoxicidade CD38 e CD107a. Enquanto que, linfócitos T CD8 CCR4+ coexpressavam marcadores de ativação e migração celular



CD44<sup>HIGH</sup>, CD127<sup>LOW</sup> e CD29, indicando que essas subpopulações celulares apresentam função efetora e são capazes de migrar para outros tecidos. Semelhantes a estudos anteriores, vimos um aumento das quimiocinas circulantes CCL2/MCP-1 e CCL4/MIP-1 $\beta$ , mas um decréscimo de CCL5/RANTES em pacientes classificados como FD e FD com sinais de alarme/graves comparado aos controles. Também foi visto um perfil diferencial de CCL5/RANTES. Assim, enquanto detectamos baixo nível da quimiocina no sangue, verificamos um aumento de células expressando CCL5/RANTES no tecido hepático de 4 pacientes que foram à óbito na infecção pelo DENV. Esses dados sugerem que células do sangue expressando receptores de quimiocinas específicos ao ligante CCL5/RANTES estariam migrando para sítios específicos durante a infecção pelo DENV (93).

Juntos, esses trabalhos indicam que quimiocinas tem sua produção aumentada por diferentes populações celulares na infecção natural pelo DENV. Se essa produção está envolvida na indução de uma resposta imune anti-DENV efetiva, ou na imunopatogênese da dengue, ainda não está claro. Neste estudo, pretendemos avaliar a contribuição de quimiocinas circulantes moduladas na infecção humana pelo DENV na alteração da permeabilidade endotelial.

## 2. Justificativa

A interação do DENV com o endotélio pode ser um dos mecanismos chaves para a compreensão da imunopatogênese, sendo influenciado por mediadores pró-inflamatório como quimiocinas e citocinas produzidas por células endoteliais e por outros tipos celulares durante esse processo de infecção. Ensaios *in vitro* confirmam a participação das quimiocinas, como CXCL8/IL8 e CCL2/MCP-1 neste processo, pois estas tem capacidade de promover alterações na permeabilidade interferindo nas junções *tight* e citoesqueleto de linhagens humanas de células endoteliais (84, 86). CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 também são produzidas pelas células endoteliais quando infectadas *in vitro* pelo DENV (86, 88). Poucos trabalhos científicos abordam a influência das quimiocinas presentes na circulação de pacientes infectados pelo DENV na alteração da permeabilidade endotelial. Quimiocinas tem sua produção aumentada por diferentes subpopulações celulares na infecção natural pelo DENV, se essa produção está preferencialmente envolvida na indução de uma resposta imune anti-DENV efetiva, ou na imunopatogênese da doença, ainda não está claro. Neste estudo pretendemos avaliar a contribuição de quimiocinas circulantes moduladas na infecção humana pelo DENV na alteração da permeabilidade endotelial.

### **3. Objetivos**

#### **3.2. Objetivo Geral**

Avaliar o envolvimento de quimiocinas circulantes presentes em pacientes infectados pelo DENV na alteração da permeabilidade transendotelial, utilizando células endoteliais primárias num sistema *in vitro*.

#### **3.3. Objetivos específicos**

- I. Relacionar parâmetros clínicos e laboratoriais com o desfecho clínico de pacientes infectados pelo DENV;
- II. Quantificar níveis séricos das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 e correlacioná-las aos parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes;
- III. Quantificar níveis séricos das quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalcina e CCL5/RANTES e correlacioná-las aos parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes;
- IV. Avaliar alteração da permeabilidade endotelial segundo uma cinética de interação de células endoteliais primárias HMVEC-d com soro de pacientes infectados pelo DENV;
- V. Avaliar a contribuição das quimiocinas na alteração da permeabilidade das HMVEC-d, utilizando ensaios com anticorpos bloqueadores das quimiocinas;
- VI. Correlacionar a alteração da permeabilidade endotelial das HMVEC-d com citocinas e quimiocinas séricas presentes em pacientes.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Estudo Populacional**

No período de fevereiro a abril de 2013 foram obtidas 267 amostras de sangue de pacientes com suspeita clínica de dengue. Esse trabalho ocorreu em centros regionais especializados no atendimento e tratamento de pacientes infectados pelo DENV: Hospital-Dia Professora Esterina Corsini da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), coordenado pelo Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, e Hospital Plantadores de Cana, no Centro de Referência em Dengue em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, coordenado pelo Dr. Luís José de Souza. Cento e oitenta e um pacientes (67,8%) tiveram confirmação do diagnóstico e foram classificados quanto à gravidade clínica de acordo com os critérios estabelecidos pelo Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial de Saúde (TDR/OMS, 2009). Os pacientes foram entrevistados (anexo 1) e a sua inserção em nosso projeto foi realizada mediante assinatura do Termo de Consentimento, Livre e Esclarecido (anexo 2). Esse projeto é parte de um projeto aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa 37230.000.009-08 IPEC/FIOCRUZ, 0029.0314.011-09 SMS/RJ e mais recentemente, pelo Sistema Plataforma Brasil número CAAE 13318113.7.3001.0021(anexo 3).

Para nossos ensaios utilizamos 10 indivíduos como controles sadios, coletados no estado do Rio de Janeiro, tendo em consideração que estes não apresentaram episódios febris ou histórico de outras doenças por até 3 meses antes da data de coleta de sangue.

### **4.2. Obtenção de Plasma e Soro de Pacientes e Controles Saudáveis**

Amostras de sangue de pacientes foram coletadas entre 1<sup>o</sup> e o 18<sup>o</sup> dia após o aparecimento dos primeiros sintomas (dias de doença). Volume de aproximadamente 10mL de sangue foram coletados de pacientes com suspeita de dengue e de controles sadios em tubos contendo anticoagulante ACD (citrato de sódio 22 g/L, ácido cítrico 8 g/L e dextrose 24,5 g/L) (BD Vacutainer®, catálogo # 364606), para obtenção de plasma e células mononucleares. Além desse volume inicial, cerca de 5mL de sangue foram coletados em tubo seco para obtenção de

soro. A obtenção de plasma e soro foi feita após centrifugação à 1000g por 10 minutos e diferentes alíquotas do material foram armazenadas a -70°C até sua utilização.

### **4.3. Confirmação do Diagnóstico Laboratorial e Classificação Clínica dos Casos Confirmados**

A infecção pelo DENV foi confirmada através da pesquisa qualitativa de anticorpos IgM anti-DENV por ELISA de captura (PANBIO, Columbia, USA), detecção do antígeno viral NS1 por ELISA (Platelia™ Dengue NS1 Ag Kit – Bio-Rad Laboratories) e/ou detecção do RNA viral por RT-PCR. Todos os testes foram realizados por Nieli Costa Farias do Laboratório de Flavivírus (LabFla, IOC/Fiocruz), chefiado pela Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira. O diagnóstico por detecção de NS1 foi realizado de três diferentes formas: a 1º seguindo protocolo do fabricante, a 2º e a 3º seguindo modificações metodológicas estabelecidas pelo LabFla em busca de maior sensibilidade para detecção de NS1. Para isso, amostras séricas foram pré-aquecidas a 100°C por 5 min ou incubadas com solução de 1,5M de glicina/ácido hidrolórico, pH 2,8 a 37°C por 1 hora. Em seguida, foi feita neutralização da reação pela adição de solução de 1,5 M de tris/ácido hidrolórico pH 9,7. Estas reações promovem a dissociação de complexos imunes formados entre a proteína NS1 e anticorpos heterólogos provenientes de infecções anteriores pelo DENV (94). A positividade de NS1 nesta coorte de pacientes aumentou significativamente após utilização dos protocolos modificados.

Foi também realizado o teste anti-DENV IgG, utilizando o kit Dengue Virus IgG DxSelect (EL1500G, Focus Diagnostics, Cypress, CA, USA), para verificar infecção prévia ou secundária. Pacientes com infecção primária foram considerados aqueles com positividade para qualquer um dos três testes: IgM, NS1 e/ou sorotipo viral por RT-PCR com IgG negativo. No caso de IgG positivo, a taxa de IgM/IgG >2,0. No caso de infecção secundária, aqueles com positividade para qualquer um dos três testes: IgM, NS1 e/ou sorotipo viral por RT-PCR com IgG positivo e uma taxa de IgM/IgG <2,0 (55).

Parâmetros laboratoriais, tais como: contagem de plaquetas, % hematócrito, contagem de leucócitos, linfócitos monócitos, bem como dosagem das enzimas AST/TGO e ALT/TGP foram realizados pelos hospitais onde os pacientes foram

atendidos. Obtivemos alguns desses parâmetros nos controles saudáveis utilizados no estudo como número de plaquetas, leucócitos, linfócitos e monócitos e hematócrito.

#### **4.4. Quantificação de Citocinas e Quimiocinas Plasmáticas pelas Técnicas de Multiplex em Microarranjo Líquido ou ELISA**

As citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) e quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES e CX3CL1/Fractalcina) foram quantificadas utilizando soros de pacientes com diagnóstico confirmado e controles sadios. As citocinas e quimiocina: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, CXCL8/IL-8 foram quantificadas pelo ensaio de multiplex em microarranjo líquido, pela tecnologia Luminex® de acordo com as especificações do fabricante (kit R&D Systems). O imunoensaio de detecção multiplex Luminex® consiste na detecção de várias proteínas circulantes simultaneamente numa única amostra de soro utilizando microesferas específicas para cada citocina. Microesferas de propriedades espectrais definidas são conjugadas aos anticorpos de captura específicos.

Todos os reagentes e soluções foram preparados conforme especificado pelo fabricante. O primeiro passo do procedimento foi umidificar a membrana da placa de 96 poços fornecida pelo kit com 100 $\mu$ L/poço de Wash Buffer. Logo em seguida, o líquido foi removido num sistema à vácuo. Foram adicionados 25 $\mu$ L/poço da mistura de micropartículas diluídas (50 $\mu$ L de IL-1 $\beta$  + 50 $\mu$ L de CXCL8/IL-8 + 50 $\mu$ L de TNF- $\alpha$  + 50 $\mu$ L de IL-10) em 3mL de Microparticle diluent) em toda placa. Sobre a mistura de micropartículas, foram adicionados 100 $\mu$ L/poço das soluções da curva padrão ou amostras séricas de pacientes e controles diluídos em Calibrator Diluent RD6-40 na proporção 1:2, seguido de incubação por 3 horas a temperatura ambiente com agitação. Após esse período, a placa foi lavada 3 vezes em Wash Buffer. Em seguida, foram adicionados 50 $\mu$ L da solução Biotin Antibody Cocktail (50 $\mu$ L de IL-1 $\beta$  + 50 $\mu$ L de CXCL8/IL-8 + 50 $\mu$ L de TNF- $\alpha$  + 50 $\mu$ L de IL-10 Biotin antibody concentrate em 6mL de Biotin Antibody diluent 2) seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente com agitação. A placa foi lavada novamente 3 vezes em Wash Buffer e adicionados 50 $\mu$ L do reagente Streptavidin-PE por 30 minutos a temperatura ambiente com agitação. Após 3 lavagens, as micropartículas foram ressuspensas em 100 $\mu$ L/poço do tampão Wash buffer fornecido pelo kit e a leitura da placa foi

realizada no aparelho Luminex® Instrumentation System (Luminex, Austin, TX, USA). O aparelho Luminex® determina a propriedade espectral da microesfera e a quantidade de fluorescência associada ao PE e assim, a concentração das citocinas/quimiocina presentes nas amostras. A média de intensidade de fluorescência é medida pelo aparelho e as concentrações de citocinas foram calculadas em pg/ml. Utilizamos a Plataforma tecnológica do Programa de Desenvolvimento em Insumos para Saúde (PDTIS) (RPT03C- Luminex) da Fiocruz.

A quantificação das quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES e CX3CL1/Fractalcina foram realizadas pelos ensaios de ELISA. A tabela 4.1. mostra os valores de cada curva padrão, fabricantes e a diluição dos soros de pacientes e controles para dosagem das quimiocinas.

**Tabela 4.1. Especificações do kit de ELISA e diluição das amostras séricas de pacientes e controles.**

| Quimiocina        | Curva Padrão<br>pg/mL | Fabricante | Número do<br>catálogo | Diluição da<br>amostra<br>sérica |
|-------------------|-----------------------|------------|-----------------------|----------------------------------|
| CCL2/MCP-1        | 1.000-15,62           | Peptotech  | 900-M31               | 1:10                             |
| CXCL10/IP-10      | 1.000-15,62           | Peptotech  | 900-M39               | 1:10                             |
| CCL5/RANTES       | 2.000-31,25           | Peptotech  | 900-M33               | 1:100                            |
| CXCL3/Fractalcina | 10.000-156,25         | R&D System | DCX310                | 1:2                              |

Para os ensaios de ELISA, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 e CCL5/RANTES, foram adicionados 100µL do respectivo anticorpo de captura por poço em placas de 96 poços. As concentrações finais dos anticorpos de captura foram 0,25µg/mL para CCL2/MCP-1; 0,5µg/mL para CXCL10/IP-10 e 0,5µg/mL para CCL5/RANTES diluídos em PBS pH 7,2. As placas foram incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem (0,05% de Tween-20 em PBS pH 7,2). Posteriormente, foram adicionados 200µL por poço da solução de bloqueio (1% de BSA em PBS pH 7,4) e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas 4 vezes e foram adicionados 100µL dos respectivos padrões e amostras séricas e incubados *overnight* a 4°C. Os padrões foram diluídos em série conforme estabelecido pelo fornecedor (Tabela 4.1). Em seguida as placas foram lavadas 4 vezes e adicionado 100µL do anticorpo de detecção na concentração de

0,25µg/mL para CCL2/MCP-1; 0,5µg/mL para CXCL10/IP-10 e 0,5µg/mL para CCL5/RANTES, diluídos em reagente diluente (0,05% de Tween-20, 0,1% de BSA em PBS pH 7,4) e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente ao período de incubação foram realizadas 4 lavagens e adicionado 100µL da Streptavidin-HRP com incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas 4 vezes e adicionados 100µL do substrato ABTS. As placas foram protegidas da luz e monitoradas entre 5 a 30 minutos para finalizar a reação com adição de 50µL por poço de Stop solution. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 405/650nm.

No ensaio da quimiocina CX3CL1/Fractalcina da R&D System foram inicialmente adicionados 100uL/poço do padrão e amostras séricas (Tabela 6.1) ambos diluídos em Calibrator Diluent RD6-11 seguido de incubação por 3 horas a 4°C. As placas foram lavadas 4 vezes em Wash Buffer e adicionado 200µL de Fractalkine Conjugate com incubação de 1 hora a 4°C. Após uma nova sequencia de lavagens, foram adicionados 200µL do Substrat Solution. As placas foram protegidas da luz e monitoradas entre 5 a 30 minutos para finalizar a reação com adição de 50µL por poço do Stop Solution. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 450/540nm. Todas as soluções deste ensaio foram fornecidas pelo kit.

Os dados foram quantificados pela análise da curva obtida pela densidade óptica *versus* concentrações em pg/mL conhecidas do analito nos 8 pontos da curva padrão, utilizando análise de 4 parâmetros para as quimiocinas: CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 e CCL5/RANTES e 5 parâmetros para a quimiocina: CX3CL1/Fractalcina, feitos pelo Programa Prism 5 (GraphPad). Todas as proteínas circulantes quantificadas foram expressas em pg/mL.

