

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MECANISMOS DE BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS
DURANTE A INFEÇÃO PELO VÍRUS DENGUE

Giselle Barbosa de Lima

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza

RIO DE JANEIRO

Dezembro, 2015

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

L732 Lima, Giselle Barbosa de

Mecanismos de biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus dengue / Giselle Barbosa de Lima. – Rio de Janeiro, 2015.

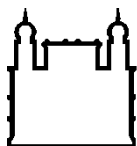
xxi, 135 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 108-135

1. Dengue. 2. Corpúsculos lipídicos. 3. Inflamação. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

GISELLE BARBOSA DE LIMA

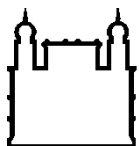
Mecanismos de biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus
dengue

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

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza

RIO DE JANEIRO

Dezembro, 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: GISELLE BARBOSA DE LIMA

MECANISMOS DE BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DURANTE A INFECCÃO PELO VÍRUS DENGUE

ORIENTADORA: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza

Aprovada em: 17 / 12 / 2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib (Presidente)

Prof. Dra. Luciana Barros de Arruda

Prof. Dra. Patrícia Elaine Almeida

Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza (Revisor e suplente)

Prof. Dra. Iranaia Assunção Miranda (Suplente)

Rio de Janeiro, 17 de dezembro de 2015.

Dedico esta tese à minha amada filha,
Alice.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Patrícia Bozza, exemplo de competência e dedicação, pelo apoio, paciência, incentivo e aprendizado durante os meus dez anos de laboratório. Obrigada pela confiança e contribuição no meu amadurecimento profissional.

Ao Eugenio Hottz, pela parceria, colaboração neste trabalho e discussões científicas. Com toda essa determinação, vejo em você um futuro brilhante e estou na torcida. Obrigada por tudo.

À Lígia Paiva, pela colaboração neste trabalho, discussões científicas e caronas.

Ao Edson Assis, pela dosagem de mediadores inflamatórios, por estar sempre disposto a ajudar, pelas boas conversas, amizade e caronas.

Ao Dr. Jens Rietdorf, pela ajuda na análise das imagens criando, gentilmente, uma macro específica para eu estudar a biogênese de corpúsculos lipídicos.

Aos Drs. Clarissa Maya-Monteiro, Adriana Vallochi, Cecília Almeida, Adriana Ribeiro, Fernando Bozza e Valber Frutuoso, pelas ideias, discussões, bem como pelo incentivo e companheirismo durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Dr. Thiago Moreno pela revisão desta tese, críticas e sugestões importantes para a continuação e melhora deste estudo.

Ao Dr. Hugo Caire Castro-Faria-Neto, por ter me recebido no laboratório em 2005 e, desde então, por ter contribuído com brilhantes discussões científicas.

Às Dras. Andrea Da Poian e Irania Miranda pela colaboração desde o tempo de iniciação científica e por discussões científicas importantes para o desenvolvimento deste projeto.

À Sally Liechocki, por ser, antes de tudo, minha amiga de verdade. Pela ajuda direta nesta tese com experimentos, discussões e na trabalhosa formatação. Eu só tenho a agradecer

por você ser tão presente na minha vida e da minha família e, também, por saber que posso sempre confiar e contar com você.

À Juliana Lopes, pela amizade, parceria nos experimentos, ajuda sempre quando eu precisava e, também, pelas caronas.

À Narayana Fazolini, por alegrar o meu dia com tantas novidades divertidas. Pelos conselhos nos momentos de tensão (ou não) e também pelo seu jeitinho carinhoso comigo e com a minha família. Obrigada por ser uma amiga tão querida e especial.

À Natália Roque, por entender perfeitamente os meus momentos de puro estresse. Obrigada pelas boas conversas, conselhos, troca de experiências maternas e pela grande amizade.

À Rose Branco, por ser uma amiga tão querida e solidária. Obrigada pelo seu bom humor, carinho, apoio e por ser tão eficiente no trabalho.

Ao grupo corpúsculos lipídicos, pela ajuda em diversas técnicas, união, parceria, discussões produtivas, apoio e, principalmente, por uma ótima convivência.

A todos do Laboratório de Imunofarmacologia, pelo apoio, discussões, ideias, incentivo, ajuda e amizade. Um agradecimento especial à Andrea Surrage, por ser esta pessoa incrível e sempre disposta a ajudar.

Aos funcionários da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, especialmente à Daniele Lobato e Julimar Ferreira, pela atenção e boa vontade demonstrada ao longo do curso.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPERJ.

Aos meus amigos e familiares que sempre torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para o andamento deste trabalho.

Aos meus pais, Rita e César, pelo amor, dedicação, confiança, apoio e incentivo durante toda a minha jornada estudantil. Amo vocês! Mãe, deixo aqui registrado um super

obrigada por cuidar tão bem da minha filha e permitir que eu fosse trabalhar sossegada; sem você seria difícil finalizar esta tese.

Ao meu marido Thiago, pelo amor, companheirismo e apoio. Por toda a ajuda com a Alice, em casa e até mesmo na formatação das imagens para a tese. Por ser esta pessoa admirável e tornar os meus dias mais felizes. Obrigada pela paciência e compreensão. Sem você também seria difícil finalizar este trabalho. Eu amo você.

À minha filha Alice, simplesmente por tornar meus dias mais leves e alegres. Por me fazer descobrir o que é amor incondicional. Por me estimular a ser uma pessoa melhor. Por tudo de mais maravilhoso que você trouxe desde o dia em que descobrimos que você iria chegar. Eu te amo mais que tudo nessa vida.

À Deus, por tudo. Especialmente pela força por ter chegado até aqui.

*“Tente
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez”
Raul Seixas – Tente outra vez*

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1	Dengue.....	1
1.1.1	Agente etiológico	1
1.1.2	Epidemiologia	6
1.1.3	Manifestações clínicas	9
1.1.4	Patogênese.....	11
1.1.4.1	Fatores virais	11
1.1.4.2	Fatores do hospedeiro.....	12
1.1.5	Plaquetas como efetores imunes e inflamatórios e seu potencial impacto na patogênese da dengue.....	18
1.2	Corpúsculos lipídicos.....	22
1.2.1	Características gerais, composição e funções	22
1.2.2	Biogênese	26
1.2.3	Envolvimento dos corpúsculos lipídicos na infecção por membros da família <i>Flaviviridae</i>	27
1.3	Hipótese e justificativa.....	33
2	Objetivos	35
2.1	Objetivo geral.....	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	Materiais e métodos	36
3.1	Voluntários	36
3.2	Cultura de células	36
3.3	Produção viral.....	37
3.3.1	Preparo dos estoques do DENV-2.....	37
3.3.2	Preparo do DENV-2 inativado	38
3.4	Titulação viral	38
3.5	Infecção viral <i>in vitro</i>	38
3.6	Tratamentos com inibidores específicos ou agonista proteico.....	39
3.7	PCR em tempo real (qRT-PCR).....	39

3.7.1 Para quantificação viral.....	39
3.7.2 Para análise da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico.....	40
3.8 Isolamento de plaquetas	41
3.9 Isolamento de monócitos	41
3.10 Ativação de plaquetas com agonista ou DENV <i>in vitro</i>	42
3.11 Interação plaqueta-monócito <i>in vitro</i>	42
3.12 Citometria de fluxo	42
3.13 Coloração e numeração dos corpúsculos lipídicos.....	43
3.13.1 Por tetróxido de ósmio	43
3.13.2 Por Oil Red O.....	43
3.13.3 Por sonda lipídica fluorescente (BODIPY).....	44
3.14 Localização subcelular de COX-2 por microscopia confocal	44
3.15 Dosagem de PGE₂	45
3.16 Dosagem de citocinas	45
3.17 Ensaio de permeabilidade endotelial em Transwell	46
3.18 Análise estatística.....	46
4 Resultados.....	47
4.1 Parte I: Biogênese e função dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo DENV-2 <i>in vitro</i>	47
4.1.1 O DENV-2, mas não o DENV-2 inativado, induz a biogênese de corpúsculos lipídicos em distintos tipos celulares <i>in vitro</i>	47
4.1.2 A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 é bloqueada por inibidores do metabolismo lipídico.....	52
4.1.3 A inibição da biogênese de corpúsculos lipídicos tem impacto sobre a replicação viral	56
4.1.4 O DENV-2 modula a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico....	57
4.1.5 O MIF induz a biogênese de corpúsculos lipídicos de forma similar ao DENV-2	59
4.1.6 O MIF, secretado durante a infecção, não é capaz de regular a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico	59

4.2 Parte II: Plaquetas ativadas com o DENV-2 modulam o metabolismo lipídico e a ativação de monócitos através da interação direta entre estas células e da sinalização mediada por citocinas inflamatórias	62
4.2.1 Plaquetas ativadas com o DENV-2 <i>in vitro</i> formam agregados com monócitos...	62
4.2.2 Plaquetas ativadas com o DENV-2 <i>in vitro</i> induzem a secreção de CXCL8/IL-8 por monócitos.....	64
4.2.3 Monócitos aumentam a ativação de plaquetas de forma recíproca.....	65
4.2.4 Plaquetas ativadas com o DENV-2 induzem a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos	67
4.2.5 Plaquetas ativadas pelo DENV-2 <i>in vitro</i> induzem a expressão de COX-2 em monócitos	71
4.2.6 A redução da formação de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito tem impacto sobre a secreção de PGE ₂ , mas não de CXCL8/IL-8	73
4.2.7 A interação com plaquetas ativadas pelo DENV-2 é necessária para sinalizar tanto a biogênese de corpúsculos lipídicos, quanto a secreção de mediadores inflamatórios por monócitos	76
4.2.8 O MIF, secretado por plaquetas ativadas com o DENV-2, está envolvido na biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos.....	77
4.2.9 O sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV-2 não é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos.....	81
4.2.10 A biogênese de corpúsculos lipídicos é maior nos agregados formados com plaquetas ativadas pelo DENV-2	86
5 Discussão	89
6 Conclusões	106
7 Referências bibliográficas	108
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XX
ABSTRACT	XXI

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura e organização do genoma do vírus dengue.....	2
Figura 1.2 Topologia e sítios de clivagem da poliproteína do vírus dengue na membrana do retículo endoplasmático.....	4
Figura 1.3 Ciclo de replicação do vírus dengue..	5
Figura 1.4 Distribuição global da dengue em 2014.....	6
Figura 1.5 Plaquetas ativadas aderem e sinalizam respostas funcionais nos monócitos.....	21
Figura 1.6. Corpúsculos lipídicos em células ativadas.....	23
Figura 1.7 HCV utiliza a maquinaria do hospedeiro a fim de promover a interação entre corpúsculos lipídicos e proteínas virais para facilitar a replicação viral.	29
Figura 4.1 Efeito do DENV-2 sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células HepG2 <i>in vitro</i> ..	48
Figura 4.2 Efeito do DENV-2 sobre a área de corpúsculos lipídicos em células Huh-7 <i>in vitro</i>	49
Figura 4.3 Efeito do DENV-2 sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células BHK-21 <i>in vitro</i> ..	50
Figura 4.4 Efeito do DENV-2 sobre a área de corpúsculos lipídicos em células A549 <i>in vitro</i> ..	51
Figura 4.5 Análise de corpúsculos lipídicos em células BHK-21 infectadas pelo DENV-2 <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de C75.....	53
Figura 4.6 Análise de corpúsculos lipídicos em hepatócitos infectados pelo DENV-2 <i>in vitro</i> e tratados com diferentes concentrações de C75.....	54
Figura 4.7 Análise quantitativa de corpúsculos lipídicos em células BHK-21 infectadas pelo DENV-2 <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de triacsin C.	55
Figura 4.8 Efeito de inibidores do metabolismo lipídico sobre a replicação do DENV-2.....	56
Figura 4.9 O DENV-2 é capaz de aumentar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico.....	57
Figura 4.10 Análise da expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios durante a infecção pelo DENV-2..	58
Figura 4.11 MIF induz a biogênese de corpúsculos lipídicos de forma similar ao DENV-2...	59
Figura 4.12 Papel do MIF secretado durante a infecção pelo DENV-2 sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico.....	60
Figura 4.13 Papel do MIF exógeno sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico.....	61

Figura 4.14 Formação de agregados plaqueta-monócito durante a infecção pelo DENV-2 <i>in vitro</i>	63
Figura 4.15 Plaquetas ativadas com dengue ou trombina modulam a secreção de CXCL8/IL-8 por monócitos..	64
Figura 4.16 Monócitos estimulam uma maior secreção de citocinas por plaquetas <i>in vitro</i>	66
Figura 4.17 Análise da formação de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito <i>in vitro</i>	68
Figura 4.18 Análise da formação de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas <i>in vitro</i> ..	70
Figura 4.19 Análise da imunomarcação de COX-2 e síntese de PGE ₂ em monócitos expostos a plaquetas ativadas <i>in vitro</i> ..	72
Figura 4.20 Efeito do C75 sobre a formação de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito <i>in vitro</i> ..	74
Figura 4.21 Efeito do C75 sobre a secreção de mediadores inflamator�os por monócitos expostos a plaquetas ativadas <i>in vitro</i>	75
Figura 4.22 A intera�o com plaquetas ativadas é importante para a formação de corpúsculos lipídicos e secreção de CXCL8/IL-8 por monócitos.	76
Figura 4.23 Plaquetas ativadas com o vírus dengue ou trombina <i>in vitro</i> secretam MIF..	78
Figura 4.24 Efeito do MIF sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito <i>in vitro</i> ..	79
Figura 4.25 Papel do MIF sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas <i>in vitro</i> ..	80
Figura 4.26 O sobrenadante de plaquetas ativadas não promove a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos.....	82
Figura 4.27 O sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV-2 não promove o aumento em número e tamanho de corpúsculos lipídicos em monócitos.	83
Figura 4.28 O sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV-2 induz aumento de permeabilidade endotelial por mecanismos dependentes de MIF.	84
Figura 4.29 Plaquetas ativadas não aumentam a secreção de MIF por monócitos.	85
Figura 4.30 A biogênese de corpúsculos lipídicos � maior nos agregados formados por plaquetas ativadas.....	87
Figura 4.31 DENV-2 ou trombina não induzem a formação de corpúsculos lipídicos em plaquetas.....	88

Figura 5.1 Modelo proposto para a biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus dengue..	104
Figura 5.2 Modelo proposto para explicar o papel de plaquetas estimuladas com o DENV sobre a ativação dos monócitos, durante a formação dos agregados plaqueta-monócito.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ACAT1	Acetil-Coa acetiltransferase 1
ACSL	Acil-CoA sintetase de cadeia longa
ADE	Amplificação dependente de anticorpos
ADP	Difosfato de adenosina
ADRP	Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AO	Ácido oleico
Apo	Apolipoproteína
ARF	Fator de ribosilação do ADP
ATP	Trifosfato de adenosina
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
BHK	Rim de hamster bebê
C	Proteína do capsídeo
CCL	Ligante de quimiocina (motivo C-C)
CCR	Receptor de quimiocina (motivo C-C)
CD	Grupamento de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CL	Corpúsculos lipídicos
CLEC-5	Lectina do tipo C 5
CM	Membranas convolutas
CoA	Coenzima A
COP	Do inglês <i>Coat protein</i>
COX	Ciclooxigenase
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
Ct	Ciclo limiar
CXCL	Ligante de quimiocina (motivo C-X-C)
DAGs	Diacilgliceróis
DC-SIGN	Não-integrina acoplada a ICAM-3 específica de célula dendrítica
DENV	Vírus dengue

DENVi	Vírus dengue inativado
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dsRNA	RNA de fita dupla
E	Proteína do envelope
ELISA	Do inglês <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FABP-4	Proteína ligante de ácido graxo-4
FAZ	Ácido graxo sintase
FASN	Gene que codifica a FAS
Fc	Região do fragmento cristalizável
Fc γ R	Receptor para Fc gama de IgG
FD	Febre da dengue
FGF- β	Fator básico de crescimento de fibroblasto beta
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GBF1	Do inglês <i>Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1</i>
GBV-B	Vírus GB B
GDP	Difosfato de guanosina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GRP	Proteína regulada por glicose
GTPase	Guanosina trifosfatase
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HSP	Proteínas de choque térmico
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFITMs	Proteínas transmembranares induzidas por IFN
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina

IL	Interleucina
IL-1RA	Antagonista do receptor de IL-1
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
L	Leucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LO	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LXR	Receptor X do fígado
M	Proteína de membrana
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MBL	Lectina ligante de manose
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos do tipo 1
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos 1
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
NK	Exterminadora natural
NO	Óxido nítrico
NS	Proteína não estrutural
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
ORF	Fase aberta de leitura
ORO	Oil Red O
OxLDL	LDL-oxidada
p38	Proteína citocinina de ligação específica
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAHO	Do inglês <i>Pan American Health Organization</i>
PAI-1	Inibidor da ativação de plasminogênio 1
PAT	<u>Perilipina</u> , <u>Adipofilina</u> , <u>TIP47</u>
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PF4	Fator plaquetário 4
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosolipase C
PLIN	Perilipinas
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
prM	Proteína pré-membrana
PRP	Plasma rico em plaquetas
PSGL-1	Glicoproteína ligante de P-selectina 1
qRT-PCR	Do inglês <i>Real time quantitative reverse transcription polimerase chain reaction</i>
Rab	Proteínas G monoméricas da superfamília Ras
RANTES	Regulada sob ativação, normalmente expressa e secretada por células T
RC	Complexo de replicação
RE	Retículo endoplasmático
rhMIF	MIF recombinante humano
RNA	Ácido ribonucleico
SCD	Síndrome de choque por dengue
SEs	Ésteres de colesterol
SFB	Soro Fetal Bovino
SNARE	Do inglês <i>Soluble NSF attachment receptor</i>
SREBP	Do inglês <i>Sterol-regulatory-element-binding protein</i>
ssRNA	RNA de fita única
TAGs	Triacilgliceróis
TGF	Fator de crescimento e transformação
TIP47	Proteína de interação de porção terminal de 47 kDa
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

VP Do inglês *Vesicle Packets*
WHO Do inglês *World Health Organization*

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MECANISMOS DE BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

GISELLE BARBOSA DE LIMA

A dengue é caracterizada como a principal arbovirose humana, representando um grave problema de saúde pública. A superativação de células do sistema imune pode ser destacada como um dos fatores envolvidos na progressão da doença para as formas mais graves. Embora os monócitos sejam reconhecidos como importante fonte de citocinas, a participação das plaquetas na patogênese da dengue permanece pouco explorada. Recentemente, nosso grupo mostrou a contribuição da interação plaqueta-monócito na resposta inflamatória observada durante a dengue. De fato, o papel das plaquetas na resposta imune e inflamatória é cada vez mais frequente. Dentro deste contexto, foi proposto que plaquetas ativadas por estímulo específico sinalizam para mudanças fenotípicas nos monócitos, incluindo a diferenciação em células espumosas que é caracterizada pelo aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos (CL) – organelas citoplasmáticas dinâmicas ricas em lipídios relacionadas a processos inflamatórios e infecciosos. Nossos estudos prévios demonstraram um aumento da biogênese de CL tanto em leucócitos isolados de pacientes com a forma grave da doença quanto em células infectadas com o vírus dengue (DENV) *in vitro*, com participação na localização da proteína do capsídeo viral e na produção de partículas virais infecciosas. Entretanto, os mecanismos que regulam a biogênese e a função destas organelas durante a infecção pelo DENV precisam ser melhor caracterizados. Assim, pretende-se com este trabalho (i) analisar os mecanismos que levam à biogênese de CL em distintos tipos celulares infectados com o DENV *in vitro*; (ii) estudar os efeitos de plaquetas ativadas com o DENV *in vitro* sobre a imunomodulação dos monócitos, no que diz respeito, principalmente, à formação de CL; (iii) investigar o efeito de drogas que atuam na gênese de CL e o seu impacto na replicação viral e na secreção de mediadores inflamatórios. Inicialmente, nossos resultados demonstram um aumento na formação e/ou tamanho de CL em distintos tipos celulares infectados *in vitro*, de uma maneira dependente da integridade viral, visto que o vírus inativado por aquecimento falhou em induzir a biogênese destas organelas. Observamos que a modulação da lipogênese e da formação de CL afetam a capacidade replicativa do vírus. Além disso, constatamos que o DENV é capaz de modular positivamente a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios, de forma independente do MIF – citocina que induz a gênese de CL em monócitos – secretado durante a infecção. Na segunda parte deste estudo, observamos que plaquetas ativadas com o DENV *in vitro* rapidamente formam agregados com monócitos quando comparado com plaquetas estimuladas com mock. Adicionalmente, plaquetas ativadas com o DENV sinalizam para que monócitos aumentem a expressão de COX-2 e a secreção de PGE₂ e CXCL8/IL-8. De forma recíproca, observamos que estas células contribuem para uma maior ativação das plaquetas, que então secretam níveis elevados de CCL5/RANTES e CXCL4/PF4. Em seguida, constatamos que plaquetas ativadas com o DENV *in vitro* são capazes de promover a biogênese de CL em monócitos, de uma maneira dependente da enzima ácido graxo sintase. Ao utilizarmos o C75, inibidor desta enzima, também observamos uma redução nos níveis de PGE₂, mas não de CXCL-8/IL-8, sugerindo um papel dos CL na produção deste mediador lipídico. O MIF, secretado durante a ativação de plaquetas pelo DENV *in vitro*, também está envolvido na sinalização que culmina na formação de CL em monócitos expostos a plaquetas ativadas. De forma surpreendente, o sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV não induz a biogênese de CL em monócitos, sugerindo a importância do contato direto entre essas células. De fato, a interação com plaquetas ativadas mostrou-se crucial para que os monócitos respondam funcionalmente, incluindo a secreção de mediadores inflamatórios e o aumento da formação de CL. Por fim, a biogênese destas organelas é maior nos agregados formados com plaquetas ativadas com o DENV, corroborando esta hipótese. Sendo assim, esses dados fortemente sugerem que a interação direta com plaquetas ativadas com o DENV seja crucial para que os monócitos respondam com funções específicas e contribuam para a patogênese da doença. Portanto, o conjunto dos resultados obtidos nos revela a importância em estabelecer estratégias terapêuticas adequadas para controlar a resposta do hospedeiro frente à infecção, onde a própria modulação dos CL possa vir a representar um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dengue.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**MECANISMOS DE BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS
DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE**

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

GISELLE BARBOSA DE LIMA

Dengue is characterized as the most important arthropod-borne human viral disease worldwide, representing a public health problem. Increased activation of immune cells could be involved in the progression of disease to severe forms. Although monocytes have been recognized as important sources of cytokines, the role of platelets in dengue pathogenesis remains understood. Recently our group showed the contribution of platelet-monocyte interaction to inflammatory responses observed in dengue. In fact, it is becoming increasingly clear that platelets have inflammatory functions and can influence innate response. Evidences suggest that specific stimuli-activated platelets can promote phenotypic changes in monocytes, including enhanced foam cell formation, that is characterized by an increase in lipid droplets (LD) – dynamic cytoplasmic lipid-rich organelles, associated to inflammatory and infectious conditions – biogenesis. Our previous works showed a significant increase in LD accumulation in leukocytes from dengue hemorrhagic fever patients, as well as in different cell types infected *in vitro*. Besides, these organelles were involved in capsid protein localization and virus particle morphogenesis. However, the mechanisms involved in LD biogenesis and function during dengue virus (DENV) infection still unclear. Therefore, this study aim to (i) investigate the mechanisms related to LD formation in distinct cell types during DENV infection; (ii) evaluate the roles of DENV-activated platelets on monocytes immunomodulation *in vitro*, focusing on LD biogenesis; (iii) analyze the effects of drugs that abrogate LD formation and your impact on viral replication and secretion of inflammatory mediators. Our results demonstrate a significant increase in LD number and/or area in distinct cell types infected *in vitro*. Importantly, heat inactivated DENV failed to induce LD biogenesis *in vitro*. Besides, modulation of lipogenesis and LD formation, by C75- or triacsin C-treated cells, impair DENV replication. We also observe that DENV is able to modulate genes involved in lipid metabolism, in a MIF – cytokine that induces LD genesis in monocytes – independent fashion. In the second part of this study, we show that platelets exposed to DENV *in vitro* form aggregates with monocytes and activate signaling cascade in these cells, which culminates in CXCL8/IL-8 secretion. In addition, platelet-monocyte aggregates formation reciprocally increase platelet activation, observed by an enhanced production of CCL5/RANTES and CXCL4/PF4. DENV-activated platelets increase LD formation and COX-2 activation in monocytes, leading to secretion of PGE₂. Damping LD biogenesis through treatment with the fatty acid synthase (FAS) inhibitor C75 prevents PGE₂, but not CXCL8/IL-8, secretion by platelet-monocyte aggregates. We also demonstrate that DENV-activated platelets secrete high levels of MIF. LD formation in monocytes exposed to DENV-activated platelets is partially dependent on platelet-derived MIF. However, the supernatant from DENV-activated platelets is not sufficient to induce LD biogenesis in monocytes. Finally, LD formation is higher in monocytes which have platelets adhered on surface compared to monocytes that do not contact platelets, suggesting that beyond soluble mediators, platelet adhesion is a major event in platelet-mediated modulation of lipid metabolism in monocytes. Thus, our results indicate that DENV infection promotes LD biogenesis and that this event seems to be dependent of host lipid metabolism, since specific inhibition of enzymes involved in lipogenesis blocks the formation of these organelles. This inhibition also leads to decreased DENV replication, suggesting a role of LD in this process. Moreover, our data provide new evidence that DENV-activated platelets modulate LD formation as well as cytokine signaling in monocytes, during cellular aggregates formation, and these events may contribute to dengue pathogenesis. Therefore, the modulation of LD formation might represent an attractive therapeutic target for dengue.