#### **4.5. Manutenção das Culturas de Células Primárias HMVEC-d oriundas do Endotélio Microvascular da Derme (*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*)**

As HMVEC-d foram adquiridas na Lonza (Rochester, NY, USA) e constituem células primárias isoladas da microvasculatura do tecido epitelial de adultos ou do prepúcio de recém-nascidos. As ampolas contém  $5 \times 10^5$  células por mL, são fornecidas criopreservadas, na 3<sup>o</sup> passagem com laudos negativos para contaminação por micoplasmas, bactérias, leveduras ou fungos. Além disso, são sorologicamente negativas para os vírus HIV-1, hepatite B e C. As HMVEC-d foram



descongeladas seguindo protocolo do fabricante, no qual a ampola é rapidamente descongelada em banho Maria a 37 C° por no máximo 2 minutos. O congelamento é feito em pelo menos  $5 \times 10^5$  HMVEC-d, utilizando solução de congelamento (90% Soro fetal bovino e 10% DMSO). As células são inicialmente congeladas a -70°C por 24 horas e em seguida, nitrogênio líquido até sua utilização.

As HMVECs foram cultivadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup>, com filtro, em meio EGM-2MV (Endothelial Cell Growth Medium-2) com 10% de SFB (soro fetal bovino) e 1% de Glutamina. O meio EGM-2MV foi obtido mediante a suplementação do meio EBM-2 (*Endothelial Basal Medium*) com: rhFGF-B (*Human Fibroblast Growth Factor-B*), rhEGF (*Epidermal Growth Factor Human*), R<sup>3</sup>-IGF-1 (*Recomb. Long R Insulin-Like Growth Factor-1*), rhVEGF (*Endothelial Growth Factor Vascular Human*), hidrocortisona, ácido ascórbico, anfotericina B, gentamicina, penicilina e streptamicina. O meio e os suplementos são adquiridos na Lonza. As HMVEC-d são mantidas a 37°C, 90% de humidade e 5% CO<sub>2</sub>. Em geral, foi mantida a proporção  $1,25 \times 10^5$  HMVEC-d para cada garrafa de 25cm<sup>2</sup>. A cada 2 dias, o meio suplementado foi trocado por meio fresco. O volume de EGM-2MV utilizado respeitou as proporções fornecidas pela Lonza: 1mL de meio para 5cm<sup>2</sup> de área quando as células estiverem com menos de 25% de confluência, 1,5mL/5cm<sup>2</sup> para 25 a 45% de confluência e 2mL/5cm<sup>2</sup> para acima de 45% de confluência. Ao atingirem 80% de confluência, as HMVEC-d foram tripsinizadas para passagem, congelamento ou para os ensaios. A tripsinização ocorreu mediante rápida rinsagem com de 5mL de DPBS (Gibco), a temperatura ambiente, para neutralizar a ação de complexos protéicos e cálcio presentes no meio EGM-2MV, sobre a Tripsina/EDTA. Após esse processo, foram adicionadas 2mL de Tripsina/EDTA por garrafa e acompanhado o processo de descolamento da monocamada entre 2-6 minutos. Com cerca de 90% de células soltas, realiza-se rapidamente a neutralização da ação da Tripsina/EDTA com adição de 4mL de meio EGM-2MV suplementado com 10% de SFB e 1% de glutamina a 4°C. As células soltas em suspensão são transferidas para um tubo de 15mL, seguido de centrifugação por 1300rpm, 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células desfeito com batidas no tubo e diluição do pellet com 1mL de meio fresco. A contagem de células foi realizada em câmaras de Neubauer, utilizando-se o corante de viabilidade azul de Trypan na proporção 1:10. Os experimentos foram realizados com HMVEC-d entre a 4° a 8° passagem.

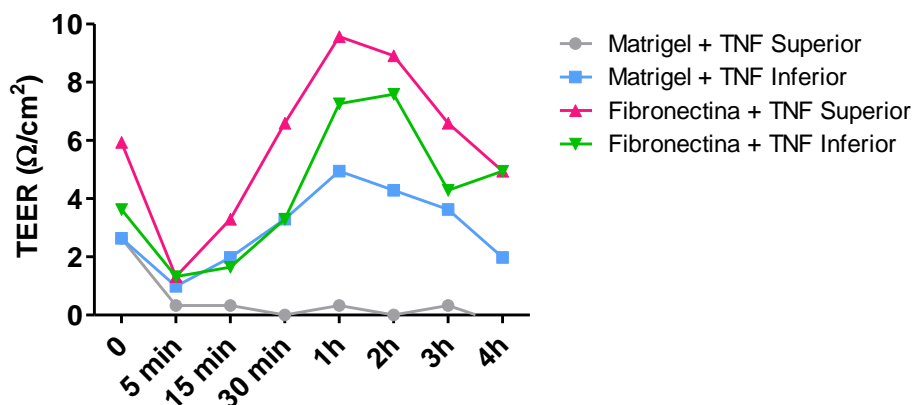
#### **4.6. Padronização do Ensaio de Permeabilidade através da Medida da Resistência Elétrica Transendotelial (TEER)**

O ensaio para medir a alteração da permeabilidade endotelial foi padronizado utilizando-se placas de 24 poços, acopladas a insertos Transwell revestidos de membrana de policarbonato de 3 $\mu$ m de porosidade e 0,33cm<sup>2</sup> de diâmetro (cat. 3457, Corning, NY, US). Procuramos estabelecer as condições de cultura, observando: esquema de plaqueamento, densidade de células HMVEC-d a serem plaqueadas, local da adição do estímulo: inserto ou câmara inferior, substrato do inserto: matrigel (cat.354248, BD Bioscience, Bedford, MA) ou fibronectina (cat.33016-015, Gibco, NY, US).

Diferentes metodologias foram realizadas quanto ao sistema de plaqueamento das HMVEC-d nos insertos. Inicialmente, realizamos um único plaqueamento de 2x10<sup>5</sup> HMVEC-d, mas a viabilidade das células após 24 horas de plaqueamento não foi satisfatória. Chegamos ao que consideramos a melhor condição de cultura baseado no estudo de Petreaca e sua equipe (95). Neste protocolo, no dia 1, 10<sup>5</sup> HMVEC-d em 100 $\mu$ L de meio EGM-2MV suplementado (com 10% soro fetal bovino (SBF) e 1% glutamina) foram plaqueadas no inserto (câmara superior) e incubadas por 30 min a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Seguido incubação, foram adicionados 100  $\mu$ L de EGM-2MV suplementado no inserto sobre as HMVEC-d e 1 mL de EGM-2MV suplementado na câmara inferior por 24 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, o meio EGM-2MV suplementado do inserto foi removido e sobre o inserto foram plaqueadas mais 10<sup>5</sup> HMVEC-d em 100 $\mu$ L de EGM-2MV suplementado por 30 min a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após esse curto período, foram adicionados 200 $\mu$ L de EGM-2MV suplementado no inserto e substituído o EGM-2MV suplementado na câmara inferior por 1 mL de meio fresco seguido por incubação por 24 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Esse esquema de plaqueamento resultou numa maior viabilidade e integridade da monocamada.

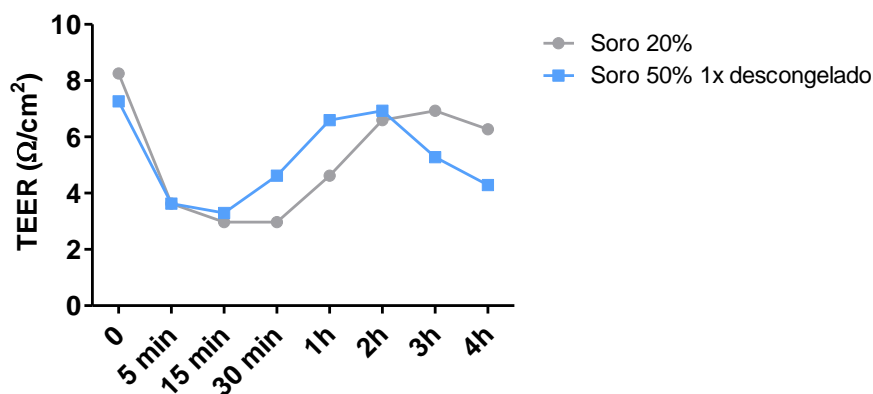
Utilizamos como controle positivo o TNF- $\alpha$  a 10<sup>4</sup> pg/mL (outras diluições foram testadas anteriormente) para avaliar a cinética da alteração da permeabilidade e a melhor condição de estimulação. O TNF- $\alpha$  foi adicionado no inserto ou na câmara inferior. Testamos também o revestimento do inserto com matrigel ou fibronectina. De acordo com nossos dados (Figura 4.1), estabelecemos que a adição do estímulo

no inserto e o pré-tratamento da membrana com fibronectina seriam as melhores condições.



**Figura 4.1. Padronização do ensaio de permeabilidade.** Símbolo e linha cinza representam inserto tratado com Matrigel e adição de TNF- $\alpha$  na câmara superior, símbolo e linha azul representam inserto tratado com Matrigel e adição de TNF- $\alpha$  na câmara inferior, símbolo e linha rosa representam inserto tratado com Fibronectina e adição de TNF- $\alpha$  na câmara superior e por fim, símbolo e linha verde representam inserto tratado com Fibronectina e adição de TNF- $\alpha$  na câmara inferior.

Após a padronização da densidade do cultivo das HMVEC-d, assim como o local de adição do estímulo e o revestimento, o segundo passo foi saber a diluição do soro dos pacientes requerida para avaliar a alteração da permeabilidade na monocamada de HMVEC-d e ainda, se poderíamos utilizar amostras de soro já descongeladas. Com isso, utilizamos como variáveis à utilização de soro de paciente 20% não descongelado ou de soro a 50% já descongelado (Figura 4.2). Esses valores foram baseados em ensaios preliminares em que medimos a liberação da enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH) quando na adição de 20% de soro de pacientes em monocamada da linhagem de células endoteliais HMEC.



**Figura 4.2. Padronização do ensaio de permeabilidade.** Símbolo e linha cinza representam inserto tratado com Fibronectina e adição de soro de paciente a 20% nunca descongelado. Em esquema semelhante, o símbolo e linha azul mas com adição de soro de paciente a 50% descongelado 1x .

As medidas do TEER foram realizadas com insertos pré-tratados com fibronectina, após 2 dias de cultivo consecutivos resultando numa densidade final de  $2 \times 10^5$  HMVEC-d em  $300\mu\text{L}$  de EGM-2MV no inserto do sistema Transwell e  $1\text{mL}$  de meio EGM-2MV na câmara inferior. No 3º dia de cultivo, o TEER foi medido para verificação da confluência. Foi considerado que uma confluência acima de 5, seria ideal para realização dos experimentos, uma vez que estaria garantindo a formação de uma monocamada íntegra. Medidas de TEER abaixo de 5, não garantiam um experimento confiável.

Após adição do estímulo ou soro de pacientes, foi realizada cinética para avaliação do TEER nos tempos: 0, 5, 15, 30 minutos e 1, 2, 3, 4 e 24 horas pela câmara Endohm 6 (World Precision, Saratoga, FL) e aparelho Millicell-ERS (Millipore, Billerica, MA). O valor detectado no aparelho é transformado utilizando a seguinte fórmula:

**Item 1.  $\text{TEER } (\Omega/\text{cm}^2) = \text{valor detectado da amostra} - \text{Blank (inserto com meio EGM-2MV, sem células)} \times 0,33\text{cm}^2$  (área do inserto).**

#### 4.6. Ensaio de Permeabilidade da Cultura das HMVEC-d na Presença de Soro de Pacientes Pré-tratados ou Não com Bloqueadores das Quimiocinas

Depois de padronizado o ensaio, iniciamos a medida do TEER na monocamada das HMVEC-d frente ao soro de pacientes. Uma vez que tínhamos disponível uma coorte de pacientes com apenas 2 casos graves e, considerando que a literatura aponta para mediadores inflamatórios como principais indutores da alteração da permeabilidade vascular, após dosagem desses mediadores nos pacientes infectados pelo DENV, partimos para análise da medida do TEER baseado em dois grupos de pacientes, cada um com n=5: Grupo 1, aquele composto de pacientes considerados alto produtores de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL8/IL-8 e Grupo 2, como os baixos produtores de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL8/IL-8, desconsiderando inicialmente a classificação clínica, dias de doença e produção de outros mediadores. Os soros de pacientes foram diluídos a 20% em meio EGM-2MV com 1% glutamina. A medida do TEER foi feita antes da adição do soro (tempo=0, monocamada de HMVEC em meio) ou com adição de soro seguindo a cinética estabelecida acima. Os valores de TEER foram calculados segundo a fórmula descrita no item 1. Os resultados finais foram expressos como % TEER relativo, no qual foi feito uma razão do valor do TEER detectado na amostra de soro sobre o valor do TEER no inserto contendo apenas o meio, ambas as medidas foram feitas no mesmo tempo.

$$\text{Item 2. TEER relativo} = \frac{\text{Valor do TEER da amostra de soro}}{\text{Valor do TEER no inserto com meio}}$$

Para avaliar se a contribuição das quimiocinas na alteração da permeabilidade, volume de 60 $\mu$ L de soro de pacientes foram diluídos em 234 $\mu$ L de EGM-2MV e pré-tratados com 6 $\mu$ L de anticorpos bloqueadores anti-quimiocinas: CCL4/MIP-1 $\beta$  (cat. MAB271), CCL5/RANTES (cat. MAB678), CXCL10/IP-10 (cat. MAB266), CX3CL1/Fractalcina (cat. MAB3652) (R&D System, Inc, Minneapolis, MN, USA) ou IgG (cat. 400124, BioLegend, San Diego, CA) a 10ng/mL durante 30 minutos a 37°C. Após incubação, 300 $\mu$ L, do soro pré-tratado, diluído em EGM-2MV, foram adicionados sobre a monocamada de HMVEC-d no inserto. Os valores de TEER foram calculados segundo a fórmula descrita no item 2.

## 4.7. Análise Estatística

Diferenças entre os grupos de pacientes e controles com relação aos dados demográficos, laboratoriais e clínicos foram feitas pelo teste t não-paramétrico Mann-Whitney U e as análises de correlação pelo Spearman. Em relação à quantificação dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas, utilizamos o teste t não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Usamos o programa The Prism 5 statistics (GraphPad, US).

## 5. Resultados

### 5.1. Perfis Demográfico, Clínico e Laboratorial de Pacientes e Controles

Dos 267 pacientes com suspeita de dengue nos quais foram coletadas amostras de sangue na epidemia de 2013, 181 pacientes (67,8%) tiveram diagnóstico laboratorial confirmado para dengue. Dentre estes 50,3% dos pacientes (91 dos 181) tiveram confirmação pelo anti-DENV IgM, enquanto que 40,9% (74 dos 181) confirmaram pelo NS1 circulante, após modificações no protocolo como mencionado no item 4.3. Materiais e Métodos. Destacamos prevalência do sorotipo DENV-4 (96,8%, 61 das 63 amostras) nesta epidemia.