1. Introdução

1.1 Dengue

1.1.1 Agente etiológico

No final do século passado, a população mundial deparou-se com a ressurgência de diversas doenças infecciosas, sendo a dengue a mais importante em termos de morbidade e mortalidade (Guzmán e Kourí 2002; PAHO e WHO 2014). A dengue, antes considerada uma doença esporádica, é hoje caracterizada como um grave problema de saúde pública com efeitos econômicos e sociais substanciais; principalmente devido ao aumento na extensão geográfica e, conseqüentemente, no número de casos, bem como à gravidade da doença (Guzman e Harris 2015).

O agente etiológico da doença é o vírus dengue (DENV), um membro pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* do qual são conhecidos pelo menos quatro sorotipos classificados como DENV-1 a 4 (Guzmán e Kourí 2002; Pierson e Diamond 2013). A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos pode ser assintomática ou causar doença de intensidade variada, desde uma doença febril auto-limitada (dengue branda ou clássica) até quadros graves com alterações de permeabilidade vascular, sangramentos e choque, podendo evoluir para o óbito (WHO 2009).

O DENV-1 foi primeiramente isolado durante a Segunda Guerra Mundial, no Pacífico, por investigadores japoneses e americanos. Em seguida, um grupo de pesquisa encontrou uma cepa de vírus proveniente da Nova Guiné, antígenicamente distinta da cepa isolada anteriormente, que, portanto, foi designada como DENV-2. O DENV-3 e DENV-4 foram isolados na década de 50 durante uma epidemia nas Filipinas (Mackenzie et al. 2004; Gould e Solomon 2008). Desde então, milhares de vírus provenientes dos trópicos foram isolados e apenas no ano de 2013 foi documentado um novo sorotipo do DENV. Inicialmente acreditava-se que este poderia ser uma cepa variante do DENV-4, todavia testes específicos em macacos rhesus sugeriram ser um sorotipo inexistente. O DENV-5 foi detectado durante uma epidemia em Sarawak, Malásia, em 2007. No entanto, pesquisadores da área mostram-se céticos quanto a esta descoberta e indicam que estudos são necessários para determinar se esse vírus é realmente um sorotipo diferente ou se é uma cepa variante de um dos quatro sorotipos já descritos (Normile 2013; Mustafa et al. 2015).

O DENV maduro (infeccioso) possui aproximadamente 50 nm de diâmetro e é composto por nucleocapsídeo, que consiste do RNA genômico em conjunto com múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C), envolto por uma bicamada lipídica proveniente da célula

hospedeira. Na sua superfície estão presentes a glicoproteína E (envelope) e a proteína M (membrana) (Pierson e Diamond 2013). O genoma viral, com cerca de 11 kb, é uma fita simples de RNA de polaridade positiva e apresenta uma única fase aberta de leitura (ORF), que codifica para uma poliproteína precursora (figura 1.1). Esta é posteriormente clivada por uma combinação de proteases viral e do hospedeiro em três proteínas estruturais (C, prM e E), que constituem a partícula viral, e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), envolvidas na replicação e montagem do vírus bem como na modulação da resposta do hospedeiro (Chambers et al. 1990; Pierson e Diamond 2013).

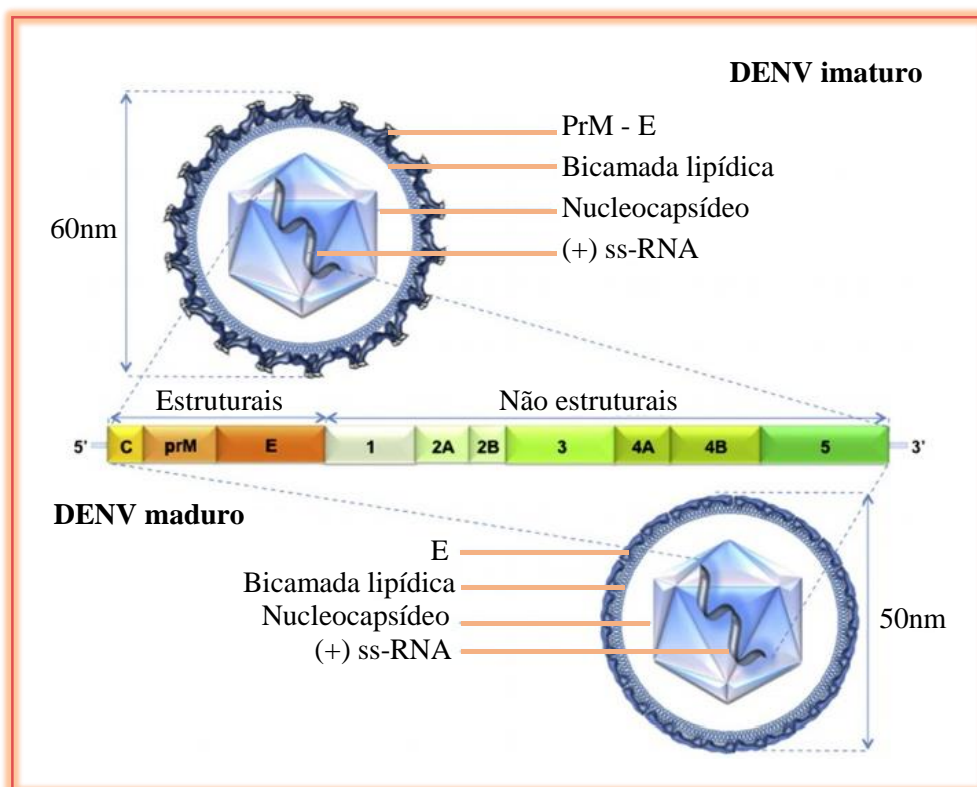


Figura 1.1 Estrutura e organização do genoma do vírus dengue. Representação esquemática da partícula viral imatura (acima) e da partícula viral madura (abaixo). A única fase aberta de leitura (ORF), flanqueada pelas regiões não codificantes 5' e 3', codifica para as proteínas estruturais (C, prM e E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Adaptada de Herrero et al. 2013).

O ciclo de replicação inicia-se quando o DENV infecta uma célula hospedeira permissiva. Através de estudos realizados com espécimes obtidos de pacientes com dengue, observou-se a presença de RNA ou antígenos virais em diversos tecidos e órgãos, tais como fígado, baço, cérebro, linfonodo, rim, pulmão, coração, medula óssea e pele (Boonpucknavig et al. 1979; Bhoopat et al. 1996; Miagostovich et al. 1997; de Araújo et al. 2009). *In vitro*, o DENV pode infectar uma variedade de células humanas, como monócitos/macrófagos, hepatócitos, linfócitos, células dendríticas, endoteliais, neuronais e também diversas linhagens

celulares. Da mesma forma, o vírus também é capaz de infectar diversas células de mamíferos, incluindo primatas e camundongos, *in vivo* (Halstead 1979; Henchal e Putnak 1990; Clyde et al. 2006; Samsa et al. 2009; Assunção-Miranda et al. 2010; Chan et al. 2015).

O reconhecimento do DENV pela célula alvo se dá através da interação entre as proteínas de superfície viral e componentes da membrana plasmática. Estudos indicam que os fatores de ligação, como glicosaminoglicanos e glicoesfingolipídios, presentes na superfície celular, são responsáveis pelo primeiro contato com o vírus (Grove e Marsh 2011; Cruz-Oliveira et al. 2014). Dentre essas moléculas, o heparan sulfato foi descrito como indispensável para a adsorção viral na célula hospedeira (Chen et al. 1997). Essa interação ocorre de maneira não específica e concentra o vírus na superfície celular, facilitando, assim, a ligação ao receptor que promoverá a entrada do DENV na célula.

Embora um receptor específico para o DENV ainda não foi identificado, um número de candidatos foi descrito (Hidari e Suzuki 2011). Evidências sugerem que o receptor DC-SIGN esteja envolvido na infecção de células dendríticas pelo DENV (Navarro-Sanchez et al. 2003; Tassaneetrithep et al. 2003). Além deste, foi proposto a interação com outras moléculas, incluindo o receptor para manose (Miller et al. 2008), a proteína regulada por glicose (GRP) 78 (Jindadamrongwech et al. 2004), o receptor para lipopolissacarídeo (LPS) CD14 (Chen et al. 1999), proteínas de choque térmico (HSP) 70 e 90 (Reyes-Del Valle et al. 2005), receptores de fosfatidilserina TIM e TAM (Meertens et al. 2012), dentre outros (Cruz-Oliveira et al. 2014).

A maioria das pesquisas demonstraram que a internalização do DENV ocorre por endocitose mediada pela rede de clatrina (Krishnan et al. 2007; van der Schaar et al. 2007). Porém, já foi constatada a entrada por uma via endocítica não clássica, dependente de dinamina, ou por macropinocitose (Acosta et al. 2009; Suksanpaisan et al. 2009; Meertens et al. 2012). O ambiente ácido do endossoma induz mudança conformacional na glicoproteína E, promovendo a fusão entre as membranas viral e endossomal, o que culmina na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (Mukhopadhyay et al. 2005; Melo et al. 2009). Estudos recentes sugerem que a proteína C coopere com a glicoproteína E e esteja, portanto, diretamente envolvida na translocação do RNA do DENV para o citosol (Freire et al. 2013, 2014).

Uma vez no citoplasma da célula, o RNA viral atua como RNA mensageiro (mRNA) e é traduzido em uma poliproteína precursora. Esta permanece ancorada à membrana do retículo endoplasmático (RE) onde é co- e pós-traducionalmente clivada, por proteases viral e do hospedeiro, em três proteínas estruturais e sete não estruturais (figura 1.2). Evidências sugerem que a tradução ocorra em compartimentos de membrana induzidos pelo DENV,

denominados membranas convolutas (CM) (figura 1.3 B) (Mukhopadhyay et al. 2005; Clyde et al. 2006; Welsch et al. 2009).

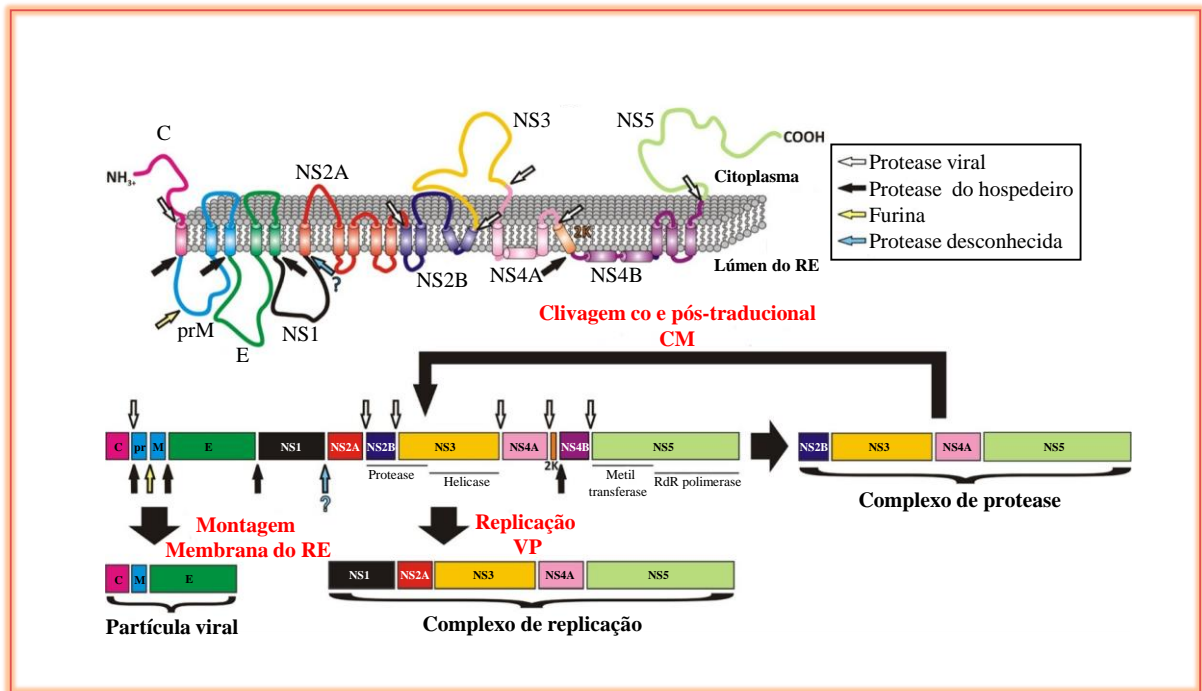


Figura 1.2 Topologia e sítios de clivagem da poliproteína do vírus dengue na membrana do retículo endoplasmático. O RNA do DENV é traduzido em uma poliproteína precursora que permanece ancorada à membrana do RE, onde é clivada por proteases viral e celulares (setas) originando dez proteínas virais. As glicoproteínas prM e E são liberadas da poliproteína através da ação da sinalase (seta preta) no RE, porém permanecem ancoradas na parte luminal da membrana. A sequência sinal da proteína C é clivada pela serina protease NS3 e seu cofator NS2B (seta branca). Durante a maturação da partícula viral, a glicoproteína prM é processada pela furina (seta amarela) originando o peptídeo pr e a proteína M. As proteínas NS são clivadas principalmente pela protease viral no citoplasma, com exceção da NS1 que é liberada da NS2A por uma protease desconhecida (seta azul) no lúmen do RE. NS2A/2B e NS4A/4B ficam ancoradas no RE como proteínas transmembranares. Durante o processamento da poliproteína ocorre a formação de diferentes complexos (complexo de protease e complexo de replicação) em compartimentos celulares específicos (membranas convolutas (CM) e *vesicle packets* (VP), respectivamente), a fim de facilitar a replicação do DENV (Adaptada de Perera e Kuhn 2008; Assenberg et al. 2009).