A classificação dos pacientes foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial de Saúde (TDR/OMS, 2009). O primeiro grupo foi constituído por 125 pacientes com características da Febre do Dengue sem sinais de alarme (FD), por apresentarem febre, cefaleia, dor na região retro orbital, mialgia, artralgia, anorexia, náuseas e leucopenia. O segundo grupo foi formado por 54 pacientes FD com sinais de alarme (FDSA) mais 2 casos graves, formando um único grupo (FDSA/Grave). Os pacientes FDSA apresentaram todos os sinais/sintomas da FD mais dores abdominais e/ou vômitos persistentes, sangramento de mucosa e plaquetopenia. Os pacientes graves apresentaram além dos sinais/sintomas mencionados, níveis elevados das enzimas AST/TGO (aspartato aminotransferase/ transaminase glutâmico-oxalacética) e ALT/TGP (alanina aminotransferase/ transaminase glutâmico-pirúvica), um dos pacientes apresentou complicações do sistema nervoso acarretando na síndrome de Guillain-Barré e o segundo paciente apresentou quadro de hepatite com níveis muito altos de AST/TGO e ALT/TGP. Ambos os pacientes graves apresentaram sinais de extravasamento plasmático com acúmulo de líquidos na região abdominal (ascite). Dezoito dos 56 pacientes FDSA/Grave (32%) exibiram algum tipo de manifestação hemorrágica do tipo epistaxe, gengivorragia, hematúria, melena, metrorragia e/ou petéquias. Os resultados descritos a seguir são apresentados na Tabela 5.1.

Dentre estes pacientes, tivemos um percentual de 54,4% do sexo feminino e 45,6% do sexo masculino no grupo FD e 62,5% do sexo feminino e 37,5% do sexo masculino no grupo FDSA/Grave, portanto, uma maior incidência do sexo feminino no grupo FDSA/Grave. Em relação aos dias de doença, contados a partir dos primeiros sinais/sintomas apresentados pelos pacientes, observamos diferença entre o grupo FD, com média de 4,8 dias, e o grupo FDSA/Grave ( $p=0,0002$ ), que teve média de 6,8 dias.

A plaquetopenia é, dentre as alterações hematológicas na infecção pelo DENV, uma das mais frequentes. Verificou-se diferença na contagem de plaquetas entre os grupos FD e controles sadios ( $p=0,0005$ ), FDSA/Grave e controle sadios ( $p=0,0001$ ) e entre os grupos FD e FDSA/Grave ( $p=0,0093$ ). Tendo o grupo FDSA/Grave constatado menor número de plaquetas durante a infecção, o que confirma a trombocitopenia como um quadro de evolução de gravidade da dengue.

Na dengue, são frequentemente encontradas alterações como leucopenia, neutropenia com presença de linfócitos atípicos, além, claro da trombocitopenia com valores abaixo de 100.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  e aumento do hematócrito. Também pode ocorrer leucocitose precoce e neutrofilia com discreto desvio à esquerda. Em nossa coorte de pacientes, não foram observadas diferenças no percentual de hematócrito, nem nas dosagens das AST/TGO e ALT/TGP entre os grupos FD e FDSA/Grave. É importante ressaltar que por medida preventiva, pacientes FDSA/Grave são rapidamente submetidos à hidratação venosa, portanto, reduzindo a hemoconcentração desses pacientes. Ainda, um dos 2 pacientes graves apresentou níveis muito elevados de AST/TGO=1235 U/L e ALT/TGP=1345 U/L.

Comparando-se os grupos FD e FDSA/Grave, pacientes FDSA/Grave apresentaram leucopenia ( $p=0,0151$ ), tendência a linfopenia e monocitopenia ( $p=0,0054$ ). Todas essas alterações foram ainda mais acentuadas quando comparados os grupos de pacientes DENV+ aos controles.



**Tabela 5.1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes e controles envolvidos no estudo.**

|   | <b>FD</b><br>n=125  | <b>FDSA/Grave</b><br>n=56                                     | <b>Controles Sadios</b><br>n=10                                   |
|---|---|---|---|
| <b>Sexo (Fem/Masc)</b>  | 68/57   | 35/21   | 7/3   |
| <b>Idade (anos) <sup>a</sup></b>                              | 37 ± 14,6 <sup>n=125</sup>                                    | 38,3 ± 18,6 <sup>n=56</sup>                                   | 31,8 ± 4,8 <sup>n=10</sup>  |
| <b>Dias de doença <sup>a, b</sup></b>                         | 4,8 ± 2,8 <sup>n=125 ###</sup>                                | 6,2 ± 2,8 <sup>n=55 ###</sup>                                 | --  |
| <b>Extravasamento Plasmático <sup>c, d</sup></b>              | 0/125; 0  | 2/56; 3,6%  | --  |
| <b>Sangramentos <sup>d, e</sup></b>                           | 0/125; 0  | 18/56; 32%  | --  |
| <b>Plaquetas x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> <sup>a</sup></b> | 169,8 ± 61,3 <sup>##, ***</sup><br>(64 - 387) <sup>n=84</sup> | 129,6 ± 64,3 <sup>##, φφφ</sup><br>(29 - 230) <sup>n=30</sup> | 278,2 ± 38,8 <sup>***, φφφ</sup><br>(242 - 305) <sup>n=6</sup>    |
| <b>Hematócrito % <sup>a</sup></b>                             | 42 ± 4,2<br>(25,8 - 54) <sup>n=111</sup>                      | 43 ± 4,4<br>(32,9 - 53,4) <sup>n=53</sup>                     | 40,3 ± 2,7<br>(37,6 - 44) <sup>n=6</sup>                          |
| <b>AST/TGO U/L <sup>a</sup></b>                               | 72,4 ± 53,4<br>(2 - 181) <sup>n=14</sup>                      | 266,9 ± 406,8<br>(50 - 1235) <sup>n=8</sup>                   | --  |
| <b>ALT/TGP U/L <sup>a</sup></b>                               | 112,7 ± 64,8<br>(35 - 220) <sup>n=15</sup>                    | 266,9 ± 440,4<br>(43 - 1345) <sup>n=8</sup>                   | --  |
| <b>Leucócitos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> <sup>a</sup></b> | 4534 ± 2387 <sup>#, *</sup><br>(1880-17100) <sup>n=111</sup>  | 3532 ± 1540 <sup>#</sup><br>(1000 - 7590) <sup>n=53</sup>     | 6552 ± 1092 <sup>*, φφφ</sup><br>(5300 - 7800) <sup>n=6</sup>     |
| <b>Linfócitos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> <sup>a</sup></b> | 1478 ± 1143 <sup>***</sup><br>(206 - 10260) <sup>n=106</sup>  | 1156 ± 571,1 <sup>φφφ</sup><br>(336 - 2272) <sup>n=50</sup>   | 5113 ± 1713,9 <sup>***, φφφ</sup><br>(2106 - 6100) <sup>n=5</sup> |
| <b>Monócitos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> <sup>a</sup></b>  | 490,7 ± 298,4 <sup>##</sup><br>(88 - 2394) <sup>n=106</sup>   | 380 ± 281,7 <sup>##</sup><br>(34 - 1530) <sup>n=48</sup>      | 396,3 ± 136,7<br>(304 - 640) <sup>n=6</sup>                       |
| <b>Anti-Dengue IgM <sup>b</sup></b>                           | 51/125; 40,8%   | 40/56; 71,4%  | --  |
| <b>NS1 Plasmático <sup>b</sup></b>                            | 54/125; 43,2%   | 20/56; 35,7%  | --  |
| <b>DENV-1: DENV-2: DENV-4</b>                                 | 1: 0: 51  | 0: 1: 10  | --  |

<sup>a</sup> valores das médias ± desvio padrão;

<sup>b</sup> Dias de doença, contados a partir do aparecimento dos primeiros sintomas;

<sup>c</sup> Ascite;

<sup>d</sup> n positivos / n total; % de positivos;

<sup>e</sup> Gengivorragia, petéquias, metrorragia, hematúria, epistaxe e melena;

Teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, três símbolos representam P<0,0001; dois símbolos P<0,0010 e um símbolo P<0,0500;

\* representa diferença estatística entre FD vs Controle Sadio;

φ representa diferença estatística entre FDSA/Grave vs Controle Sadio;

# representa diferença estatística entre FD vs FDSA/Grave

## 5.2. Correlação entre Parâmetros Laboratoriais em Pacientes Infectados pelo DENV

Visando ressaltar parâmetros relacionados ao desfecho clínico dos pacientes e a relação entre eles, realizamos análise de correlação entre os parâmetros laboratoriais disponíveis. Como observado na Tabela 5.2, listamos inicialmente as correlações entre a contagem de plaquetas com: (i) dias de doença ( $r = -0,208$ ,  $p = 0,0268$ ), (ii) ALT/TGP ( $r = -0,298$ ,  $p = 0,0048$ ), (iii) AST/TGO ( $r = -0,389$ ,  $p = 0,0002$ ), (iv) contagem de leucócitos ( $r = +0,324$ ,  $p = 0,0005$ ), (v) percentual de hematócrito ( $r = +0,204$ ,  $p = 0,0304$ ) e (vi) contagem de monócitos ( $r = +0,254$ ,  $p = 0,0081$ ). Como esperado, (vii) AST/TGO e ALT/TGP foram fortemente correlacionadas ( $r = +0,733$ ,  $p < 0,0001$ ). Entre as células sanguíneas, os leucócitos foram correlacionados com (viii) linfócitos ( $r = +0,564$ ,  $p < 0,0001$ ) e (ix) monócitos ( $r = +0,693$ ,  $p < 0,0001$ ). Ainda, (x) monócitos e linfócitos foram correlacionados ( $r = +0,472$ ,  $p < 0,0001$ ).

Esses dados de correlação nos indicam que dias de doença, contagem de plaquetas e as dosagens de AST/TGO e ALT/TGP são parâmetros fortemente correlacionados, assim como as células mononucleares do sangue. Portanto, são importantes parâmetros no prognóstico da doença e serão posteriormente correlacionados as citocinas/quimiocinas circulantes em pacientes.

**Tabela 5.2. Correlação entre os dados laboratoriais de pacientes Infectados pelo DENV**

|                       | Dias de Doença                 | Plaquetas                      | Hematócrito                    | AST/TGO                       | ALT/TGP                       | Leucócitos                     | Linfócitos                    | Monócitos                     |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>Dias de doença</b> | --                             | r(-)0,208<br>p=0,0268<br>n=113 | ns <sup>n=163</sup>            | ns <sup>n=87</sup>            | ns <sup>n=87</sup>            | ns <sup>n=163</sup>            | ns <sup>n=163</sup>           | ns <sup>n=153</sup>           |
| <b>Plaquetas</b>      | r(-)0,208<br>p=0,0268<br>n=113 | --                             | r(-)0,204<br>p=0,0304<br>n=112 | r(-)0,389<br>p=0,0002<br>n=88 | r(-)0,298<br>p=0,0048<br>n=88 | r(+),324<br>p= 0,0005<br>n=112 | ns <sup>n=106</sup>           | r(+),254<br>p=0,0081<br>n=107 |
| <b>Hematócrito</b>    | ns <sup>n=163</sup>            | r(-)0,204<br>p=0,0304<br>n=112 | --                             | ns <sup>n=87</sup>            | ns <sup>n=87</sup>            | ns <sup>n=164</sup>            | ns <sup>n=156</sup>           | ns <sup>n=154</sup>           |
| <b>AST/TGO</b>        | ns <sup>n=87</sup>             | r(-)0,389<br>p=0,0002<br>n=88  | ns <sup>n=87</sup>             | --                            | r(+),733<br>p<0.0001<br>n=88  | ns <sup>n=87</sup>             | ns <sup>n=82</sup>            | ns <sup>n=82</sup>            |
| <b>ALT/TGP</b>        | ns <sup>n=87</sup>             | r(-)0,298<br>p=0,0048<br>n=88  | ns <sup>n=87</sup>             | r(+),733<br>p<0.0001<br>n=88  | --                            | ns <sup>n=87</sup>             | ns <sup>n=82</sup>            | ns <sup>n=82</sup>            |
| <b>Leucócitos</b>     | ns <sup>n=163</sup>            | r(+),324<br>p=0,0005<br>n=112  | ns <sup>n=164</sup>            | ns <sup>n=87</sup>            | ns <sup>n=87</sup>            | --                             | r(+),564<br>p<0.0001<br>n=156 | r(+),693<br>p<0.0001<br>n=154 |
| <b>Linfócitos</b>     | ns <sup>n=163</sup>            | ns <sup>n=106</sup>            | ns <sup>n=156</sup>            | ns <sup>n=82</sup>            | ns <sup>n=82</sup>            | r(+),564<br>p<0.0001<br>n=156  | --                            | r(+),472<br>p<0.0001<br>n=153 |
| <b>Monócitos</b>      | ns <sup>n=153</sup>            | r(+),254<br>p=0,0081<br>n=107  | ns <sup>n=154</sup>            | ns <sup>n=82</sup>            | ns <sup>n=82</sup>            | r(+),693<br>p<0.0001<br>n=154  | r(+),472<br>p<0.0001<br>n=153 | --                            |

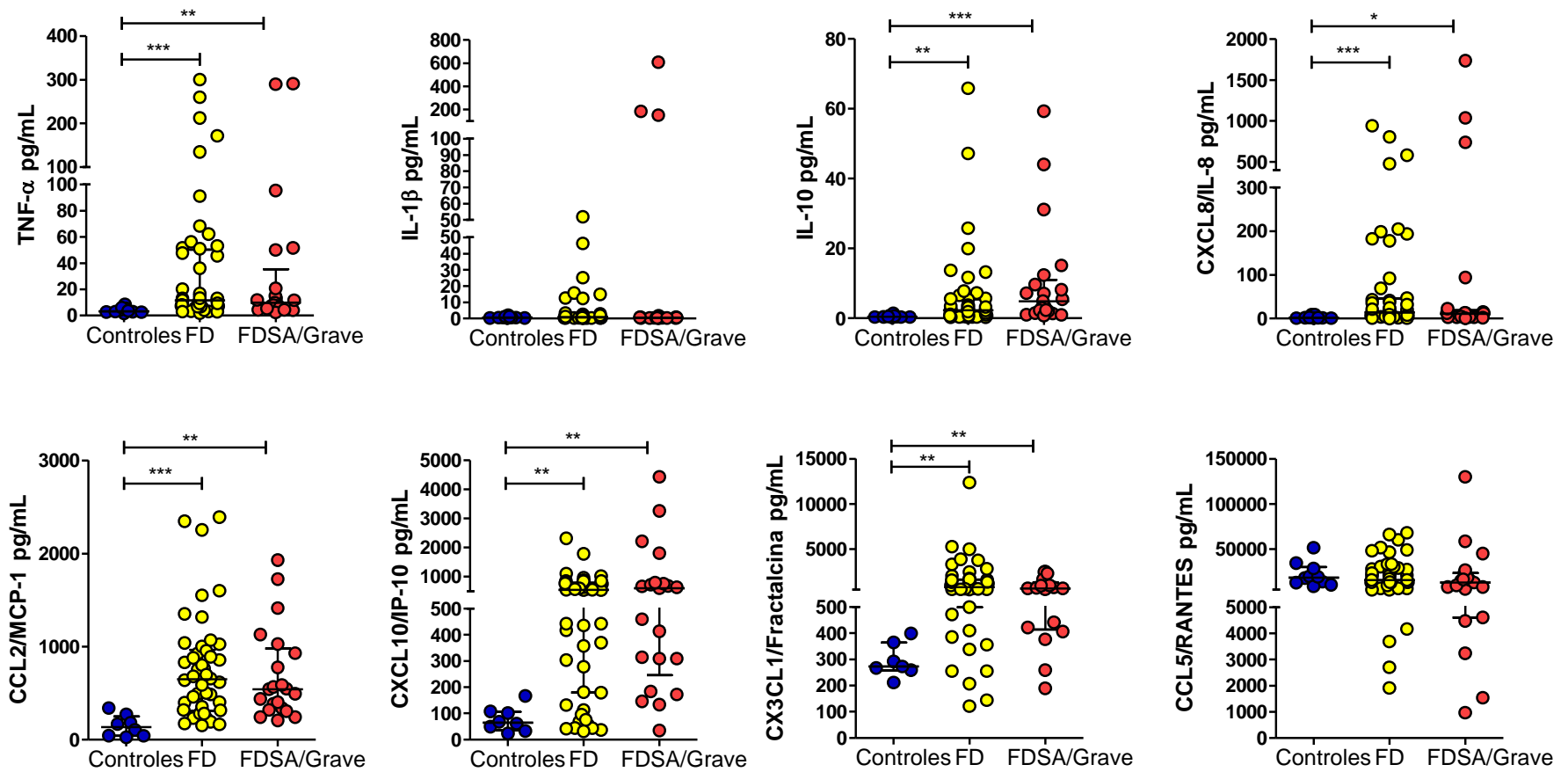
Correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism versão 5. Valores de p (two-tailed) foram considerados significativos quando < 0,05. O ns significa correlação não significativa, n representa o número de pares analisados. Plaquetas são expressas em células/mm<sup>3</sup>; hematócrito em %; AST/TGO e ALT/TGP em U/L; leucócitos, linfócitos e monócitos por células/mm<sup>3</sup>.