A replicação dos flavivírus também se dá em estruturas de membrana, induzidas pelo vírus, conhecidas como complexo de replicação (RC). Este é composto por RNA viral, proteínas virais e provavelmente fatores do hospedeiro. Acredita-se que o RC seja eficiente por ancorar a maquinaria de replicação em compartimentos de membrana e/ou por proteger este processo dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Estudos de microscopia eletrônica constataram que essas alterações de membrana possuem diferentes morfologias e indicaram que o possível local de replicação viral seja nos *vesicle packets* (VPs) (figura 1.3 B). Após a tradução, a proteína NS5 (RNA polimerase dependente de RNA), encontrada nos VPs, produz

o RNA viral de polaridade negativa, que atua como molde para a síntese de novas cópias de polaridade positiva. Estas, por sua vez, podem ser empacotadas em partículas virais ou servir como mRNA (Mackenzie et al. 1996; Grief et al. 1997; Fernandez-Garcia et al. 2009; Welsch et al. 2009; Junjhon et al. 2014).

A montagem do DENV ocorre no lúmen do RE em proximidade aos poros dos VPs, local por onde o genoma viral é liberado (Welsch et al. 2009). Recentemente, nós demonstramos que o acúmulo da proteína C nos corpúsculos lipídicos – organelas citoplasmáticas dinâmicas ricas em lipídios (para maiores informações ver capítulo 1.2) – é necessário para a produção eficiente da partícula viral; todavia, o papel dos corpúsculos lipídicos neste processo ainda precisa ser investigado (Samsa et al. 2009). O local e o mecanismo pelo qual a proteína C recruta o RNA viral para formação do nucleocapsídeo ainda não foram elucidados, mas é possível que, para isto, o genoma do DENV possa interagir com a C na superfície dos corpúsculos lipídicos. O nucleocapsídeo, por sua vez, é empacotado em uma bicamada lipídica derivada do RE, contendo heterodímeros das glicoproteínas prM e E. Após transporte pela via secretória do hospedeiro, a maturação viral se dá na rede trans-Golgi através da clivagem, mediada por furina, da prM em M. Por fim, as partículas virais são liberadas no meio extracelular por exocitose (figura 1.3 A) (Fernandez-Garcia et al. 2009).

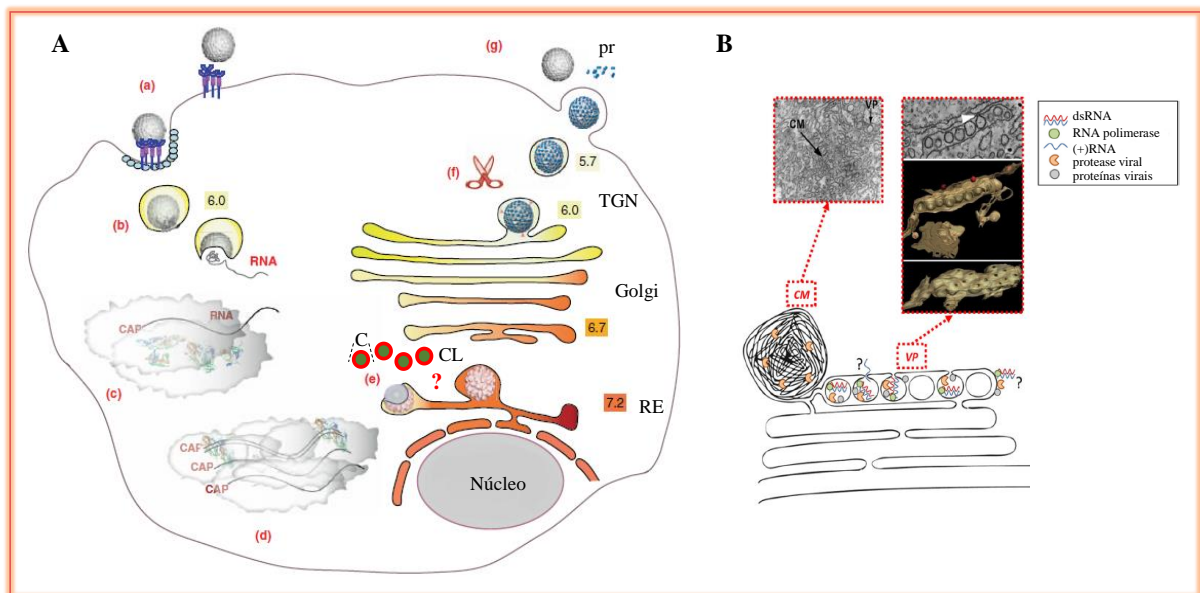


Figura 1.3 Ciclo de replicação do vírus dengue. (A) O DENV se liga tanto a fatores de ligação quanto aos receptores e é internalizado por endocitose mediada por estes (a). O ambiente ácido no interior do endossoma induz fusão entre as membranas viral e do hospedeiro, resultando na liberação do genoma viral no citoplasma celular (b). O RNA viral é traduzido em uma poliproteína precursora, que é processada por proteases viral e do hospedeiro, dando origem a 10 proteínas virais. Estes eventos ocorrem em compartimentos de membrana induzidos pelo DENV (CM) (c). Após a tradução, o RC é montado, em estruturas de membrana induzidas pelo vírus (VP), dando início à replicação do DENV. Há a transcrição do RNA (+) em RNA (-), que atua como molde para a síntese de novas cópias de RNA (+). Estas podem servir como mRNA ou ser empacotadas em partículas virais (d). O

empacotamento ocorre na superfície do RE, seguido por brotamento das proteínas estruturais e RNA (+) no lúmen do RE. O acúmulo da proteína C na superfície dos corpúsculos lipídicos (CL) é importante para a formação eficiente de partículas virais (e). Os vírus imaturos resultantes são transportados pelo trans-Golgi, onde a furina medeia a clivagem da prM em M gerando partículas infecciosas maduras (f), que são liberadas por exocitose (g) (adaptado de Perera et al. 2008; Fernandez-Garcia et al. 2009). (B) Representação esquemática dos compartimentos de membrana (VP e CM), derivados do RE, induzidos pelo DENV. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (VP e CM) e a reconstrução 3D (VP) também são mostradas. Acredita-se que o poro identificado em cada vesícula atue como sítio de liberação de RNA viral sintetizado. A possibilidade de replicação do genoma do DENV no lado citosólico do VP não foi excluída (Adaptada de Welsch et al. 2009; Rodenhuis-Zybert et al. 2011; Chatel-Chaix e Bartenschlager 2014).

1.1.2 Epidemiologia

A dengue é hoje a principal arbovirose humana (PAHO e WHO 2014). Segundo registros da Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência da dengue aumentou cerca de 30 vezes nos últimos 50 anos (WHO 2009). Atualmente, cerca de 4 bilhões de pessoas vivem em áreas onde há risco de transmissão, que ocorre em mais de 125 países da faixa tropical, nas quais a Ásia e as Américas são consideradas as zonas de maior risco (figura 1.4) (Bhatt et al. 2013; Messina et al. 2015). Estimativas recentes indicam que o DENV causa 390 milhões de infecções por ano, sendo 96 milhões sintomáticas. Além da expansão das regiões afetadas e do número de casos, um aumento significativo na incidência de dengue grave é observado. Aproximadamente 500 mil pessoas, principalmente crianças, são hospitalizadas anualmente com a forma grave da doença, com uma taxa de mortalidade de 2,5% (Bhatt et al. 2013; WHO 2015).

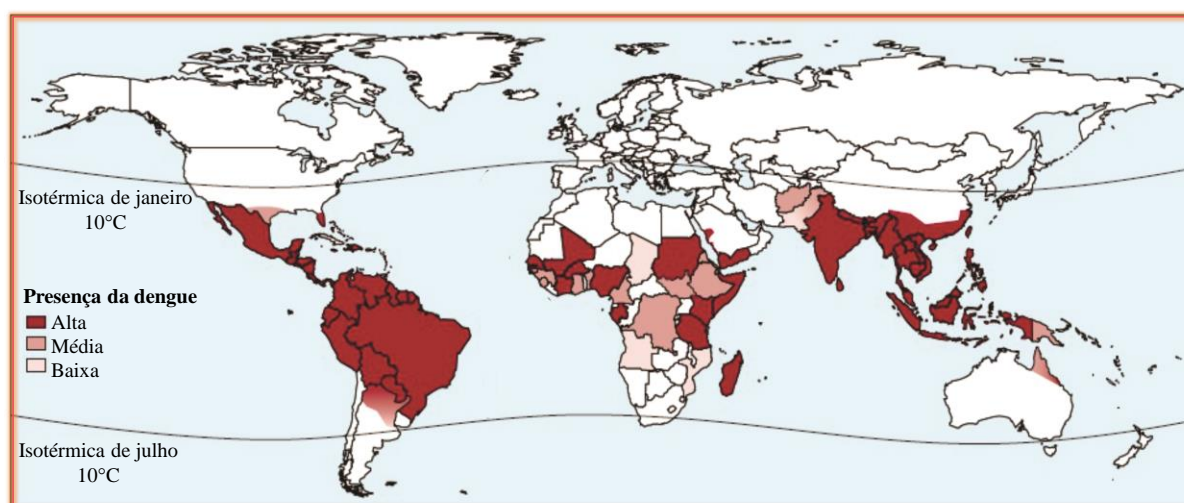


Figura 1.4 Distribuição global da dengue em 2014. Áreas com alta, média e baixa probabilidade de ocorrência da dengue são mostradas no mapa (Adaptada de Guzman e Harris 2015).

Algumas espécies de mosquitos do gênero *Aedes* atuam como agentes transmissores da dengue. O *A. aegypti*, na maioria dos casos, é considerado o principal vetor na área urbana

e o *A. albopictus* está mais relacionado ao ciclo silvestre, que ocorre nas florestas do sudeste asiático e do oeste africano, envolvendo primatas (Gubler 1998a; Kyle e Harris 2008). Para que haja transmissão, a fêmea do mosquito *Aedes* spp. deve picar um indivíduo infectado durante a fase virêmica da doença. Após o repasto sanguíneo ocorre o período de incubação extrínseco, com duração de 8-12 dias, tornando o mosquito infectado e, portanto, transmissor do DENV (McBride e Bielefeldt-Ohmann 2000). Por consequência, ao picar um indivíduo saudável ocorre a infecção do mesmo, promovendo o período de incubação intrínseco com duração média de 4,5-7 dias (Halstead 2008). O ciclo se repete quando mosquitos não infectados se alimentam de um indivíduo nesta fase.

Até o ano de 1950, a transmissão urbana da dengue era remota. As alterações ecológicas decorrentes da Segunda Guerra Mundial contribuíram para a disseminação tanto do vetor quanto do vírus, favorecendo a ocorrência de epidemias em diversos países do sudeste asiático nas décadas de 50 e 60. Na década de 70, o desenvolvimento econômico associado ao crescimento populacional, à urbanização descontrolada e à falta de controle efetivo do vetor foram importantes na dispersão da doença por toda a região. A circulação de mais de um sorotipo na Ásia, em conjunto ao intenso movimento de pessoas infectadas através de viagens aéreas internacionais, propiciaram a distribuição do DENV e mosquito durante as décadas de 70 e 80 para as ilhas do Pacífico e a América tropical (Halstead 1988; Gubler 1998b; Wilder-Smith e Gubler 2008; Ooi e Gubler 2009).