### **5.3. Avaliação do Perfil das Citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 e Quimiocinas: CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 e CX3CL1/Fractalcina em Pacientes Infectados pelo DENV e Controles**

Como demonstrado na Figura 5.1, independente do quadro clínico, pacientes FD ou FDSA/Grave apresentaram aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  em relação aos controles (controles 3,380 [2,727-5,756] vs FD 11,500 [7,082-50,230] vs FDSA/Grave 9,796 [5,975-35,450], no qual temos mediana [25-75%]). Não detectamos diferença entre os níveis de IL-1 $\beta$  entre os grupos de pacientes e controles (controles 0,5200 [0,288-1,217] vs FD 0,8200 [0,4235-0,3370] vs FDSA/Grave 0,4760 [2,167-609,2]). Por fim, a citocina IL-10 teve um perfil similar ao do TNF- $\alpha$  nos quais pacientes FD ou FDSA/Grave apresentaram aumento significativo em relação aos controles (controles 0,4600 [0,3480-0,6805] vs FD 2,311 [0,6790-5,540] vs FDSA/Grave 4,908 [1,787-11,010]).

A Figura 5.1 demonstra a quantificação das quimiocinas. Iniciamos pela CXCL8/IL-8 que demonstrou níveis aumentados em ambos os grupos de pacientes FD ou FDSA/Grave comparado aos controles (controles 1,945 [1,270-4,549] vs FD 13,960 [6,360-45,99] vs FDSA/Grave 11,01 [3,652-19,090]). A CCL2/MCP-1 (controles 136,7 [42,43-339,8] vs FD 648,1 [966,0-2390,0] vs FDSA/Grave 543,3 [329,6-979,6]), a CXCL10/IP-10 (controles 64,34 [36,53-166,2] vs FD 548,4 [179,5-790,2] vs FDSA/Grave 601,0 [246,3-779,3]) e a CX3CL1/Fractalcina (controles 272,7 [259,0-365,1] vs FD 784,9 [499,5-1620,0] vs FDSA/Grave 641,1 [414,1-1300,0]) também apresentaram o mesmo perfil de aumento nos pacientes, independente da gravidade, comparado aos controles. Entretanto, não detectamos diferença entre os níveis de CCL5/RANTES entre os grupos de pacientes e controles (controles 18675 [12215-30282] vs FD 15943 [9752-30261] vs FDSA/Grave 13109 [4612-23505]), embora podemos observar uma tendência decrescente das medianas dos controles, FD e FDSA/Grave em relação a esta quimiocina.

A influência desses mediadores inflamatórios na imunopatogênese da dengue, assim como na alteração da permeabilidade endotelial serão avaliados nos ensaios a seguir.



**Figura 5.1. Níveis séricos de citocinas e quimiocinas em pacientes infectados pelo DENV e controles.** Gráficos representam as medianas e os intervalos interquartéis (25 – 75%) dos níveis séricos (em pg/mL) das citocinas (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$  e (C) IL-10 e das quimiocinas (D) CXCL8/IL-8, (E) CCL2/MCP-1, (F) CCL5/RANTES, (G) CXCL10/IP-10 e (H) CX3CL1/Fractalcina em pacientes-FD (n=48, ●), FDSA/Grave (n=21, ●) e Controles saudáveis (n=10, ●). As dosagens foram feitas pelos ensaios Luminex ou ELISA. Na análise estatística foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do post test Dunn para análise dos pares. Valores de p \*p<0.05, \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 foram considerados estatisticamente significativos.

#### 5.4. Correlação das Citocinas e Quimiocinas em pacientes infectados pelo DENV

Compreendendo a importância do envolvimento desses mediadores no quadro infeccioso, nosso próximo passo foi avaliar se essas moléculas estão atuando de forma conjunta ou não, e se for de forma conjunta, de modo sinérgico ou regulador na infecção pelo DENV. Para isso, realizamos análises de correlação como observado na Tabela 5.3. Listamos as correlações entre TNF- $\alpha$  com: (i) IL-1 $\beta$  ( $r= +0,616$ ,  $p<0,0001$ ) e (ii) CXCL8/IL-8 ( $r= +0,649$ ,  $p<0,0001$ ). Mesmo não observando diferença dos níveis de IL-1 $\beta$  entre pacientes e controles, esta citocina foi correlacionada com: (iii) CXCL8/IL-8 ( $r= +0,723$ ,  $p<0,0001$ ). A CCL2/MCP-1 foi correlacionada com: (iv) CXCL10/IP-10 ( $r= +0,651$ ,  $p<0,0001$ ) e (v) CX3CL1/Fractalcina ( $r= +0,646$ ,  $p<0,0001$ ). A CXCL10/IP-10 foi correlacionada com: (vi) IL-10 ( $r= +0,495$ ,  $p<0,0001$ ), (vii) CCL2/MCP-1 ( $r= +0,651$ ,  $p<0,0001$ ) e (viii) CX3CL1/Fractalcina ( $r= +0,524$ ,  $p<0,0001$ ). Por fim, CCL5/RANTES correlacionou-se com: (ix) IL-1 $\beta$  ( $r= +0,418$ ,  $p=0,0004$ ) e (x) IL-10 ( $r= -0,380$ ,  $p=0,0015$ ).

**Tabela 5.3. Correlação das Citocinas e Quimiocinas Sérica em Pacientes Infectados pelo DENV**

|                            | TNF- $\alpha$                  | IL-1 $\beta$                   | IL-10                          | CXCL8/<br>IL-8                 | CCL2/<br>MCP-1                 | CCL5<br>/RANTES                | CXCL10/<br>IP-10               | CX3CL1<br>/Fractalci<br>na     |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| TNF- $\alpha$              | --                             | r(+),0,616<br>p<0,0001<br>n=69 | ns <sup>n=69</sup>             | r(+),0,649<br>p<0,0001<br>n=69 | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=69</sup>             | ns <sup>n=60</sup>             |
| IL-1 $\beta$               | r(+),0,616<br>p<0,0001<br>n=69 | --                             | ns <sup>n=69</sup>             | r(+),0,723<br>p<0,0001<br>n=69 | ns <sup>n=67</sup>             | r(+),0,418<br>p=0,0004<br>n=67 | ns <sup>n=69</sup>             | ns <sup>n=60</sup>             |
| IL-10                      | ns <sup>n=69</sup>             | ns <sup>n=69</sup>             | --                             | ns <sup>n=69</sup>             | ns <sup>n=67</sup>             | r(-),0,380<br>p=0,0015<br>n=67 | r(+),0,495<br>p<0,0001<br>n=69 | ns <sup>n=60</sup>             |
| CXCL8<br>/IL-8             | r(+),0,649<br>p<0,0001<br>n=69 | r(+),0,723<br>p<0,0001<br>n=69 | ns <sup>n=69</sup>             | --                             | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=69</sup>             | ns <sup>n=60</sup>             |
| CCL2<br>/MCP-1             | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=67</sup>             | --                             | ns <sup>n=65</sup>             | r(+),0,651<br>p<0,0001<br>n=67 | r(+),0,646<br>p<0,0001<br>n=58 |
| CCL5<br>/RANTES            | ns <sup>n=67</sup>             |                                | r(-),0,380<br>p=0,0015<br>n=67 | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=65</sup>             | --                             | ns <sup>n=67</sup>             | ns <sup>n=58</sup>             |
| CXCL10<br>/IP10            | ns <sup>n=69</sup>             | ns <sup>n=69</sup>             | r(+),0,495<br>p<0,0001<br>n=69 | --                             | r(+),0,651<br>p<0,0001<br>n=67 | ns <sup>n=67</sup>             | --                             | r(+),0,524<br>p<0,0001<br>n=60 |
| CX3CL1<br>/Fractalci<br>na | ns <sup>n=60</sup>             | ns <sup>n=60</sup>             | ns <sup>n=60</sup>             | ns <sup>n=60</sup>             | r(+),0,646<br>p<0,0001<br>n=58 | ns <sup>n=58</sup>             | r(+),0,524<br>p<0,0001<br>n=60 | --                             |

Correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism versão 5. Valores de p (two-tailed) foram considerados significativos quando < 0,05. O ns significa correlação não significativa, n representa o número de pares analisados. Valores das citocinas e quimiocinas são expressos em pg/mL.

## 5.5. Correlação entre as Citocinas/Quimiocinas com Parâmetros Laboratoriais em Pacientes Infectados pelo DENV

Na tentativa de avaliar o potencial papel dessas moléculas como indicadores biológicos das alterações clínicas e laboratoriais dos pacientes, parâmetros laboratoriais previamente selecionados como indicadores do desfecho clínico, que foram dias de doença, contagem de plaquetas, níveis das AST/TGO e ALT/TGP e número de células do sangue, foram correlacionados aos níveis séricos das citocinas e quimiocinas.

Na Tabela 5.4 verificamos correlação inversa entre os dias de doença com: (i) CCL2/MCP-1 ( $r = -0,382$ ,  $p = 0,0023$ ), (ii) CXCL10/IP-10 ( $r = -0,274$ ,  $p = 0,0298$ ) e (iii) CX3CL1/Fractalcina ( $r = -0,576$ ,  $p < 0,0001$ ). Plaquetas também foram correlacionadas negativamente com (iv) IL-10 ( $r = -0,381$ ,  $p = 0,0116$ ) e (v) CXCL10/IP-10 ( $r = -0,305$ ,  $p = 0,0460$ ). Enquanto os níveis de AST/TGO foram correlacionados positivamente com (vi) CCL5/RANTES ( $r = 0,384$ ,  $p = 0,0298$ ). ALT/TGP foi correlacionado com TNF- $\alpha$  ( $r = +0,364$ ,  $p = 0,0370$ ). Por fim, leucócitos foram correlacionados com: (vii) IL-10 ( $r = -0,477$ ,  $p = 0,0002$ ), (viii) CCL5/RANTES ( $r = +0,286$ ,  $p = 0,0308$ ) e (ix) CXCL10/IP-10 ( $r = -0,300$ ,  $p = 0,0217$ ). No caso dos linfócitos, encontramos correlação negativa entre: (x) IL-10 ( $r = -0,486$ ,  $p = 0,0004$ ), (xi) CCL2/MCP-1 ( $r = -0,395$ ,  $p = 0,0028$ ) e CX3CL1/Fractalcina ( $r = -0,486$ ,  $p = 0,0004$ ), mas, positiva com CCL5/RANTES ( $r = +0,381$ ,  $p = 0,0037$ ). Por fim, monócitos foram correlacionados inversamente com: IL-10 ( $r = -0,511$ ,  $p < 0,0001$ ) e CXCL10/IP-10 ( $r = -0,279$ ,  $p = 0,0409$ ). Não detectamos alguma correlação com CXCL8/IL-8 nem com a IL-1 $\beta$ .

Como visto, esses mediadores parecem estar relacionados tanto aos parâmetros laboratoriais como com a frequência de diferentes subpopulações celulares. Nosso próximo passo é avaliá-los segundo potencial efeito destes na alteração da permeabilidade endotelial.



**Tabela 5.4. Correlação entre as citocinas/quimiocinas com parâmetros clínico-laboratoriais nos pacientes infectados pelo DENV**

|                       | TNF- $\alpha$                          | IL-10                                 | CCL2/<br>MCP-1                        | CCL5/<br>RANTES                        | CXCL10/<br>IP-10                      | CX3CL1/<br>Fractalcina                |
|-----------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Dias de Doença</b> | ns <sup>n=63</sup>                     | ns <sup>n=63</sup>                    | r(-)0,382<br>p=0,0023 <sup>n=61</sup> | ns <sup>n=62</sup>                     | r(-)0,274<br>p=0,0298 <sup>n=63</sup> | r(-)0,576<br>p<0,0001 <sup>n=54</sup> |
| <b>Plaquetas</b>      | ns <sup>n=43</sup>                     | r(-)0,381<br>p=0,0116 <sup>n=43</sup> | ns <sup>n=41</sup>                    | ns <sup>n=43</sup>                     | r(-)0,305<br>p=0,0460 <sup>n=43</sup> | ns <sup>n=38</sup>                    |
| <b>AST/TGO</b>        | ns <sup>n=33</sup>                     | ns <sup>n=33</sup>                    | ns <sup>n=33</sup>                    | r(+ )0,384<br>p=0,0298 <sup>n=32</sup> | ns <sup>n=33</sup>                    | ns <sup>n=28</sup>                    |
| <b>ALT/TGP</b>        | r(+ )0,364<br>p=0,0370 <sup>n=33</sup> | ns <sup>n=33</sup>                    | ns <sup>n=33</sup>                    | ns <sup>n=32</sup>                     | ns <sup>n=33</sup>                    | ns <sup>n=28</sup>                    |
| <b>Leucócitos</b>     | ns <sup>n=58</sup>                     | r(-)0,477<br>p=0,0002 <sup>n=58</sup> | ns <sup>n=56</sup>                    | r(+ )0,286<br>p=0,0308 <sup>n=57</sup> | r(-)0,300<br>p=0,0217 <sup>n=58</sup> | ns <sup>n=50</sup>                    |
| <b>Linfócitos</b>     | ns <sup>n=57</sup>                     | r(-)0,434<br>p=0,0007 <sup>n=57</sup> | r(-)0,395<br>p=0,0028 <sup>n=55</sup> | r(+ )0,381<br>p=0,0037 <sup>n=56</sup> | ns <sup>n=57</sup>                    | r(-)0,486<br>p=0,0004 <sup>n=49</sup> |
| <b>Monócitos</b>      | ns <sup>n=54</sup>                     | r(-)0,511<br>p<0,0001 <sup>n=54</sup> | ns <sup>n=52</sup>                    | ns <sup>n=54</sup>                     | r(-)0,279<br>p=0,0409 <sup>n=54</sup> | ns <sup>n=46</sup>                    |

Correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism versão 5. Valores de p (two-tailed) foram considerados significativos quando < 0,05. O ns significa correlação não significativa, n representa o número de pares analisados.