Nas décadas de 50 e 60, a maioria dos países da América do Sul e Central adotaram campanhas de erradicação do mosquito *A. aegypti*. Estas foram coordenadas pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), que embora dirigidas para o controle da febre amarela, proporcionaram também a eliminação da dengue. No entanto, na década de 70, devido ao surgimento de outras prioridades e à redução de recursos, o programa de erradicação foi interrompido e essa espécie voltou a infestar a maioria desses países tropicais. Apesar das mudanças epidemiológicas terem sido mais dramáticas nas Américas, o número de casos da doença também aumentou nas ilhas do Pacífico e Caribe. Este aumento foi seguido pelo surgimento de epidemias e formas graves, além de hiperendemicidade (Gubler 1998a, 1998b; Mackenzie et al. 2004).

Durante a década de 2000 a 2010, mais de 5 milhões de casos de dengue foram notificados no Brasil. Foi alarmante observar aproximadamente 700 mil casos em 2002 e 2008, e mais de 1 milhão de casos em 2010 (Teixeira et al. 2013). Ainda em 2002, foram registrados cerca de 2.600 casos de febre hemorrágica da dengue (FHD), culminando em 150 óbitos. Em 2008, aproximadamente 4.500 casos de FHD foram reportados, com 561 óbitos. Já

em 2010, cerca de 3.700 casos de FHD foram notificados, com aumento no número de óbitos para 656 (SES/SINAN 2014a, 2014b).

De forma semelhante às grandes epidemias da década anterior, foram observadas altas taxas de incidência e mortalidade no ano de 2011. Segundo a OPAS, foram notificados, em 2011, 764.032 casos de dengue, 10.545 casos de dengue grave e 482 mortes. As epidemias dos anos de 2012, 2013 e 2014 foram associadas à reintrodução do DENV-4; contudo, houve a redução dos números de casos graves e de óbitos por dengue. Em 2012, foram registrados 996 casos de FHD com 121 óbitos. Já em 2013, foram notificados 1.297 casos de FHD com 235 óbitos (PAHO 2010; SES/SINAN 2014a, 2014b). Por fim, em 2014 foram reportados ao Ministério da Saúde 689 casos de dengue grave e 410 óbitos (MS/SVS 2014).

Apesar da aparente redução na gravidade da dengue nos três últimos anos, a situação no Brasil ainda é preocupante. Com a cocirculação dos quatro sorotipos no país e a imunização natural da população mediante infecções seguidas pelos diferentes sorotipos, uma tendência à infecção de pessoas cada vez mais jovens e com manifestações clínicas cada vez mais graves é observada (Teixeira et al. 2013). Em 2015, até a semana epidemiológica 34 (04/01/15 a 29/08/15), foram confirmados 1.284 casos de dengue grave; sendo que para o mesmo período de 2014, apenas 664 de casos graves haviam sido comprovados. Além disso, foram registrados 693 óbitos por dengue, representando um aumento no país de 70% em comparação ao mesmo período de 2014, quando foram confirmados 407 óbitos. As proporções dos sorotipos circulantes foram determinadas e foi constatada a predominância do DENV-1 (93,37%) sobre os demais – DENV-4 (5,43%), DENV-2 (0,75%) e DENV-3 (0,45%) (MS/SVS 2015).

Com o aumento na incidência de casos graves e a expansão geográfica do vírus e do vetor, as estratégias para a prevenção e controle da dengue tornaram-se mais urgentes. No entanto, até o momento, não são conhecidas terapias antivirais específicas e apenas tratamento de suporte é oferecido aos pacientes com a doença (Gubler 1998b; WHO 2009). Assim, o controle tem focado na redução da população do seu principal vetor, o mosquito *A. aegypti*; porém, esta estratégia não conseguiu conter a transmissão e o avanço da dengue como um dos principais agravos das faixas tropical e subtropical (Gubler 1998a). Pesquisas mais recentes indicam que a eliminação genética do vetor, através da introdução de mutações letais nas populações de mosquito e controle da reprodução pela liberação de machos estéreis transgênicos, é uma estratégia promissora para conter a doença (Harris et al. 2011; Wise de Valdez et al. 2011).

Enquanto vacinas contra outros flavivírus, incluindo os vírus da febre amarela e da encefalite japonesa, já foram desenvolvidas, as vacinas contra o DENV ainda estão sobre

intensa investigação (Gould e Solomon 2008). Evidências sugerem que vacinas capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos serão eficazes na prevenção da doença. Desta forma, este requerimento em associação ao desenvolvimento de uma imunidade duradoura, bem como o entendimento parcial da patogênese da doença, constituem os maiores desafios para a produção de vacinas efetivas contra a dengue (Herrero et al. 2013). Vale ressaltar que nos últimos anos houve um grande progresso e diversas vacinas de vírus vivo (atenuado, quimérico e vetor viral) e não-vivo (inativado, subunidade recombinante e DNA) foram desenvolvidas e algumas delas já completaram os estudos de fase clínica I e II (Sun et al. 2009, 2013; Guy et al. 2011; Osorio et al. 2011; Sabchareon et al. 2012; Herrero et al. 2013). Contudo, o candidato vacinal em estágio mais avançado não ofereceu proteção contra o DENV-2 (Sabchareon et al. 2012). Sendo assim, estudos que visam entender os mecanismos patogênicos envolvidos nos quadros de dengue, em especial nos casos de dengue grave, são de extrema importância para o estabelecimento de novos alvos terapêuticos e melhor manejo clínico da doença.

1.1.3 Manifestações clínicas

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV pode resultar em formas assintomáticas ou subclínicas, além de um amplo espectro de gravidade da doença. Após o período de incubação, que varia de 4 a 7 dias, a dengue surge abruptamente e é seguida por três fases: febril, crítica e de recuperação.

Inicialmente, os pacientes manifestam febre alta, com duração de 2 a 7 dias, acompanhada geralmente de dor de cabeça, mialgia, artralgia, prostração, náuseas e vômitos. A defervescência, na maioria dos casos entre os dias 3 – 7 da doença, marca o início da fase crítica, caracterizada por hemoconcentração, hipotensão, leucopenia e plaquetopenia. A partir da redução da temperatura para 37,5 – 38°C ou menos, no caso de ausência de aumento importante na permeabilidade vascular, o paciente evolui com melhora clínica. Em contrapartida, alterações significativas na permeabilidade vascular podem levar ao extravasamento grave de plasma (com efusão pleural, ascite, choque e/ou comprometimento orgânico decorrente da hipoperfusão) e o paciente, portanto, evolui para dengue grave. Vale ressaltar que manifestações hemorrágicas podem ser observadas tanto na dengue clássica quanto na dengue grave, entretanto hemorragias importantes são mais comumente observadas nos quadros graves. Finalmente, a fase de recuperação (convalescência) é marcada pela melhora do estado geral do paciente, acompanhado por estabilização ou redução do hematócrito, aumento progressivo da contagem de plaquetas e reabsorção do líquido extravasado (WHO 2009).

Embora não seja possível prever a evolução de um paciente ainda na fase febril, sabe-se que tanto uma triagem apropriada quanto uma intervenção terapêutica com hidratação venosa podem prevenir a evolução para condições clínicas mais graves e, até mesmo, reduzir a mortalidade nos casos de dengue grave. Nesse contexto, um potencial marcador de gravidade clínica da doença é a plaquetopenia, que também é considerada uma das principais alterações hematológicas no curso da infecção pelo DENV (WHO 2009; de Azeredo et al. 2015). As contagens de plaquetas correlacionam-se tanto com as alterações de permeabilidade e instabilidade hemodinâmica, quanto com a recuperação clínica ou mortalidade dos pacientes (Krishnamurti et al. 2001; Chen et al. 2007; Mourão et al. 2007). A etiologia da plaquetopenia associada a dengue ainda não foi completamente elucidada, mas diferentes fatores parecem estar envolvidos incluindo desde a supressão hematopoiética até o consumo/destruição periférica das plaquetas (de Azeredo et al. 2015).

Além da plaquetopenia, outros critérios são utilizados para distinguir as diferentes formas da doença. Em 2009, a OMS propôs a classificação dos pacientes com dengue em três grupos: dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Os pacientes sem sinais de alarme devem morar em área endêmica ou ter viajado para tal, estar com febre e apresentar pelo menos dois dos seguintes sintomas: náuseas/vômitos, erupções cutâneas, dores, teste de torniquete positivo, leucopenia e algum sinal de alarme. Os sinais de alarme incluem: dor abdominal, vômitos persistentes, sinais clínicos de extravasamento de fluido, sangramento de mucosa, letargia, hepatomegalia (com aumento do fígado superior a 2 cm) ou aumento no hematócrito juntamente com declínio rápido da contagem de plaquetas. Os pacientes com ou sem sinais de alarme podem evoluir para a dengue grave, caracterizada por extravasamento grave de plasma, hemorragia importante e comprometimento orgânico (WHO 2009).

Essa classificação dos casos de dengue foi proposta para substituir o sistema de classificação anterior. No entanto, estudos atuais ainda classificam os pacientes em FD/FHD/SCD e, portanto, os resultados destas publicações serão citados no presente estudo de acordo com a classificação usada pelos autores. No sistema de classificação anterior, os pacientes eram distinguidos com febre da dengue (FD) ou FHD, sendo esta caracterizada por aumento no hematócrito, plaquetopenia ($<100.000/\text{mm}^3$), leucopenia, manifestações hemorrágicas, distúrbios na coagulação e danos hepáticos. Pacientes com FHD ainda eram classificados em quatro graus de gravidade (FHD I – IV), sendo os dois últimos graus definidos como síndrome de choque por dengue (SCD) (WHO 1997). A necessidade de reaver a classificação dos casos de dengue ocorreu principalmente pelo fato de que a FD/FHD/SCD (1) não relata a gravidade da doença; (2) dificulta a identificação de dengue

grave pelos clínicos; (3) é difícil de ser utilizada, pois os testes necessários não estão disponíveis na grande maioria das vezes ou são de difícil aplicação; (4) não ajuda na triagem em surtos epidêmicos e (5) leva à diferentes notificações globais, como resultado da dificuldade em utilizar essa classificação por clínicos (Horstick et al. 2014). Além desses fatores, a entrada do DENV nas Américas e em outras regiões, nas quais ocorreram infecções de populações adultas e geneticamente distintas, refletiu em diferenças na apresentação clínica da doença em relação aos casos pediátricos do sudeste asiático, nos quais se baseava a classificação anterior. Dessa forma, a aplicação desse protocolo falhava em classificar pacientes clinicamente graves que não preenchiam completamente os critérios para FHD, sugerindo a necessidade de um novo protocolo (Rigau-Pérez 2006).

1.1.4 Patogênese

Diferentes hipóteses foram propostas para a compreensão da patogenia da dengue. Embora ainda não se saiba como alguns pacientes desenvolvem a forma branda da doença enquanto outros evoluem para formas mais graves, acredita-se que diversos fatores estejam envolvidos incluindo fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus. As teorias que visam explicar a patogênese das formas graves foram baseadas em observações experimentais *in vitro*, estudos clínicos, dados epidemiológicos e, mais recentemente, graças ao desenvolvimento de modelos animais que manifestam as características clínicas da doença, em modelos experimentais *in vivo* (Green e Rothman 2006; Costa et al. 2013; Yacoub et al. 2013). Apesar de nenhuma hipótese sozinha explicar precisamente os casos de dengue grave, parece consensual que uma ativação exacerbada do sistema imunológico, com elevada secreção de mediadores inflamatórios, seja crucial para a vasculopatia associada a dengue (Pang et al. 2007; Bozza et al. 2008). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na intensificação da resposta inflamatória sistêmica na dengue e seus principais efetores ainda não foram completamente esclarecidos.

1.1.4.1 Fatores virais

Com o advento das técnicas que permitiram o sequenciamento do genoma, observou-se que dentro dos quatro grupos antigênicos havia uma diferença genética que permitiu a classificação, dentro de cada sorotipo, em um pequeno número de genótipos. Há evidências de que a variabilidade genética entre as cepas virais pode estar relacionada a diferenças na aptidão viral (adaptabilidade ou *fitness*) e virulência (Cologna et al. 2004; Vu et al. 2010). Além disso, comparações entre genótipos virais e dados epidemiológicos permitiram a

associação das elevadas taxas de transmissão e da incidência de FHD com grupos virais específicos (Rico-Hesse et al. 1997; Messer et al. 2003).

Nesse contexto, estudos identificaram que o genótipo do DENV-2 proveniente do sudeste asiático está associado a epidemias graves, como a de Cuba em 1981 e a do Brasil em 2008 (Rico-Hesse et al. 1997; Teixeira et al. 2009); enquanto o genótipo americano do DENV-2 é caracterizado como o agente de epidemias que ocorrem sem registro de casos graves, como no Peru em 1995 (Leitmeyer et al. 1999; Cologna et al. 2004; Rico-Hesse 2007). A divergência na virulência entre estes genótipos foi atribuída a diferenças nas sequências da glicoproteína E e das regiões não codificantes 5' e 3' do genoma viral (Leitmeyer et al. 1999; Pryor et al. 2001).

Além da virulência, outros fatores como viremia e presença de proteínas virais no plasma de pacientes podem estar relacionados com a gravidade da doença. No entanto, os estudos são controversos. Foi demonstrado, durante um surto em Taiwan no ano de 1998, uma correlação positiva entre a viremia e o desenvolvimento de FHD pelo DENV-3 (Wang et al. 2003). Em paralelo aos altos títulos virais, a forma secretada da proteína NS1 estava presente em maior quantidade no plasma de pacientes com FHD em comparação aos com FD (Libraty et al. 2002). Por outro lado, foi observado, durante surtos em Taiwan nos anos de 2002 e 2003 pelo DENV-2, que a viremia de pacientes com FD ou FHD não era significativamente diferente (Chen et al. 2005).

1.1.4.2 Fatores do hospedeiro

Uma vez que a infecção primária pelo DENV confere proteção por toda a vida contra a reinfecção pelo sorotipo homólogo, a infecção secundária por um sorotipo heterólogo ocorre frequentemente em áreas endêmicas e é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de dengue grave (Halstead 2007). Até mesmo durante uma infecção secundária, a forma mais grave da doença é relativamente rara, onde apenas 0,5 a 1% dos casos de FHD progridem para SCD. Porém, em crianças nascidas de mães imunes ao DENV, a infecção primária pode causar doença grave. O mecanismo pelo qual a resposta imunológica ao vírus protege contra ou contribui para a evolução de casos mais drásticos ainda é inconclusivo (Diamond e Pierson 2015).

A fim de explicar essas observações, a teoria da amplificação dependente de anticorpos (ADE – *antibody dependent enhancement*) foi proposta (Halstead e O'Rourke 1977; Halstead 1988). De acordo com esta teoria, anticorpos específicos contra o sorotipo do DENV, provenientes da infecção primária, seriam capazes de reconhecer o sorotipo heterólogo, porém incapazes de neutralizá-lo. A opsonização do vírus infectante por

anticorpos IgG não neutralizantes levaria à formação de um complexo imune capaz de ligar-se a receptores que reconhecem a porção Fc γ das moléculas de anticorpo IgG (Fc γ R), presentes na superfície de células alvo, tais como monócitos e macrófagos. Isso facilitaria a entrada do DENV nestas células, culminando no aumento da replicação viral e, conseqüentemente, maior título viral, produção de citocinas e ativação de células do sistema imunológico; contribuindo para o desenvolvimento das formas graves da doença (Kliks et al. 1989; Vaughn et al. 2000; Guzman e Vazquez 2010).

Observações clínico-epidemiológicas de Cuba na década de 1980 suportam esta hipótese. Desde 1945, não era registrado casos de dengue, no entanto em 1977-1978 houve uma epidemia causada pelo DENV-1. A população cubana, então, ficou sob risco de infecção secundária caso um diferente sorotipo fosse introduzido no país. Isto aconteceu em 1981, com a introdução do DENV-2 (genótipo asiático). Nesta nova epidemia, quadros mais graves foram notificados e testes realizados em pacientes que desenvolveram FHD/SCD mostraram, em 98% dos casos examinados, um padrão sorológico consistente com infecção secundária. Adicionalmente, crianças menores de dois anos, nascidas depois da primeira epidemia, não desenvolveram as formas graves da doença. Todavia, crianças menores de um ano que evoluíram ao óbito eram nascidas de mães imunes ao DENV-1 e, portanto, apresentavam anticorpos maternos circulantes (Kouri et al. 1989). Além disso, algumas sequências de infecções, como DENV-1 seguida por DENV-2 e DENV-1 seguida por DENV-3, foram associadas ao aumento na gravidade da dengue (Alvarez et al. 2006; Guzman e Kouri 2008).

Estudos *in vitro* confirmaram que concentrações subneutralizantes de soros imunes de pacientes com dengue, de anticorpos contra a glicoproteína E ou contra a proteína prM promovem o aumento da infecção de células pelo DENV (Goncalvez et al. 2007; Dejnirattisai et al. 2010; Moi et al. 2013). Outras análises mostraram que a infecção de monócitos, macrófagos e células dendríticas via ADE induz não apenas a amplificação da replicação viral, mas também aumenta a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) α e a interleucina (IL) 6 (Chareonsirisuthigul et al. 2007; Boonnak et al. 2011; Puerta-Guardo et al. 2013). Dados experimentais em camundongos também suportam esta teoria (Balsitis et al. 2010; Zellweger et al. 2010) e foi observado que anticorpos subneutralizantes aumentam os títulos de viremia em primatas (Halstead 1979; Goncalvez et al. 2007).

Entretanto, embora em menor proporção, infecções primárias podem evoluir para as formas mais graves da dengue e até mesmo ao óbito (Halstead et al. 2002). Aproximadamente 10% dos casos de FHD/SCD ocorrem em pacientes durante a primeira infecção, dos quais a maioria são crianças entre 6 e 12 meses de vida (Green e Rothman 2006). Acredita-se que

anticorpos maternos IgG anti-DENV sejam transferidos através da placenta, contribuindo para o fenômeno da ADE e para o desenvolvimento de FHD em crianças menores de 1 ano de idade (Simmons et al. 2007). Durante os primeiros meses de vida, estes anticorpos protegem as crianças da infecção pelo DENV. Porém, aos 6 meses de idade os títulos de anticorpos anti-DENV decaem para níveis subneutralizantes e aos 12 meses de vida desaparecem do soro, reduzindo, portanto, o risco de desenvolvimento das formas graves (Halstead et al. 2002; Watanaveeradej et al. 2003; Pengsaa et al. 2006).

Outra teoria que explica a maior gravidade da dengue observada na infecção secundária é a do “pecado original antigênico”. Durante a infecção secundária ocorre um aumento da apresentação de antígenos, bem como da ativação de células T CD4+ e CD8+ de memória da infecção prévia por outro sorotipo. A proliferação dessas células T de memória, mas de baixa especificidade para outro sorotipo, se sobressai em relação à expansão das células T *naive* (não ativadas previamente) de maior avidéz para o sorotipo infectante, promovendo uma alteração na resposta imunopatológica (Mathew et al. 1998; Mongkolsapaya et al. 2003; Rothman 2011). Neste cenário, há também um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interferon (IFN) γ e TNF- α , que podem agir diretamente sobre as células do endotélio vascular, resultando em aumento da permeabilidade e extravasamento do plasma (Mangada et al. 2002).

Apesar dos dados epidemiológicos sugerirem que a infecção secundária seja um fator de risco para o desenvolvimento das formas graves da dengue, casos de FHD/SCD e até mesmo casos fatais têm sido descritos também em infecções primárias (Barnes e Rosen 1974). Estudos provenientes de regiões não endêmicas para o DENV (Chao et al. 2004) e casos de viajantes mostram que a frequência de FHD durante infecções primárias é similar ao observado em infecções secundárias (Meltzer e Schwartz 2009). Além disso, foi demonstrado recentemente, através de um estudo de coorte, que não há associação entre anticorpos maternos e desenvolvimento de dengue grave em crianças menores de 1 ano de idade (Libraty et al. 2009). Adicionalmente, a introdução do DENV-3 no Rio de Janeiro, em 2002, promoveu uma das piores epidemias da história deste estado, onde 54% dos casos fatais foram causados por infecções primárias (Nogueira et al. 2005). Desse modo, somente as teorias da ADE e do pecado original antigênico não são capazes de explicar todos os casos que evoluem para as formas graves da doença.

De modo interessante, foi observado que a concentração de determinados mediadores inflamatórios encontrava-se aumentada durante a infecção primária pelo DENV (Iyngkaran et al. 1995). Sendo assim, acredita-se que um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de manifestações clínicas graves é a ativação principalmente de células T,

monócitos/macrófagos, células dendríticas, hepatócitos e células endoteliais, que culmina na liberação exacerbada de citocinas (Pang et al. 2007). Embora níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios sejam descritos em pacientes com FD, muitos deles são encontrados em quantidade ainda maior em pacientes que manifestam dengue grave (Costa et al. 2013). Estudos realizados com crianças e adultos com a forma grave da doença, causada por diferentes sorotipos, demonstraram um aumento significativo dos níveis de mediadores inflamatórios no plasma, como IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), proteína quimiotática de monócitos do tipo 1 (MCP-1) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) (Raghupathy et al. 1998; Green et al. 1999; Chen et al. 2006; Lee et al. 2006; Bozza et al. 2008; Jaiyen et al. 2009; Assunção-Miranda et al. 2010; van de Weg et al. 2013).

Nossos dados mostraram um importante papel do MIF na patogenia da dengue (Assunção-Miranda et al. 2010). O MIF é um mediador pró-inflamatório expresso por distintos tipos celulares, não apenas do sistema imunológico, e liberado em resposta a diversos estímulos. Os efeitos mediados pelo MIF, em parte através dos receptores CD74-CD44, CXCR2, CXCR4 e CXCR7, incluem a indução da produção de mediadores inflamatórios, a expressão de receptores do tipo *Toll* (TLR) e moléculas de adesão, a neutralização dos efeitos dos glicocorticoides, o potencial quimioatrativo, o aumento da sobrevivência de leucócitos e a regulação da apoptose de plaquetas (Calandra e Roger 2003; Leng et al. 2003; Shi et al. 2006; Bernhagen et al. 2007; Schwartz et al. 2009; Chatterjee et al. 2014). De forma interessante, os níveis desta citocina encontra-se elevado em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o tratamento com anticorpos anti-MIF é capaz de reduzir a replicação em células infectadas *in vitro* (Regis et al. 2010). Como observado em pacientes com sepse (Bozza et al. 2004), a concentração do MIF estava relacionada à gravidade da dengue (Chen et al. 2006). Adicionalmente, nós observamos, através da infecção experimental primária, manifestações clínicas da dengue de menor gravidade em camundongos deficientes para o MIF, uma vez que eles exibem uma redução significativa na letalidade, menores títulos de viremia e diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, quando comparados aos animais selvagens (Assunção-Miranda et al. 2010). Evidências recentes indicam que o MIF pode contribuir para o aumento da permeabilidade vascular durante a infecção pelo DENV. Neste contexto, foi observado um aumento na expressão de moléculas de adesão e de coagulação em monócitos e células endoteliais estimuladas com MIF, sugerindo o envolvimento desta citocina nos estágios inflamatórios e anticoagulatórios durante a FHD/SCD (Chuang et al. 2011; Yeh et al. 2013).

É sugerido que alguns marcadores imunológicos possam estar diretamente relacionados à manifestações clínicas graves, como disfunção hepática, hipotensão, plaquetopenia e choque (Costa et al. 2013). Desta forma, parece que o balanço entre citocinas pró- e anti-inflamatórias determina as alterações endoteliais responsáveis pelos sinais clínicos de permeabilidade aumentada nos pacientes com dengue clássica, ou pelo choque nos casos de dengue grave. Por outro lado, citocinas de resposta antiviral e citotóxica como IFN do tipo I e II, IL-12, IL-18 e proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1 β estão associadas com bom prognóstico e melhora clínica. (Bozza et al. 2008; Kumar et al. 2012; Costa et al. 2013; van de Weg et al. 2013). Além disso, foi recentemente proposto que variações nos níveis das proteínas transmembranares induzidas por IFN (IFITMs) – identificadas como potentes efetores antivirais que inibem a entrada e a replicação de diversos vírus envelopados (Brass et al. 2009; Bailey et al. 2014; Mesquita et al. 2014) – podem prever a gravidade da infecção pelo DENV (Chan et al. 2012; Zhu et al. 2015).

Assim, é completamente aceito que reações exacerbadas do sistema inflamatório contribuam para a imunopatogênese da dengue. As últimas descobertas implicam que a doença grave ocorra de forma dependente de uma ativação descontrolada de células imunes, da produção aumentada de mediadores pró-inflamatórios e, conseqüentemente, da disfunção endotelial desencadeada por distintos mecanismos imunopatológicos (Costa et al. 2013). Porém, os fatores determinantes da produção diferencial dos diversos mediadores, bem como os papéis de cada uma destas moléculas no complexo cenário fisiopatológico da dengue necessitam de esclarecimento.