## 5.6. Medida da Resistência Elétrica Transendotelial (TEER) em Monocamada de Células Endoteliais HMVEC-d na Presença de Soro de Pacientes Infectados pelo DENV

Além do envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na indução da permeabilidade endotelial, estudos demonstraram efeito de CXCL8/IL-8 e CCL2/MCP-1 na alteração da permeabilidade transendotelial de linhagens humanas de células endoteliais, através da modulação das junções *tight* e do citoesqueleto das células (86, 87).

Uma vez que citocinas e quimiocinas estão presentes no soro de pacientes, o efeito destes mediadores foi diretamente observado em monocamadas de células endoteliais primárias, as HMVEC-d, quando em contato com as amostras séricas de pacientes. Nós estabelecemos inicialmente uma forma de análise do TEER baseado no quanto das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e da quimiocina CXCL8/IL-8 cada paciente tem, agrupando-os em dois grupos: Grupo 1 caracterizados como os altos

produtores dessas citocinas e o Grupo 2, baixos produtores das citocinas (Tabela 5.5). Dos 10 pacientes avaliados nesta análise, apenas o IMA11 era infecção primária, os demais pacientes eram infecção secundária.

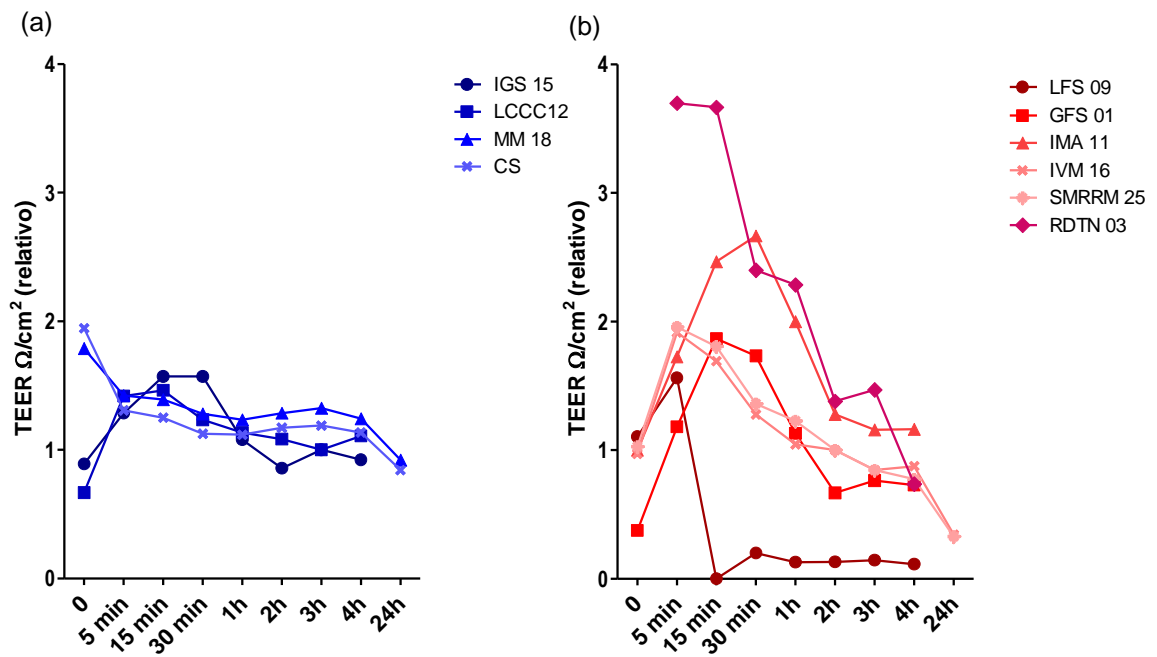
De forma surpreendente, 4 pacientes que não apresentaram alguma alteração da TEER durante a cinética, 2 deles eram do Grupo 1 e outros 2 do Grupo 2, indicando que os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL8/IL-8 tem pouca interferência na alteração do TEER em nossos ensaios. Seis pacientes apresentaram diminuição do % TEER relativo em algum momento da cinética, sem recuperação. Neste caso encontra-se o paciente LFS08 que diminuiu rapidamente o TEER da monocamada de HMEVC-d já nos 5 minutos de adição do soro, sem recuperação. De forma similar, o paciente IVM16 apresentou uma diminuição do TEER nos 5 minutos, mas com um decaimento bem menos acentuado que o LFS08. Entre 15 a 30 minutos, os pacientes GFS01, IMA11, SMMRM25 e RDTN03 diminuíram o % TEER relativo (Figura 5.2).

Com isso acreditamos que no nosso modelo in vitro de estudo, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL8/IL-8 presentes no soro de pacientes não foram condições efetivas para diminuição do TEER, mas que provavelmente as quimiocinas séricas poderiam estar exercendo algum tipo de alteração da monocamada das células endoteliais HMVECs.

**Tabela 5.5. Características dos pacientes infectados pelo DENV para análise do TEER.**

|                 | TNF- $\alpha$ | IL-1 $\beta$  | IL-10        | CXCL8/<br>IL-8 | CCL2/<br>MCP-1 | CXCL10/<br>IP-10 | CX3CL1/<br>Fractalcina | CCL5/<br>RANTES | Forma<br>clínica | Dias de<br>doença |
|-----------------|---------------|---------------|--------------|----------------|----------------|------------------|------------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| <b>Grupo 1</b>  |               |               |              |                |                |                  |                        |                 |                  |                   |
| <b>IGS15</b>    | 212,74        | 51,83         | 2,73         | 476,1          | 1551,18        | 832,58           | 2816,2                 | 20606,93        | FD               | 2                 |
| <b>IVM16</b>    | 260,16        | 15,61         | 1,09         | 942,31         | 164,77         | 94,94            | 144,01                 | 25070,58        | FD               | 2                 |
| <b>MM18</b>     | 45,70         | 1,60          | 1,19         | 32,05          | 954,21         | 534,17           | 1333,08                | 12646,16        | FD               | 5                 |
| <b>SHRMM25</b>  | 95,41         | 609,19        | 2,38         | 740,11         | 403,45         | 36,9             | 936,44                 | 7734,19         | Grave            | 18                |
| <b>RDTN03</b>   | 291,5         | 185,1         | 2,3          | 1039,8         | 890,0          | 2,3              | ND                     | 49224,3         | FD               | 11                |
| <b>Mediana</b>  | 212,7         | 51,83         | 2,3          | 740,1          | 890            | 94,94            | 11,35                  | 20,607          |                  | 5                 |
| <b>[25-75%]</b> | [70,56-275,8] | [8,605-397,1] | [1,14-2,555] | [254,1-991,1]  | [284,1-1253]   | [19,60-683,4]    | [342,1-2445]           | [10190-37147]   |                  | [2-14,5]          |
| <b>Grupo 2</b>  |               |               |              |                |                |                  |                        |                 |                  |                   |
| <b>CS</b>       | 9,06          | 0,45          | 59,30        | 12,85          | 931,11         | 4435,43          | 2501,89                | 6013,39         | FDSA             | 7                 |
| <b>GFS01</b>    | 4,44          | 0,26          | 0,73         | 0,75           | 243,49         | 132,85           | 189,19                 | 26720,72        | Grave            | 12                |
| <b>IMA11</b>    | 3,36          | 0,74          | 0,36         | 1,31           | 283,19         | 44,21            | ND                     | 27397,82        | FD               | 8                 |
| <b>LCCC12</b>   | 1,88          | 0,7           | 1,96         | 10,01          | 1001,54        | 855,14           | 2011,5                 | 30600,7         | FD               | 4                 |
| <b>LFS09</b>    | 4,04          | 0,2           | 0,98         | 2,74           | 339,2          | 308,9            | 258,97                 | 4478,35         | FDSA             | 15                |
| <b>Mediana</b>  | 4,040         | 0,45          | 0,98         | 2,740          | 339,2          | 308,9            | 1135                   | 26721           |                  | 8                 |
| <b>[25-75%]</b> | [2,62-6,750]  | [0,23-0,72]   | [0,55-30,63] | [1,030-11,43]  | [263,3-966,3]  | [88,53-2645]     | [206,3-2379]           | [5246-28999]    |                  | [5,5-13,5]        |

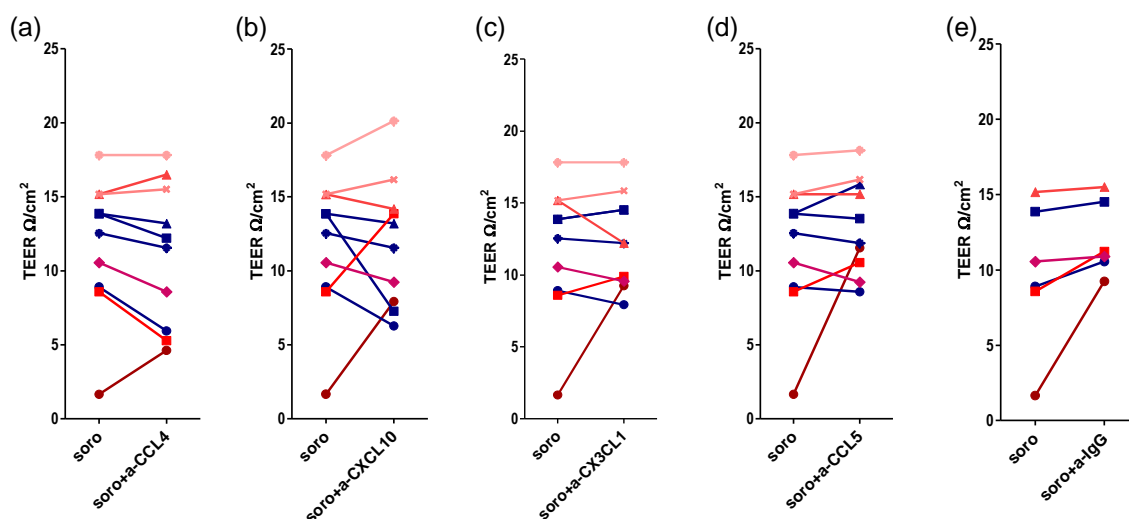
Pacientes altos e baixos produtores das citocinas e quimiocina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL8/IL8. Medida dos valores obtidos em pg/mL.



**Figura 5.2. Medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) de  $2 \times 10^5$  HMVECs cultivadas em insertos de  $3 \mu\text{m}$  de porosidade.** Após o 3º dia de cultivo, foram adicionados soro dos pacientes dos Grupos 1 e 2 e realizado a medida do TEER numa cinética dos tempos de: 0, 5, 15 e 30 min e 1, 2, 3, 4 e 24 horas. Em (A) representam pacientes que não modificaram a medida do TEER na cinética e em (B) aqueles que diminuíram a medida do TEER em algum momento da cinética.

## **5.7. Medida da Resistência Elétrica Transendotelial (TEER) em Monocamada de Células Endoteliais HMVEC-d na Presença de Soro de Pacientes Infectados pelo DENV pré-tratados com Anticorpos Bloqueadores de Quimiocinas**

A fim de avaliar a contribuição das quimiocinas na alteração da permeabilidade transendotelial da monocamada das HMVEC-d através da medida do TEER, nós pré-tratamos o soro de pacientes durante 30 minutos com anticorpos bloqueadores das quimiocinas anti-CCL4/MIP-1 $\beta$ , anti-CXCL10/IP-10, anti-CX3CL1/Fractalcina, anti-CCL5/RANTES ou IgG e medimos o TEER nos diferentes tempos. Uma vez que a diminuição do TEER ocorreu entre 5 a 30 minutos naqueles pacientes que apresentaram esse tipo de alteração, nós demonstraremos apenas os valores relativos da medida do TEER no tempo de 1 hora, comparando os soros não-tratados com aqueles do mesmo paciente pré-tratado com os bloqueadores. Como podemos observar, existe uma variabilidade enorme entre os pacientes, alguns demonstraram uma inalteração do valor relativo do TEER com o tratamento, outros pacientes detectamos aumento do TEER com o tratamento e por fim, outros diminuíram o TEER após tratamento (Figura 5.3). Vale ressaltar que esses dados no tempo de 1h, foram similares aos demais tempos da cinética.



**Figura 5.3. Medida da resistência elétrica transendotelial (TEER) em soro de pacientes pré-tratados com os anticorpos neutralizantes das quimiocinas no tempo de 1 hora.** HMVECs foram cultivadas em insertos e após o 3º dia de cultivo, foram adicionados soro pré-tratados com os bloqueadores ou não dos pacientes dos Grupos 1 e 2 e realizado a medida do TEER numa cinética dos tempos. Em (A) representam soro pré-tratado com anti-CCL4/MIP-1 $\beta$ , (B) anti-CXCL10/IP-10, (C) anti-CX3CL1/Fractalcina, (D) anti-CCL5/RANTES ou (E) anti-IgG.

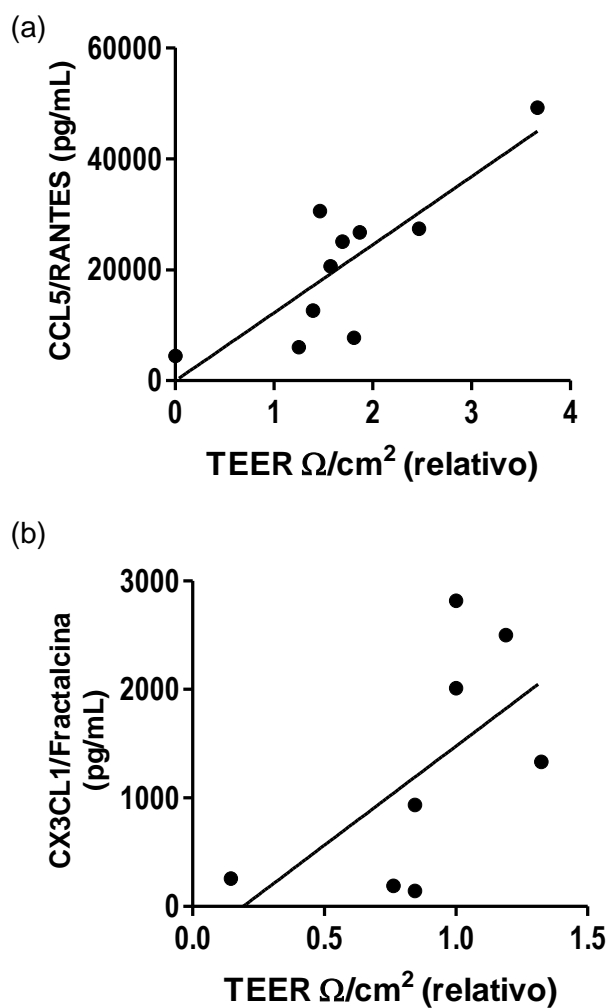
## 5.8. Correlação das Medidas do TEER com os Diferentes Perfis de Pacientes dos Grupo 1 e 2

Uma vez que nossos dados não apontaram para o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  ou o CXCL8/IL8 como potenciais indicadores da alteração da permeabilidade, realizamos análises de correlação na tentativa de buscar se existiria algum parâmetro intrínseco aos pacientes mais relacionados à alteração da permeabilidade.