A relação entre a gravidade da dengue e a ativação exacerbada do sistema imunológico fez alguns pesquisadores sugerirem que a resposta imune aos componentes do DENV pudesse contribuir para uma reação autoimune, que, por fim, levaria ao desenvolvimento da FHD/SCD (Lin et al. 2006). A proteína NS1 forma uma estrutura multimérica e pode ser tanto encontrada na superfície de células infectadas, quanto liberada como molécula solúvel no sobrenadante de culturas celulares e *in vivo* (Young et al. 2000; Libraty et al. 2002). Lin e colaboradores (2005) demonstraram a reatividade cruzada de anticorpos anti-NS1 com células endoteliais, culminando na ativação das mesmas. Esta ativação era acompanhada pela produção de IL-6, CXCL8/IL-8 e MCP-1, bem como pelo aumento na expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM) -1 e na capacidade de aderência às células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (Lin et al. 2005). De modo interessante, após ligação às células endoteliais, os anticorpos anti-NS1 induziam apoptose mediada por óxido nítrico (NO) (Lin et al. 2002, 2004). Desta forma, a hipótese da autoimunidade ou do mimetismo molecular propõe que a disfunção endotelial, observada

durante os casos graves, seja resultante da reatividade cruzada entre anticorpos anti-NS1 e proteínas do hospedeiro e/ou células endoteliais (Lin et al. 2003). No entanto, essa hipótese se contradiz devido a durabilidade dos anticorpos anti-NS1 frente à natureza transitória da permeabilidade vascular e das desordens hemostáticas (Halstead 2007).

A ativação do complemento também parece estar envolvida na patogenia da dengue. Avirutnan e colaboradores (2006) demonstraram que a proteína NS1 era capaz de ativar essa via. Adicionalmente, foi observado, através de estudos clínicos, que os níveis tanto desta proteína quanto dos produtos provenientes da ativação da cascata do complemento estavam presentes em grande quantidade, antes da ocorrência do extravasamento plasmático, em pacientes infectados (Nishioka 1974; Avirutnan et al. 2006; Wang et al. 2006). Foram encontrados níveis elevados de C3a, C4a, C5a e fator D em pacientes com FHD quando comparados aos níveis dos pacientes com FD (Nascimento et al. 2009). Por conseguinte, embora as evidências sugiram que a ativação exacerbada da via do complemento esteja envolvida no desenvolvimento das formas graves da doença, os mecanismos que levam à tamanha exacerbação ainda não foram completamente esclarecidos. Recentemente foi demonstrado que o C1q pode ser ligar a glicoproteína E do DENV-2. Neste estudo foi constatado que a incubação do DENV-2 com C1q, antes da infecção das células THP-1, promoveu uma redução na infectividade viral e na modulação da expressão de moléculas imunoregulatórias, sugerindo uma redução na resposta inflamatória (Douradinha et al. 2014). Esses dados revelam a importância e a complexidade da interação entre o vírus e fatores do complemento.

Outros possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de dengue grave foram sugeridos, incluindo sexo feminino, etnicidade e comorbidades, como diabetes e hipertensão (Figueiredo et al. 2010; Anders et al. 2011; Pang et al. 2012). Além destes, foi observado que a idade dos pacientes também desempenha um papel importante na modulação do fenótipo da doença (Guzmán et al. 2002). Recentemente foi observado que pacientes adultos manifestam mais infecções aparentes do que crianças, entretanto quando estas últimas são sintomáticas para a doença apresentam um risco maior para o desenvolvimento de SCD e evolução para morte (Thai et al. 2011).

Quanto à contribuição genética para a patogênese da dengue foi observado que caucasianos apresentam uma maior predisposição para o desenvolvimento de FHD em relação aos negroides e, portanto, diversos genes humanos que regulam a gravidade da doença podem estar distribuídos de forma desigual entre as raças (Sierra et al. 2007b). Estudos sugerem que polimorfismos nos genes ligados ao sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) e não HLA podem estar associados com a susceptibilidade à FHD (Chaturvedi et al. 2006). Em

populações cubanas e mexicanas, a presença do alelo HLA-DR4 confere proteção contra as formas graves da dengue (LaFleur et al. 2002; Sierra et al. 2007a). Na Malásia e no Vietnã, o alelo HLA-A*24 é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de dengue grave (Loke et al. 2001; Appanna et al. 2010). Na Tailândia, o alelo HLA-B57 foi relacionado a pacientes com infecção secundária grave (Vejbasya et al. 2009). Já na população brasileira, o alelo HLA-DQ1 foi associado com a susceptibilidade à doença causada pelo DENV-1 (Polizel et al. 2004) e o alelo HLA-A*01 com a susceptibilidade à FHD (Monteiro et al. 2012). Outros polimorfismos genéticos, associados com a susceptibilidade às formas graves da dengue, incluem polimorfismos de base única no gene para Fc γ R2, IL-1 β e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA); e nas regiões promotoras dos genes para DC-SIGN (CD209), TNF- α , lectina do tipo C (CLEC) -5 e IL-10 (Loke et al. 2002; Fernandez-Mestre et al. 2004; Sakuntabhai et al. 2005; Perez et al. 2010; Alagarasu et al. 2013a, 2013b; Xavier-Carvalho et al. 2013; Sa- Ngasang et al. 2014). Vale ressaltar que o polimorfismo no promotor do DC-SIGN foi associado à trombocitopenia (Alagarasu et al. 2013a) e os polimorfismos nos genes para IL-1 β e IL-1RA à evolução para SCD (Sa- Ngasang et al. 2014). Além disso, foi observado, na população brasileira, que polimorfismos no gene para lectina ligante de manose (MBL) 2 protegem contra o desenvolvimento de trombocitopenia associado ao fenótipo grave da doença (Acioli-Santos et al. 2008). Essas evidências revelam a importância da genética do hospedeiro na modulação da doença.

As hipóteses citadas para tentar explicar a patogênese da FHD/SCD nos mostram o quanto complexo é a interação do DENV com as células hospedeiras. Acredita-se que a combinação de fatores de riscos individuais, genéticos, epidemiológicos e virais contribua para o desenvolvimento das formas graves da doença (Kouri et al. 1989).

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

A partir de uma perspectiva evolutiva, os mediadores celulares envolvidos na hemostasia e defesa imunológica nem sempre estiveram separados. Nos invertebrados, os hemócitos tanto protegem o hospedeiro de micro-organismos invasores quanto previnem a perda de hemolinfa por injúria, uma vez que promovem a coagulação. No entanto, em espécies mais desenvolvidas, acreditava-se que esses dois sistemas atuavam independentemente e, portanto, os leucócitos eram responsáveis pela resposta imunológica enquanto as plaquetas pela manutenção da hemostasia (Weyrich et al. 2003). Todavia, um importante papel das plaquetas na resposta imune e inflamatória torna-se cada vez mais aparente (Semple et al. 2011; Vieira-de-Abreu et al. 2012).

Em 1882, Bizzozero descobriu as plaquetas como o terceiro elemento morfológico do sangue e elucidou a função destas células na hemostasia e trombose (Ribatti e Crivellato 2007). Por muito tempo, as atividades identificadas em plaquetas foram restritas a função pró-coagulantes, com respostas rápidas envolvendo agregação e secreção de fatores estocados em grânulos (Assinger 2014). Embora não possuam núcleo, estas células apresentam estoques de moléculas de RNA e diversos mecanismos de controle pós-transcricional, sendo capazes de ativar vias especializadas de síntese proteica, a fim de alterar seu proteoma, fenótipo e funções (Denis et al. 2005). Diversas pesquisas mostram que as plaquetas modulam reações inflamatórias e respostas imunológicas tanto através da interação direta com leucócitos e células endoteliais, quanto via liberação de mediadores solúveis que aumentam o recrutamento de leucócitos e promovem sua ativação (Kaplanski et al. 1993; Weyrich et al. 1996; Nishimura et al. 2012). Adicionalmente, foi observado que as plaquetas expressam diversos receptores na sua superfície, incluindo lectinas, integrinas, receptores do tipo *Toll* (TLR) e receptores que reconhecem a porção Fc de imunoglobulinas; permitindo a interação direta com diversos patógenos e imunocomplexos (Aslam et al. 2006; Fitzgerald et al. 2006; Qian et al. 2008). Apesar do avanço recente no conhecimento sobre a biologia e funções das plaquetas, pouco se sabe a respeito da participação destas células na ativação imune e amplificação inflamatória durante a dengue.

Plaquetas estimuladas podem secretar ou translocar para a membrana plasmática mais de 300 proteínas e lipídios, dependendo do agonista, com notável diversidade na estrutura, função, mecanismo de liberação e/ou localização na superfície, sinalização e alvos celulares. As plaquetas possuem dois tipos principais de grânulos secretórios: os grânulos α e os grânulos densos. Fatores liberados desses grânulos contribuem para a hemostase, trombose, angiogênese, modulação da barreira endotelial e sinalização inflamatória (Vieira-de-Abreu et al. 2012; Rondina et al. 2013). Os grânulos α são as organelas mais abundantes em plaquetas e as proteínas estocadas nestes grânulos incluem reguladores da coagulação e fibrinólise (Fator V, Fator VIII, PAI-1), citocinas/ quimiocinas (MIF, fator plaquetário 4 (CXCL4/PF4), CXCL8/IL-8, quimiocina regulada sob ativação, normalmente expressa e secretada por células T (CCL5/RANTES), CCL3/MIP-1 α , fator básico de crescimento de fibroblasto (FGF) β , fator de crescimento e transformação (TGF) β , fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), dentre outras) e moléculas de adesão (P-selectina, fibrinogênio, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$). Já os grânulos densos são menos abundantes e estocam uma variedade de moléculas pequenas, dentre elas ADP, ATP, GDP e serotonina (Karshovska et al. 2013; Rondina et al. 2013; Golebiewska e Poole 2015). De forma interessante, fatores estocados em grânulos α plaquetários e secretados mediante estímulo, como CCL5/RANTES, CXCL4/PF4, TGF- β ,

MIF, CCL3/MIP-1 α , VEGF e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) estão frequentemente aumentados no plasma de pacientes com dengue e, em alguns estudos, correlacionam com as contagens de plaquetas (Chen et al. 2006; Kumar et al. 2012; Malavige et al. 2012; Rathakrishnan et al. 2012). Sendo assim, uma vez que plaquetas são importantes fontes desses mediadores, é possível que a secreção de citocinas e quimiocinas por estas células ativadas, durante a infecção pelo DENV, possa atuar como um mecanismo patogênico importante.

Pesquisas revelam que plaquetas isoladas de pacientes com dengue ou plaquetas expostas ao DENV *in vitro* apresentam alterações morfológicas sugestivas de ativação (Ghosh et al. 2008; Noisakran et al. 2009). De fato, plaquetas obtidas de pacientes com a doença ou expostas ao DENV *in vitro* possuem aumento na expressão de P-selectina e ligação ao fibrinogênio (Ghosh et al. 2008; Hottz et al. 2013b). Os possíveis mecanismos envolvidos na ativação plaquetária durante a dengue incluem a adesão de plaquetas sobre células endoteliais infectadas (Krishnamurti et al. 2002); intensa produção de fatores como trombina e fator ativador de plaquetas (PAF) (Yang et al. 1995; Krishnamurti et al. 2001); e/ou uma ação direta do DENV sobre plaquetas (Ghosh et al. 2008). Embora estes dados sejam indicativos de ativação plaquetária durante a dengue, os mecanismos responsáveis por este processo e suas consequências na patogênese da doença permanecem pouco exploradas.

Nesse contexto, nosso grupo demonstrou que a ativação plaquetária induzida pelo DENV mostrou ser dependente do receptor DC-SIGN (Hottz et al. 2014). Embora o vírus tenha sido detectado em plaquetas isoladas de pacientes com dengue, não havia evidências de que estas células eram capazes de replicar o DENV (Noisakran et al. 2009). Baseado nessas descobertas e em estudos prévios demonstrando que plaquetas anucleadas traduzem moléculas de mRNA (Weyrich et al. 2009), Simon e colaboradores (2015) constataram que plaquetas podem sintetizar a proteína NS1 e replicar o genoma do DENV.

Vale ressaltar ainda que plaquetas ativadas interagem com leucócitos. Essa interação aumenta a adesão dessas células ao endotélio vascular e a transmigração sob algumas condições experimentais. Além disso, é considerada um importante mecanismo que facilita o acúmulo de neutrófilos e monócitos em vasos inflamados e em tecidos infectados ou danificados (Rondina et al. 2013). Considerando que durante a infecção pelo DENV as plaquetas encontram-se ativadas, Onlamoon e colaboradores (2010) demonstraram níveis elevados de agregados plaqueta-monócito e plaqueta-neutrófilo em um modelo de FHD em primatas. A agregação plaqueta-monócito também foi demonstrada na FD em humanos (Tsai et al. 2011). Complementarmente, nosso grupo recentemente mostrou altos níveis de agregados plaqueta-monócito em amostras sanguíneas de pacientes com dengue,

especialmente em pacientes trombocitopênicos e com aumento na permeabilidade vascular (Hottz et al. 2014).