Inicialmente, comparamos os valores de %TEER relativo entre pacientes FD (n=06) *versus* pacientes FDSA/Grave (n=04), mas não encontramos diferença, embora com uma ligeira diminuição do % TEER relativo nos pacientes FDSA/Grave comparado aos FD (no tempo de 30 minutos, por exemplo, FD  $1,738 \pm 0,6330$  versus FDSA/Grave  $1,105 \pm 0,6532$ , em que temos média  $\pm$  desvio padrão).

Nas análises de correlação, não vimos em momento algum correlação com dias de doença. De forma significativa, CCL5/RANTES foram correlacionados diretamente com a medida do % TEER relativo nos tempos de 15 (r= +0,733, p=0,0158, Figura 5.4) e 30 minutos (r= +0,6364, p=0,0479) e menos significativamente em 1h (r= +0,5758, p=0,0816). Já em tempos mais longos de medida do %TEER relativo, os níveis de CX3CL1 demonstraram uma tendência à correlação em 3 horas (r= +0,6868, p= 0,0599, Figura 5.4) e 4 horas (r= +0,6190, p=0,1017).

Um maior número de análises em pacientes será necessário para entender fatores intrínsecos mais implicados à alteração da permeabilidade no nosso modelo. Nossos dados indicam que CXCL3/Fractalcina estariam de alguma forma contribuindo na alteração da permeabilidade, mas que altos níveis de CCL5/RANTES seriam efetivos na manutenção da monocamada de células endoteliais, indicando um possível papel protetor desta quimiocina na integridade endotelial.



**Figura 5.4. Correlação dos níveis séricos de CCL5/RANTES e CX3CL1/Fractalcina com os valores de TEER relativo dos pacientes infectados pelo DENV.** (a) Figura representativa de CCL5/RANTES do tempo de 15 minutos, no qual  $r = +0,733$   $p = 0,0158$ . Até o tempo de 30 minutos as correlações são significativas e entre 1-2 horas ainda mantém a correlação e (b) Figura representativa de CX3CL1/Fractalcina mostrando uma tendência à correlação no tempo de 3 horas, no qual  $r = +0,6868$   $p = 0,1017$ . Correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.



## 6. Discussão

### 6.1. Análise Comparativa dos Parâmetros Clínicos e Laboratoriais de Pacientes Infectados pelo DENV-4 durante Epidemia de 2013

Neste estudo realizado em 2013 participaram da coorte 181 pacientes com diagnóstico confirmado de infecção pelo DENV, sendo que 96,8% das amostras que tiveram confirmação pelo RT-PCR foram positivas para o sorotipo DENV-4. Esse dado indica uma característica particular deste grupo, uma vez que estamos num quadro de reintrodução do DENV-4 no país recentemente, desde 2010, com uma população susceptível a esse vírus e que já convive com a transmissão de outros três sorotipos. Na teoria esse quadro aumentaria o risco de ocorrência de casos mais graves da doença numa população não-imunizada. No entanto, nossos dados indicaram que a prevalência de DENV-4 em 2013 resultou em 69,1% de casos FD e 30,1% de FDSA/Grave, no qual apenas 2 foram casos graves, segundo a classificação de gravidade clínica da OMS de 2009. Comparando esses dados com epidemias anteriores realizadas pela nossa equipe, nos mesmos centros hospitalares -Mato Grosso do Sul e em Campos dos Goytacazes-, em 2007-2008 tivemos uma prevalência dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 com 45,2% pacientes FD e 54,8% FDSA/Grave (93). Já na prevalência do sorotipo DENV-2 na epidemia de 2010, 51,5% foram FD, 25,8% FDSA e 22,7% de casos graves (96). O conjunto desses dados indica que, de forma surpreendente, a reintrodução do sorotipo DENV-4 não resultou numa maior ocorrência de casos graves. Thomas e colaboradores realizaram estudo retrospectivo de 2005 a 2010 comparando sinais e sintomas de 715 pacientes (entre 14-91 anos) infectados por diferentes sorotipos virais. Pacientes infectados pelo sorotipo DENV-2 foram em sua maioria infecções secundárias, admitidos na fase crítica da doença, com sinais de extravasamento plasmático. As infecções pelo sorotipo DENV-1 levou a uma gravidade intermediária, sem extravasamento de plasmático evidente. Nesta série, ***infecções pelo sorotipo DENV-4 foram mais frequentes e, similar aos nossos achados, os pacientes tiveram uma***

**apresentação clínica mais branda.** De forma consistente, **esses dados confirmam a existência de diferenças em relação à virulência entre os sorotipos (97).**

O próximo passo foi verificar o impacto da infecção pelo DENV-4 nas alterações hematológicas dos pacientes, relacionando-o aos achados anteriores de nossa equipe. Trombocitopenia, coagulopatia e vasculopatia são alterações hematológicas relacionadas às plaquetas e à permeabilidade vascular que são características importantes das formas graves da dengue (98-100). Discute-se mecanismos indutores da trombocitopenia que podem ser tanto devido às alterações da medula óssea por conta da infecção de células progenitoras ou estromais, como pelo consumo de plaquetas no sangue em consequência da ativação do Sistema Complemento, aumento da fagocitose e lise de plaquetas por anticorpos anti-NS1, anti-prM e anti-E, que reagem de forma cruzada com plaquetas, células endoteliais e moléculas da coagulação (101). Se compararmos **a contagem de plaquetas  $\times 10^3/\text{mm}^3$**  em todos os casos **FD** das três epidemias, veremos que em 2013 com **DENV-4 foi de  $169,8 \pm 61,3$** , em 2010 com **DENV-2 foi de  $137,4 \pm 57,9$**  e em 2007-2008 com **DENV2 e DENV-3 foi de  $138,9 \pm 76,8$** . Nos casos **FDSA/Graves**, em 2013 com **DENV-4 foi de  $129,6 \pm 64,3$** , em 2010 com **DENV-2 foi de  $73,9 \pm 52,5$  para FDSA (nos casos graves,  $47,1 \pm 61,3$ )** e em 2007-2008 com **DENV2 e DENV-3 foi de  $92,8 \pm 84,8$** . Embora não tenhamos realizado uma análise estatística entre as três epidemias, fica claro que independente do quadro clínico, o **sorotipo DENV-4 parece induzir uma trombocitopenia menos acentuada** comparada aos outros sorotipos virais, num mesmo grupo de pacientes segundo a classificação clínica.

O envolvimento hepático na dengue geralmente se manifesta pela hepatomegalia ou pelo aumento das transaminases (102). Na dengue grave, a ocorrência de insuficiência hepática fulminante tem sido causa de morte em crianças (103). Os mecanismos de lesão hepática na dengue podem estar relacionados aos efeitos diretos do vírus ou por consequência da resposta imune do hospedeiro no tecido hepático, levando ao comprometimento circulatório, acidose metabólica, hipóxia por hipotensão e/ou derrame vascular(104). Nesta epidemia de 2013 pelo sorotipo **DENV-4**, de forma similar

a epidemia de 2007-2008 pelos sorotipos **DENV-2 e DENV-3, não foram observadas diferenças entre os níveis de AST/TGO ou ALT/TGP entre os grupos FD e FDSA/Grave.** No entanto, na epidemia de 2010 com sorotipo **DENV-2 o grupo grave teve um aumento significativo de ambas às transaminases, comparado ao grupo FD.** Em 2013, o valor de 1 dos 2 **pacientes graves infectados pelo DENV-4 foi de 1235 U/L de AST/TGO e 1345 U/L de ALT/TGP.** Nas análises de correlação, vimos que as **transaminases foram correlacionadas negativamente com a contagem de plaquetas** nos pacientes, confirmando que **ambas as enzimas constituem parâmetros importantes para o prognóstico clínico dos pacientes.**

Alguns estudos mostram que no início da doença, tanto por infecções primárias quanto secundárias, ocorre uma queda na contagem de leucócitos concomitantemente a queda de linfócitos T e ao aumento de linfócitos atípicos, que podem estar relacionados ao processo de supressão da medula óssea durante a fase aguda da doença (105). **Nas três epidemias discutidas anteriormente com sorotipos distintos, observamos tanto uma leucocitose como uma linfocitose nos pacientes comparado aos controles ou pacientes na fase de convalescência.** Nos grupos FDSA/Grave, os valores absolutos dos leucócitos não variaram entre as três epidemias. De forma interessante, nos casos **FD a contagem de leucócitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$  durante epidemia de 2013 com DENV-4 foi de  $4534 \pm 2387$  comparado à epidemia de 2010 com DENV-2 que foi de  $4047,8 \pm 2573,9$  e de 2007-2008 com DENV-1 e DENV-2 de  $3733,3 \pm 1639,4$ ,** indicando que, mesmo sem uma análise estatística desses dados, **a infecção pelo DENV-4 induz um melhor estado imunológico dos pacientes.**

Por fim, como mencionado nos Materiais e Métodos, foram realizadas adaptações do protocolo para aumentar a detecção do NS1 circulante na coorte de pacientes infectados pelo DENV-4. As modificações do protocolo confirmaram 11% a mais de casos que tinham sido anteriormente negativos ou inconclusivos (94). O mesmo protocolo modificado foi aplicado nas amostras de DENV-2 da epidemia de 2010, mais o número de casos positivos não foi alterado (dados não publicados), provavelmente devido a **uma maior**

**prevalência de complexos imunes associados ao DENV-4 comparado ao DENV-2**, entretanto, outros argumentos deverão ser discutidos.

## **6.2. Perfil de Secreção de Citocinas e Quimiocinas na Infecção pelo DENV-4**

Uma rede de citocinas/quimiocinas e suas múltiplas vias regulatórias são moduladas na dengue por um processo altamente complexo, mas ainda não elucidado. Estudos mostram que estes mediadores apresentam uma produção distinta nas diferentes fases da doença e ainda, de acordo com a gravidade clínica. Neste contexto, pacientes FD e FDSA foram comparados nas fases febril, defervescência e convalescência em estudo de Rathakrishnan e colaboradores (2012). Em relação a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , houve uma tendência a baixos níveis na fase febril nos grupos FD e FDSA, com um pico na fase de defervescência. Quanto à secreção da citocina anti-inflamatória IL-10, os autores observaram nos FD níveis aumentados nas fases febril e de defervescência, com queda brusca na fase de convalescência. Nos FDSA, IL-10 manteve-se alta nas três fases na doença. As quantificações das quimiocinas demonstraram que a CXCL8/IL-8 teve um pico de produção na fase de defervescência no grupo FDSA, CCL2/MCP-1 na fase febril nos dois grupos, CXCL10/IP-10 manteve-se alto nas três fases nos dois grupos e CCL5/RANTES mostrou-se alto na fase febril nos dois grupos, com queda na fase de defervescência. Esses dados indicam a complexidade do sistema, o perfil diferencial de regulação dessas moléculas segundo uma cinética e o estágio da doença (106).

Nós realizamos quantificação de citocinas e quimiocinas na maioria dos casos na fase febril **e com exceção da IL-1 $\beta$  e da CCL5/RANTES, todas as outras moléculas avaliadas tiveram níveis aumentados nos pacientes em relação aos controles. Nenhuma delas distinguiu os pacientes quanto à gravidade clínica.** Por análises de correlação, parece que **CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 e CX3CL1/Fractalcina são produzidas em dias iniciais da infecção.** Existe toda uma discussão ao redor do papel dessas moléculas na

dengue, mas o fato é de que elas estão presentes e são autoreguladas positiva ou negativamente umas pelas outras em algum(s) momento(s) da infecção. **A grande questão é o porquê e para que servem essas moléculas na infecção natural pelo DENV.**

Existe uma carência de trabalhos científicos que comparam a produção de citocinas e quimiocinas em resposta aos diferentes sorotipos DENV ou ainda durante a segunda, terceira ou quarta reinfecção heterotípica. Aproveitando-se da situação epidemiológica da dengue em Cuba, durante 1977-2001, Sierra e colaboradores (2012) abordaram a resposta de células T de memória de reatividade cruzada, medindo a expressão do RNA mensageiro de dois mediadores pró-inflamatórios, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e dois mediadores da resposta imunoregulatória, o fator de crescimento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-10. Para isso, foram avaliadas células mononucleares do sangue periférico de pessoas com diferentes perfis de infecção prévia pelo DENV (não-ímmunes, ímmunes para um único sorotipo, dois ou três sorotipos) após estimulação *in vitro* com o DENV-1, DENV-2 ou DENV-3 infecciosos (107). Resumidamente, o mRNA das citocinas da resposta pró-inflamatória foi maior nos indivíduos que tiveram infecção primária para DENV-1 e DENV-3, mas muito maior para DENV-2 comparado aqueles não-ímmunes. Já nas infecções secundárias, as PBMCs apresentaram maior expressão de mediadores pró-inflamatórios em resposta a um sorotipo heterólogo. De forma surpreendente, PBMCs oriundas de pessoas que já tiveram infecção prévia por três sorotipos distintos demonstraram uma resposta Th1 mais branda para o sorotipo heterólogo. **Esse achado é consistente com a observação de que há um aumento da imunidade protetora e desenvolvimento de uma forma clínica mais branda após reinfecções sequenciais** (108, 109). A expressão de IL-10 nos indivíduos previamente infectados por três sorotipos também é mais baixa, isso porque como há uma diminuição da resposta pró-inflamatória, não há necessidade de uma forte resposta regulatória mediada pela IL-10 (110).

A produção de IL-10 na dengue foi revista na dengue por um mecanismo bastante interessante no qual autores demonstraram que plaquetas de pacientes entram em apoptose, por consequência expõe fosfatidilserina, que é reconhecida pelos monócitos que se tornam fortes produtores de IL-10 (45).

Dados do nosso trabalho mostraram que **níveis de IL-10 são correlacionados inversamente com a contagem de plaquetas e de monócitos, indicando que o mecanismo descrito por Hottz e colaboradores poderia contribuir à trombocitopenia** característica da dengue (45).

Nós ainda observamos uma correlação direta entre IL-10 e CXCL10/IP-10 e ambos foram correlacionados inversamente com a contagem de plaquetas. Em um estudo de pacientes com trombocitopenia ativa, plaquetas foram inversamente correlacionadas com os níveis de CXCL10/IP-10. Segundo os autores, CXCL10 induziria a migração de linfócitos T CD8 para o baço desses pacientes, e no órgão, as CD8 mediarão uma importante destruição de plaquetas, explicando a trombocitopenia (111). Com relação aos nossos pacientes, observamos correlação inversa dos níveis de CXCL10/IP-10 com a contagem de monócitos. Assim, **poderíamos especular que CXCL10/IP-10 induziria migração de monócitos que levariam a apoptose de plaquetas com produção de IL-10, semelhante ao modelo de Hottz** (45).

Quando se compara a produção de citocinas e quimiocinas em resposta aos diferentes sorotipos DENV, a carência de dados científicos é ainda maior. Fizemos uma retrospectiva de dados anteriores na tentativa de comparar os níveis dessas moléculas em relação aos diferentes sorotipos. Infelizmente não pudemos comparar os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e CXCL8/IL-8 entre as epidemias, porque os ensaios utilizados foram diferentes. Entretanto, os kits de CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES são comparáveis. Então, a quantificação de **CCL2/MCP-1** em pacientes FD em 2013, **DENV-4 foi de 648,1 [966,0-2390,0]** e em 2010, **DENV-2 foi de 1209,0 [805,2-1651]**. No caso dos pacientes **FDSA/Grave em 2013, DENV-4 foi de 543,3 [329,6-979,6]** e em 2010, **DENV-2 foi de 881,7 [653,8-2021]**. Assim, o **sorotipo DENV-4 induziu menos CCL2/MCP-1 comparado à epidemia pelo DENV-2**. Quanto a **CCL5/RANTES**, em pacientes FD em 2013, **DENV-4 foi de 15943 [9752-30261]** e em 2010, **DENV-2 foi de 10550 [6558-24490]**. No caso dos pacientes **FDSA/Grave em 2013, DENV-4 foi de 13109 [4612-23505]** e em 2010, **DENV-2 foi de 8785 [6291-24999]**. Então, enquanto que **os níveis de CCL2/MCP-1 foram menores na epidemia de DENV-4 comparado a DENV-2, os níveis de CCL5/RANTES foram maiores no DENV-4 comparado ao DENV-2**. Chau e sua equipe (2008) realizaram a dosagem de diversas citocinas e quimiocinas,

dentre elas destacamos IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e as quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8 e CXCL10/IP-10 que tiveram níveis muito elevados nos pacientes com SCD comparado aos pacientes com FHD. ***CCL5/RANTES que foi a exceção, pois pacientes com SCD tiveram níveis mais baixos comparados aos FHD o que poderia sugerir um papel protetor desta quimiocina.*** É importante pontuar que só consideramos para análise comparativa quando as quantificações dos grupos controles foram muito próximas.

Uma proposta original do nosso estudo foi à quantificação da quimiocina CX3CL1/Fractalcina em pacientes. CX3CL1/Fractalcina funciona como um quimioatrativo para linfócitos T, monócitos e células NK (90). Já foi mostrado que mastócitos induzem a produção de CX3CL1/Fractalcina, juntamente com CCL5/RANTES, durante a infecção pelo DENV (90). Entretanto, em nossos pacientes não foi confirmada uma relação entre a produção de CCL5/RANTES e de CX3CL1/Fractalcina. ***A CX3CL1/Fractalcina parece ser produzida numa fase mais precoce da doença e poderia estar envolvida com a migração de linfócitos T do sangue para outros tecidos, como indica nossos dados de correlação.***

### **6.3. Alteração da Permeabilidade de Células Endoteliais Associada às Quimiocinas**

Trabalhos anteriores detectaram em autópsias de pacientes FHD/SCD e em modelos murinos, células endoteliais infectadas pelo DENV (112-114). No endotélio, o vírus é capaz de se replicar e a resposta imunológica é ativada através, por exemplo, do recrutamento de células imunes para o endotélio e pela sua capacidade de secretar citocinas. Desta forma, ***o endotélio favorece o aumento da viremia, secreção de citocinas e ativação da cascata do Sistema Complemento o que indica que a alteração da permeabilidade das células endoteliais é de natureza multifatorial, e que esses fatores trabalham em conjunto*** (80, 85, 115). ***Por outro lado, como o endotélio é a barreira primária de fluído da vasculatura, células endoteliais, junções aderentes, citocinas, indutores de permeabilidade, imunocomplexos, fatores da coagulação e plaquetas, normalmente atuam em acordo***

**contrabalanceando os efeitos sobre a alteração da permeabilidade e o extravasamento vascular** (revisado por (116)). Existe uma grande dificuldade de se realizar estudos no endotélio de pacientes infectados pelo DENV, mas uma relativa facilidade para se avaliar componentes no sangue, o que leva a pesquisas mais focalizadas nas células imunes circulantes dos pacientes ao invés de suas células endoteliais. Em nosso estudo tentamos demonstrar o efeito das citocinas e quimiocinas presentes no soro de pacientes usando modelo *in vitro* de células endoteliais, as HMVEC-d. Como o extravasamento plasmático sempre ocorre em tecidos da serosa, isso indica que células endoteliais da microvasculatura são preferencialmente afetadas na dengue (117).

**A teoria da “tempestade de citocinas” tem sido uma das propostas centrais na indução da “peneira endotelial” nos pacientes. No entanto, observa-se uma rápida recuperação do extravasamento plasmático nos pacientes, e, portanto, esses mediadores inflamatórios atuam também na regulação dessa alteração.** Uma série de mediadores que parecem alterar dramaticamente a permeabilidade em resposta a ativação do sistema imune, particularmente as citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, e CXCL8/IL-8, e outras pró-inflamatórias. Outros estudos relatam o aumento dos níveis de VEGF-A na FHD. Ainda, IL-2 e CCL5/RANTES em pacientes FHD parecem regular a permeabilidade celular, embora o papel relativo dessas citocinas no extravasamento plasmático não seja ainda conhecido (revisado por (116)).

O efeito do soro de 10 pacientes, divididos inicialmente em altos e baixos produtores de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e CXCL8/IL-8, sobre monocamadas de células HMVEC-d foi avaliado observando-se a alteração da medida de resistência elétrica transendotelial (TEER). Quatro dos 10 pacientes não demonstraram alterações importantes na monocamada, enquanto que outros 6 pacientes induziram alteração nas monocamadas das HMVEC-d, em cinéticas distintas, e parece que de maneira irreversível. Dentre os 6, 2 graves foram inseridos nas análises e ambos induziram diminuição do TEER, conforme esperado e em acordo da associação desse efeito com a gravidade.



Surpreendentemente, **não conseguimos confirmar um efeito importante do TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  e CXCL8/IL-8 na alteração vascular.** No entanto, **níveis limiares de citocinas e quimiocinas são necessárias para modular as alterações fenotípicas das células endoteliais,** particularmente TNF- $\alpha$  e CXCL8/IL-8 (84). Kelley e colaboradores determinaram que 14pg/mL de TNF- $\alpha$  ou 483 pg/mL de CXCL8/IL-8 alteram de forma sinérgica a permeabilidade de células HUVEC cultivadas na presença de sobrenadante de cultura de THP-1 infectadas pelo DENV. No entanto, quando na combinação das citocinas, a concentração requerida pode ser bem menor para se observar o efeito nas HUVEC (84). Assim, **baixas concentrações sanguíneas de mediadores vasoativos são capazes de alterar eficazmente a permeabilidade, comparado aos mesmos mediadores sozinhos** (118). Juntos TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  induzem maior permeabilidade do que estas mesmas citocinas sozinhas(119). **Os níveis séricos das citocinas e quimiocinas em nossos pacientes indicam uma correlação direta entre TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e CXCL8/IL-8 e IL-1- $\beta$  e CXCL8/IL-8, mesmo não sendo um grupo de pacientes graves, essas concentrações séricas estão dentro do limite necessário na indução da permeabilidade, segundo Kelley e colaboradores.** Assim, existe rede autorregulada, complexa e interativa de indução de mediadores envolvida da imunopatogênese da FHD/SCD e na dengue grave (120).

Nosso próximo passo, semelhantes a trabalhos prévios da literatura, foi avaliar a contribuição das quimiocinas. Baseamos-nos em estudos de Talavera e colaboradores que adicionaram sobre cultura de HMEC-1, sobrenadante de cultura de células THP-1 infectadas pelo DENV pré-tratadas com anticorpo neutralizante anti-CXCL8/IL-8. Os autores observaram que o pré-tratamento inibiu parcialmente a alteração da permeabilidade da monocamada (86). Em um sistema bastante similar a Talavera, Kelley e colaboradores neutralizaram TNF- $\alpha$  e CXCL8/IL-8. Os autores observaram que o bloqueio das duas citocinas simultaneamente reverteu à alteração da permeabilidade de forma bem mais eficiente comparado a neutralização TNF- $\alpha$  ou do CXCL8/IL-8 sozinhos (84, 121). Nossa proposta foi bloquear especificamente as moléculas CCL4/MCP-1, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalcina ou CCL5/RANTES no soro

daqueles 10 pacientes previamente avaliados e reavaliar os dados da alteração na monocamada das células HMVEC-d após o tratamento. **Não detectamos diferença importante na medida do TEER quando os soros foram pré-tratados com os bloqueadores sozinhos. É provável que, diferentemente do uso de sobrenadantes utilizados por Talavera e Kelley, a inibição de uma única quimiocina no soro dos pacientes pode não ser suficiente para reverter à alteração da monocamada.** Assim, novos ensaios serão realizados utilizando diferentes concentrações dos bloqueadores e a associação entre eles na tentativa de ver alguma alteração.

Um dado surpreendente de nossos achados é que quando correlacionamos as **medidas de TEER com os parâmetros intrínsecos dos pacientes**, como dias de doença, gravidade, níveis séricos das citocinas e quimiocinas. Encontramos que **IL-1- $\beta$  e CXCL8/IL-8 parece influenciar na alteração da monocamada em momentos precoces da avaliação, seguido de CCL5/RANTES em diferentes tempos da cinética e por fim, a CX3CL1/Fractalina em tempos mais tardios.**

A avaliação da possível participação da CX3CL1/Fractalina neste processo foi avaliada pela primeira vez na dengue e de forma interessante, dados da literatura demonstraram que TNF- $\alpha$  e CXCL8/IL-8 aumentam a expressão de CX3CL1/Fractalina nas células endoteliais, levando a disfunção do endotélio (121). Esses dados estariam de acordo com a influência da CX3CL1/Fractalina em momentos mais tardios da cinética da alteração no endotélio.

A CCL5/RANTES foi a única quimiocina na qual detectamos baixa produção nos pacientes comparado aos controles, diferente das demais. Trabalhos mostram que **níveis de CCL5/RANTES são ainda menores nos pacientes SCD e graves comparados aqueles com FHD (67), sugerindo um papel protetor de CCL5/RANTES na permeabilidade.**

Contudo, faz-se necessário aumentar o número de pacientes nos ensaios de permeabilidade, observando principalmente pacientes com quadros clínicos mais graves. Além disso, pretendemos estabelecer outros ensaios para verificar a contribuição das quimiocinas na alteração da permeabilidade endotelial. Por fim, semelhante aos dados de Appana e colaboradores (2012)

que demonstraram alteração das HUVEC com soro de pacientes FHD (122), pretendemos confirmar a perturbação da integridade do endotélio através de outras medições, como avaliar morfológicamente as HMVEC-d quanto à disposição das proteínas das junções aderentes, como a caderina e das junções *tight* como a ZO-1, o citoesqueleto de actina e também, a expressão de moléculas envolvidas na ativação do endotélio como VCAM-1 que podem ser a base molecular que sustenta um aumento da permeabilidade vascular durante a FHD/SCD.

## 7. Conclusão

- 7.1. Pacientes infectados nesta epidemia de DENV-4 apresentaram características clínicas e laboratoriais associadas a um melhor desfecho clínico, observado principalmente por uma trombocitopenia menos acentuada e um status imunológico geral melhor, quando comparados aos pacientes oriundos de epidemias pelos sorotipos DENV-2 e DEN-3;
- 7.2. Independente da gravidade clínica, pacientes DENV-4 apresentaram altos níveis dos mediadores inflamatórios: TNF- $\alpha$ , IL-10, CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 e CX3CL1/Fractalina, mas não de IL-1 $\beta$  e CCL5/RANTES em comparação aos controles saudáveis;
- 7.3. Citocinas e quimiocinas quantificadas no soro de pacientes infectados pelo DENV-4 são autoreguladas positiva- ou negativamente umas pelas outras em algum(s) momento(s) da infecção. Influenciando no balanço da indução de uma resposta imune antiviral mais eficiente e/ou para a “tempestade de citocinas” contribuindo à imunopatogênese da infecção;
- 7.4. O aumento da permeabilidade na monocamada das HMEC-d indicado pela diminuição dos valores % TEER relativo na presença do soro de alguns pacientes DENV-4, foi independente dos níveis séricos TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e da quimiocina CXCL8/IL-8;
- 7.5. O bloqueio de uma única quimiocina no soro dos pacientes não foi suficiente para reverter à medida do % TEER relativo na monocamada;
- 7.6. Níveis séricos de CX3CL1/Fractalina parecem influenciar a alteração da monocamada das HMVEC-d em tempos distintos;
- 7.7. Baixos níveis séricos de CCL5/RANTES em pacientes DENV-4 parece ter papel protetor quanto a indução da permeabilidade endotelial na infecção pela DENV.

## 8. Referências Bibliográficas

1. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology*. 2007;25:787-820. Epub 2007/02/13.
2. Mc CM. Chemotaxis in leukocytes. *Physiological reviews*. 1946;26(3):319-36. Epub 1946/07/01.
3. Konijn TM, Van De Meene JG, Bonner JT, Barkley DS. The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1967;58(3):1152-4. Epub 1967/09/01.
4. Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(7):4584-7. Epub 1981/07/01.
5. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):9233-7. Epub 1987/12/01.
6. Lindley IJD WJ, Kunkel SL. Nomenclature announcement - the chemokines. *Immunol Today*. 1993;14:24.
7. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7. Epub 2000/03/14.
8. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*. 2014;32:659-702. Epub 2014/03/25.
9. Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews*. 2014;66(1):1-79. Epub 2013/11/13.
10. Santoni M, Bracarda S, Nabissi M, Massari F, Conti A, Bria E, et al. CXC and CC chemokines as angiogenic modulators in nonhaematological tumors. *BioMed research international*. 2014;2014:768758. Epub 2014/06/28.
11. Zweemer AJ, Toraskar J, Heitman LH, AP IJ. Bias in chemokine receptor signalling. *Trends in immunology*. 2014;35(6):243-52. Epub 2014/04/01.
12. Roy I, Veldkamp CT, Volkman BF, Dwinell MB. Chemokines in colitis: microRNA control. *Gut*. 2014;63(8):1202-4. Epub 2013/10/22.
13. Ordway D, Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Spencer JS, Henao-Tamayo M, Harton M, et al. XCL1 (lymphotactin) chemokine produced by activated CD8 T cells during the chronic stage of infection with *Mycobacterium tuberculosis* negatively affects production of IFN-gamma by CD4 T cells and participates in granuloma stability. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82(5):1221-9. Epub 2007/08/19.
14. Rosas-Taraco AG, Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Lee EJ, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M. Intrapulmonary delivery of XCL1-targeting small interfering RNA in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;41(2):136-45. Epub 2008/12/23.

15. White GE, Greaves DR. Fractalkine: a survivor's guide: chemokines as antiapoptotic mediators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(3):589-94. Epub 2012/01/17.
16. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-70. Epub 2007/08/04.
17. Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR, von Hundelshausen P. Touch of chemokines. *Frontiers in immunology*. 2012;3:175. Epub 2012/07/19.
18. Nedoszytko B, Sokolowska-Wojdylo M, Ruckemann-Dziurdzinska K, Roszkiewicz J, Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postepy dermatologii i alergologii*. 2014;31(2):84-91. Epub 2014/08/07.
19. Chavakis E, Choi EY, Chavakis T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102(2):191-7. Epub 2009/08/05.
20. Zhu Y, Murakami F. Chemokine CXCL12 and its receptors in the developing central nervous system: emerging themes and future perspectives. *Developmental neurobiology*. 2012;72(10):1349-62. Epub 2012/06/13.
21. Ueha S, Yoneyama H, Hontsu S, Kurachi M, Kitabatake M, Abe J, et al. CCR7 mediates the migration of Foxp3+ regulatory T cells to the paracortical areas of peripheral lymph nodes through high endothelial venules. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82(5):1230-8. Epub 2007/08/19.
22. Smigiel KS, Richards E, Srivastava S, Thomas KR, Dudda JC, Klonowski KD, et al. CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(1):121-36. Epub 2014/01/01.
23. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(1):6-10. Epub 1997/07/01.
24. Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, et al. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nature medicine*. 2002;8(2):157-65. Epub 2002/02/01.
25. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001;12(4):313-35. Epub 2001/09/07.
26. Nomiyama H, Hieshima K, Osada N, Kato-Unoki Y, Otsuka-Ono K, Takegawa S, et al. Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC genomics*. 2008;9:222. Epub 2008/05/17.
27. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nature immunology*. 2001;2(2):108-15. Epub 2001/03/29.
28. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature immunology*. 2008;9(9):949-52. Epub 2008/08/20.
29. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(3):333-40. Epub 2003/02/06.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.

31. Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Garcia-Zepeda E, Carrero JC, Morales-Montor J. The role of chemokines in breast cancer pathology and its possible use as therapeutic targets. *Journal of immunology research*. 2014;2014:849720. Epub 2014/08/29.
32. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5. Epub 1995/12/15.
33. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996;382(6594):829-33. Epub 1996/08/29.
34. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996;272(5270):1955-8. Epub 1996/06/28.
35. Ramirez LA, Arango TA, Thompson E, Naji M, Tebas P, Boyer JD. High IP-10 levels decrease T cell function in HIV-1-infected individuals on ART. *Journal of leukocyte biology*. 2014. Epub 2014/08/27.
36. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical epidemiology*. 2013;5:299-309. Epub 2013/08/31.
37. Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *The Medical clinics of North America*. 2008;92(6):1377-90, x. Epub 2008/12/09.
38. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Advances in virus research*. 2008;72:1-76. Epub 2008/12/17.
39. Lavradio JPRg. Esboço historico das epidemias que tem grassado na cidade do Rio de Janeiro desde 1830 a 1870. Rio de Janeiro,: Typographia nacional; 1872. viii, 216 p., 1 l. p.
40. Franco O, Brazil. Departamento Nacional de Endemias Rurais. [from old catalog]. *História da febre-amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. 208 p. p.
41. Gubler DJ. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2004;27(5):319-30. Epub 2004/07/01.
42. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1990;85(2):253. Epub 1990/04/01.
43. Lourenco-de-Oliveira R, Honorio NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(6):799-800. Epub 2002/10/19.
44. Saúde Md. Situação Epidemiológica da Dengue. 2014; Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>.
45. da Silva Voorham JM. [A possible fifth dengue virus serotype]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2014;158:A7946. Epub 2014/09/18. Een mogelijk vijfde serotype van het denguevirus.

46. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(7):518-28. Epub 2007/06/15.
47. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2003;3(1):19-28. Epub 2003/06/12.
48. De La Guardia C, Leonart R. Progress in the identification of dengue virus entry/fusion inhibitors. *BioMed research international*. 2014;2014:825039. Epub 2014/08/27.
49. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2014. Epub 2014/09/19.
50. Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annual review of immunology*. 2011;29:587-619. Epub 2011/01/12.
51. St John AL, Abraham SN, Gubler DJ. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(6):420-6. Epub 2013/05/09.
52. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*. 2000;6(7):816-20. Epub 2000/07/11.
53. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(7):823-9. Epub 2003/04/12.
54. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012;10(8):895-907. Epub 2012/10/04.
55. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva 2009.
56. Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martinez E, et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC infectious diseases*. 2011;11:106. Epub 2011/04/23.
57. Back AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infection ecology & epidemiology*. 2013;3. Epub 2013/09/05.
58. de la CSB, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Archives of virology*. 2007;152(3):533-42. Epub 2006/11/16.
59. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, et al. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *The Journal of infectious diseases*. 2001;184(11):1369-73. Epub 2001/12/26.
60. Lan NT, Hirayama K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Tropical medicine and health*. 2011;39(4 Suppl):73-81. Epub 2012/04/14.
61. Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*. 2008;453(7195):672-6. Epub 2008/05/23.
62. Rodriguez-Roche R, Gould EA. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *BioMed research international*. 2013;2013:690835. Epub 2013/08/13.



63. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *The Journal of experimental medicine*. 1977;146(1):201-17. Epub 1977/07/01.
64. Boonnak K, Slike BM, Donofrio GC, Marovich MA. Human FcγRII cytoplasmic domains differentially influence antibody-mediated dengue virus infection. *J Immunol*. 2013;190(11):5659-65. Epub 2013/04/26.
65. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*. 2010;2(12):2649-62. Epub 2011/10/14.
66. Fang YT, Wan SW, Lu YT, Yao JH, Lin CF, Hsu LJ, et al. Autophagy facilitates antibody-enhanced dengue virus infection in human pre-basophil/mast cells. *PloS one*. 2014;9(10):e110655. Epub 2014/10/21.
67. Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NT, et al. Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(4):516-24. Epub 2008/07/05.
68. Brown MG, King CA, Sherren C, Marshall JS, Anderson R. A dominant role for FcγRII in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells and associated CCL5 release. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(6):1242-50. Epub 2006/08/31.
69. Remy MM. Dengue fever: theories of immunopathogenesis and challenges for vaccination. *Inflammation & allergy drug targets*. 2014;13(4):262-74. Epub 2014/08/29.
70. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine*. 2003;9(7):921-7. Epub 2003/06/17.
71. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2012;76(1):16-32. Epub 2012/03/07.
72. Raekiansyah M, Espada-Murao LA, Okamoto K, Kubo T, Morita K. Dengue virus neither directly mediates hyperpermeability nor enhances tumor necrosis factor-α-induced permeability in vitro. *Japanese journal of infectious diseases*. 2014;67(2):86-94. Epub 2014/03/22.
73. Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *The Lancet Infectious diseases*. 2010;10(10):712-22. Epub 2010/10/05.
74. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):532-43. Epub 2011/07/16.
75. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(8):1078-88. Epub 2006/03/18.
76. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008;53(3):287-99. Epub 2008/06/05.

77. Oishi K, Saito M, Mapua CA, Natividad FF. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2007;13(3):125-33. Epub 2007/06/27.
78. Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(4):401-8. Epub 2008/03/28.
79. Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;66(4):435-41. Epub 2002/08/08.
80. Azizan A, Sweat J, Espino C, Gemmer J, Stark L, Kazanis D. Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus. *Journal of virological methods*. 2006;138(1-2):211-7. Epub 2006/10/13.
81. Dalrymple N, Mackow ER. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *Journal of virology*. 2011;85(18):9478-85. Epub 2011/07/08.
82. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol*. 2002;169(2):657-64. Epub 2002/07/05.
83. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *Journal of medical virology*. 2003;69(1):82-90. Epub 2002/11/19.
84. Kelley JF, Kaufusi PH, Nerurkar VR. Dengue hemorrhagic fever-associated immunomediators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability. *Virology*. 2012;422(2):326-37. Epub 2011/12/02.
85. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*. 1998;161(11):6338-46. Epub 1998/12/02.
86. 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. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 7):1801-13. Epub 2004/06/26.
87. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 12):3623-30. Epub 2006/11/14.
88. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2000;63(1-2):71-5. Epub 2001/05/19.

89. Nightingale ZD, Patkar C, Rothman AL. Viral replication and paracrine effects result in distinct, functional responses of dendritic cells following infection with dengue 2 virus. *Journal of leukocyte biology*. 2008;84(4):1028-38. Epub 2008/07/26.
90. St John AL, Rathore AP, Yap H, Ng ML, Metcalfe DD, Vasudevan SG, et al. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(22):9190-5. Epub 2011/05/18.
91. Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, et al. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol*. 2008;181(9):5865-74. Epub 2008/10/23.
92. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, de Assis EF, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol*. 2014;193(4):1864-72. Epub 2014/07/13.
93. de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Povoá TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LD, et al. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PloS one*. 2012;7(7):e38527. Epub 2012/07/21.
94. Lima Mda R, Nogueira RM, Filippis AM, Nunes PC, Sousa CS, Silva MH, et al. A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. *Journal of virological methods*. 2014;204:105-8. Epub 2014/04/22.
95. Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(12):5014-23. Epub 2007/10/12.
96. de-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setubal S, et al. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1beta and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(1):48-56. Epub 2012/02/09.
97. Thomas L, Najioullah F, Besnier F, Valentino R, Cesaire JR, Cabie A. Clinical presentation of dengue by serotype and year of epidemic in Martinique. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;91(1):138-45. Epub 2014/05/29.
98. Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;338:67-82. Epub 2009/10/06.
99. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology*. 2000;13(2):261-76. Epub 2000/08/16.
100. Diaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA, Martinez-Vega RA. Predictors of spontaneous bleeding in patients with acute febrile syndrome from a dengue endemic area. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2010;49(1):11-5. Epub 2010/07/29.
101. Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(5):515-23. Epub 2011/04/20.

102. Lee LK, Gan VC, Lee VJ, Tan AS, Leo YS, Lye DC. Clinical relevance and discriminatory value of elevated liver aminotransferase levels for dengue severity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(6):e1676. Epub 2012/06/09.
103. Roy A, Sarkar D, Chakraborty S, Chaudhuri J, Ghosh P. Profile of hepatic involvement by dengue virus in dengue infected children. *North American journal of medical sciences*. 2013;5(8):480-5. Epub 2013/10/02.
104. Itha S, Kashyap R, Krishnani N, Saraswat VA, Choudhuri G, Aggarwal R. Profile of liver involvement in dengue virus infection. *The National medical journal of India*. 2005;18(3):127-30. Epub 2005/09/01.
105. Jameel T, Mehmood K, Mujtaba G, Choudhry N, Afzal N, Paul RF. Changing haematological parameters in dengue viral infections. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*. 2012;24(1):3-6. Epub 2012/01/01.
106. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PloS one*. 2012;7(12):e52215. Epub 2013/01/04.
107. Sierra B, Perez AB, Alvarez M, Garcia G, Vogt K, Aguirre E, et al. Variation in inflammatory/regulatory cytokines in secondary, tertiary, and quaternary challenges with dengue virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;87(3):538-47. Epub 2012/07/18.
108. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1113-7. Epub 2006/12/19.
109. Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaughn DW, Endy TP, et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;77(5):910-3. Epub 2007/11/07.
110. Sierra B, Perez AB, Garcia G, Aguirre E, Alvarez M, Gonzalez D, et al. Role of CC chemokine receptor 1 and two of its ligands in human dengue infection. Three approaches under the Cuban situation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2014;16(1):40-50. Epub 2013/10/26.
111. Gu D, Chen Z, Zhao H, Du W, Xue F, Ge J, et al. Th1 (CXCL10) and Th2 (CCL2) chemokine expression in patients with immune thrombocytopenia. *Human immunology*. 2010;71(6):586-91. Epub 2010/02/16.
112. Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;80(3):416-24. Epub 2009/03/10.
113. Zellweger RM, Prestwood TR, Shresta S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. *Cell host & microbe*. 2010;7(2):128-39. Epub 2010/02/16.
114. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(8):1411-8. Epub 2004/04/10.

115. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(4):755-62. Epub 1999/03/09.
116. Dalrymple NA, Mackow ER. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Advances in virology*. 2012;2012:840654. Epub 2012/09/07.
117. Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. *Journal of proteome research*. 2009;8(5):2551-62. Epub 2009/03/14.
118. Beynon HL, Haskard DO, Davies KA, Haroutunian R, Walport MJ. Combinations of low concentrations of cytokines and acute agonists synergize in increasing the permeability of endothelial monolayers. *Clinical and experimental immunology*. 1993;91(2):314-9. Epub 1993/02/01.
119. Burke-Gaffney A, Keenan AK. Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 alpha/beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunopharmacology*. 1993;25(1):1-9. Epub 1993/01/01.
120. Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, Green S, Gagnon SJ, Janus J, et al. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Archives of virology Supplementum*. 1994;9:59-64. Epub 1994/01/01.
121. Cimato TR, Palka BA. Fractalkine (CX3CL1), GM-CSF and VEGF-a levels are reduced by statins in adult patients. *Clinical and translational medicine*. 2014;3:14. Epub 2014/07/06.
122. Appanna R, Wang SM, Ponnampalavanar SA, Lum LC, Sekaran SD. Cytokine factors present in dengue patient sera induces alterations of junctional proteins in human endothelial cells. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;87(5):936-42. Epub 2012/09/19.

# Anexo 1

## Projeto Dengue

Laboratório de Imunologia Viral - FIOCRUZ

Mato Grosso do Sul - 2013

### IDENTIFICAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Masc ( ) Fem Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data Entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data Internação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Gestante: ( ) Sim ( ) Não Dengue anterior: ( ) Sim ( ) Não

Vacina: ( ) Febre amarela <10 anos ( ) Rubéola/triviral

Outros: \_\_\_\_\_

### HISTÓRIA CLÍNICA

#### Comorbidades:

|                   |                   |                   |           |                      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|----------------------|
| Diabetes mellitus | DPOC              | Asma brônquica    | rinite    | Hipertensão arterial |
| Doença cardíaca   | Doença falciforme | Doença auto-imune | Tabagismo | Outros               |

Doença viral crônica? Quais?

Faz uso de medicamentos contínuos? Especificar:

#### Sintomas suspeitos de dengue

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

**Atenção para os Sinais de Alarme**

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

**Manifestações Hemorrágicas**

|               |           |               |          |             |
|---------------|-----------|---------------|----------|-------------|
| Prova do laço | Petéquias | Gengivorragia | Epistaxe | Metrorragia |
| Outras        |           |               |          |             |

|   |
|---|
| <b>LABORATORIAL</b>                               |
| 1° HT: _____ 1° Plaqueta: _____ data: ___/___/___ |

2° HT: \_\_\_\_\_ 2° Plaqueta: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

último HT: \_\_\_\_\_ última Plaqueta: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Anexar dados do hemograma e bioquímica

**Outras informações:**



## Anexo 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

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

Nome : \_\_\_\_\_

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

Data: \_\_\_\_\_

Nome : \_\_\_\_\_

Assinatura : \_\_\_\_\_

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

Dra.Elzinandes L Azeredo (021) 7183-9093

## Anexo 3



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** Claire Fernandes Kubelka

**CAAE:** 13318113.7.0000.5248

**Instituição Proponente:** Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 495.688

**Data da Relatoria:** 16/12/2013

#### Apresentação do Projeto:

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

São apresentados quatro objetivos e treze objetivos secundários.

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

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

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

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone**

: (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br