Durante essas interações, a ligação da P-selectina – presente na superfície de plaquetas ativadas – ao ligante 1 da glicoproteína P-selectina (PSGL-1) – encontrado na membrana plasmática dos leucócitos – não apenas mantém as células aderidas, mas também sinaliza para vias de expressão genica induzindo respostas funcionais nos leucócitos (figura 1.5) (Larsen et al. 1989; Weyrich et al. 1996). A adesão de plaquetas ativadas a monócitos sinaliza para a síntese de diversas citocinas, na maioria das vezes pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e MCP-1), bem como para o aumento da expressão de ciclooxigenase (COX) -2 (Weyrich et al. 1996, 2005; Dixon et al. 2006). Como discutido anteriormente, esses mediadores inflamatórios são importantes efetores da patogênese de dengue, com elevados níveis observados em amostras de pacientes com a forma grave da doença (Bozza et al. 2008; Jaiyen et al. 2009; van de Weg et al. 2013). Recentemente, Hottz e colaboradores (2014) demonstraram que monócitos obtidos de voluntários saudáveis expostos a plaquetas isoladas de pacientes com dengue secretam IL-1 β , IL-8, IL-10 e MCP-1, de maneira dependente de P-selectina e fosfatidilserina.

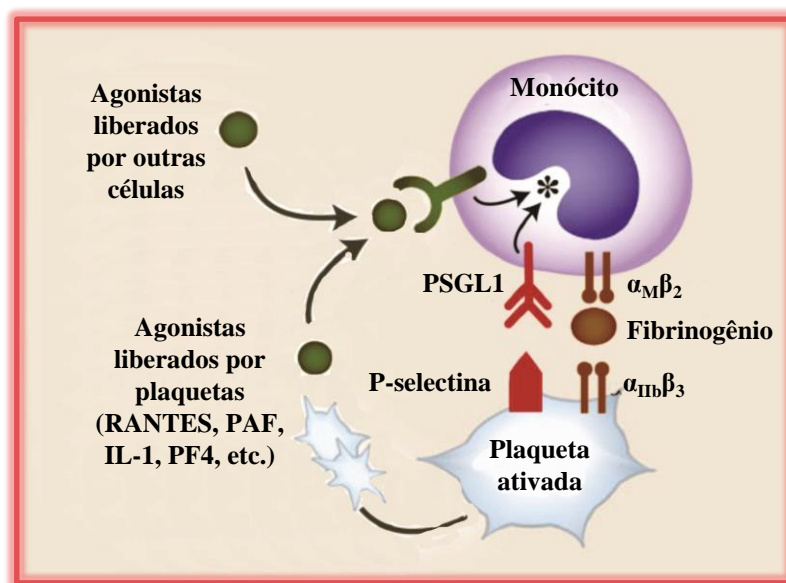


Figura 1.5 Plaquetas ativadas aderem e sinalizam respostas funcionais nos monócitos. Plaquetas humanas ativadas aderem aos monócitos *in vivo* e *in vitro*. A ligação da P-selectina, que é translocada dos grânulos α para a membrana plasmática de plaquetas ativadas, ao PSGL-1, que é constitutivamente expresso na superfície dos monócitos, é crítica para essa interação. A adesão dessas células pode ser inibida por anticorpos de bloqueio contra a P-selectina ou PSGL-1. A ligação ao PSGL-1 sinaliza para a ativação da $\alpha_M\beta_2$, bem como outros membros da família das integrinas nos monócitos, amplificando potencialmente a adesão exercida inicialmente pela P-selectina/PSGL-1 e contribuindo para outras interações adesivas, tais como com o endotélio, matriz subendotelial ou outras células sanguíneas. Sinais promovidos por fatores justácrinos ou solúveis, liberados ou exercidos por plaquetas ativadas (CCL5/RANTES, CXCL4/PF4, IL-1, PAF, etc.), podem atuar em conjunto tanto aos sinais exercidos pela ligação ao PSGL-1 quanto aos agonistas liberados por outros tipos celulares. A sinalização nos monócitos por plaquetas ativadas altera a via transcricional e pós-transcricional nos leucócitos (Adaptada de Vieira-de-Abreu et al. 2012).

De forma interessante, a adesão de plaquetas ativadas a monócitos sinaliza não apenas para a síntese de mediadores inflamatórios, mas também para mudanças fenotípicas nos leucócitos. Nesse contexto, estudos mostraram que plaquetas ativadas por diferentes estímulos, como LDL-oxidada (OxLDL) (Badrnya et al. 2013) ou micobactéria (Feng et al. 2014), sinalizam para a diferenciação dos monócitos em células espumosas, que é caracterizada pelo aumento no número de corpúsculos lipídicos. Sendo assim, a análise da contribuição dos agregados plaqueta-monócito sobre a ativação dos monócitos, durante a dengue, é de suma importância para a compreensão dos mecanismos que promovem a exacerbação da resposta inflamatória observada durante as formas graves da doença.

1.2 Corpúsculos lipídicos

1.2.1 Características gerais, composição e funções

Os corpúsculos lipídicos, também chamados de gotas lipídicas ou adipossomos, são organelas citoplasmáticas ricas em lipídios presentes em virtualmente todos os organismos (Bozza et al. 2009). Em algumas células de mamíferos, como hepatócitos e adipócitos, os corpúsculos lipídicos estão abundantemente presentes, enquanto que em outros tipos celulares, incluindo leucócitos, o acúmulo citoplasmático destas estruturas se dá através de um processo induzido por uma variedade de estímulos (Murphy 2001).

O tamanho, a quantidade, a regulação, a composição e, conseqüentemente, a função destas organelas podem variar consideravelmente entre tipos celulares. Os corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas esféricas, não delimitadas por uma membrana clássica, associados a elementos do citoesqueleto e que em estudos ultraestruturais apresentam elétrondensidade variável (Murphy 2001; Bozza et al. 2007). Em diversos tipos celulares, o tamanho dessas organelas hidrofóbicas pode variar de 0,1 a 5 µm de diâmetro, enquanto que em adipócitos os corpúsculos lipídicos atingem tamanho superior a 100µm e, dessa forma, preenchem todo o citoplasma (Saka e Valdivia 2012; Walther e Farese 2012). Estes domínios são constituídos basicamente por lipídios neutros, como triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis (DAGs), colesterol livre e ésteres de colesterol (SEs); associados a uma variada composição proteica e envolvidos por uma monocamada de fosfolipídios anfipáticos (figura 1.6 A) (Zweytick et al. 2000; Brown 2001; Murphy 2001). Dependendo do tipo celular, a quantidade e a proporção de lipídios neutros presentes no núcleo dessas organelas variam. Os fosfolipídios presentes na superfície dos corpúsculos lipídicos são estruturalmente diferentes daqueles presentes nas membranas do RE e dos microdomínios ricos em colesterol e

esfingolípídios, sendo a fosfatidilcolina o principal fosfolípídio encontrado na monocamada que circunda estes domínios (Tauchi-Sato et al. 2002; Bartz et al. 2007).

Por muito tempo, os corpúsculos lipídicos foram representados como depósitos inertes de gordura e sítios de transporte de lípidios (Murphy 2012). Atualmente, dados indicam que estas organelas hidrofóbicas são estruturas altamente dinâmicas e funcionalmente ativas. Em leucócitos, estas estruturas aumentam em número e tamanho durante processos inflamatórios e infecciosos, além de desempenhar funções como organelas especializadas, incluindo envolvimento na sinalização e ativação celular, na regulação do metabolismo e tráfego lipídico, bem como no controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Bozza et al. 2009). Com coloração e fixação apropriadas, os corpúsculos lipídicos podem ser visualizados (figura 1.6 C-E), enquanto que colorações rotineiras constituídas por álcoois provocam a dissolução destas estruturas (figura 1.5 B) (Pacheco et al. 2002).

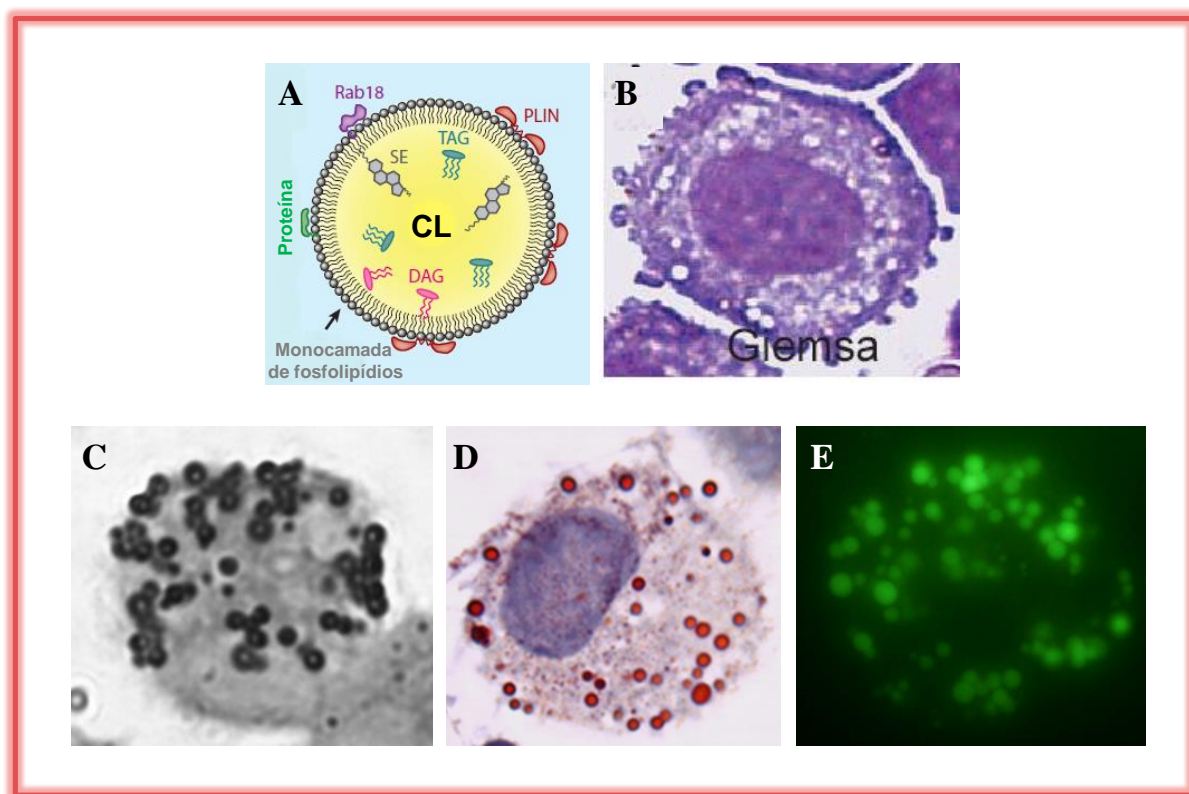


Figura 1.6. Corpúsculos lipídicos em células ativadas. Representação esquemática de um corpúsculo lipídico (CL) derivado de célula de mamífero: o núcleo composto por lípidios neutros, especialmente TAGs, SEs e DAGs; é envolto por uma monocamada de fosfolípídios e proteínas associadas. Dentre estas, a família de proteínas estruturais perilipina (PLIN) e as Rab GTPases, como a Rab18, são proeminentes (A). Os corpúsculos lipídicos de macrófagos ativados foram visualizados por microscopia de luz (B-D) ou fluorescência (E) após coloração com May-Grunwald-Giemsa (B), ósmio (C), oil red O (D) e Bodipy™ 493/503 (E) (Adaptada de Bozza et al. 2007; D’Avila et al. 2008; Saka e Valdivia 2012).

Os corpúsculos lipídicos apresentam um conteúdo proteico diversificado, caracterizado principalmente por proteínas da família PAT. As principais proteínas PAT descritas relacionadas com estas organelas, consideradas essenciais para o estoque e metabolismo de lipídios, compreendem a perilipina, a adipofilina ou proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos (ADRP) e a proteína de interação de porção terminal de 47 kDa (TIP47) (Londos et al. 2005). Estas proteínas parecem estar diretamente envolvidas na organização estrutural e biogênese desses domínios citoplasmáticos (Londos et al. 1999; Miura et al. 2002; Wolins et al. 2006; Robenek et al. 2009). Em particular, a ADRP tem sido associada a corpúsculos lipídicos de diferentes tipos celulares e descrita como uma proteína específica, sendo considerada, portanto, um importante marcador para estas inclusões dinâmicas (Brasaemle et al. 1997; Heid et al. 1998).

Análises de proteômica identificaram inúmeras proteínas GTPases da família Rab (Brasaemle et al. 2004; Umlauf et al. 2004a) nos corpúsculos lipídicos. A localização de uma dessas proteínas, a Rab18, foi posteriormente confirmada por ensaios de imunofluorescência em diferentes tipos celulares (Martin et al. 2005; Ozeki et al. 2005). Uma vez que proteínas Rab são reguladoras críticas não apenas do tráfego vesicular, mas também de interações entre organelas, foi observado que a Rab18 medeia interações entre corpúsculos lipídicos e RE (Ozeki et al. 2005). A presença de proteínas Rab em corpúsculos lipídicos ainda sugere um papel dessas organelas no tráfego de membranas (Liu et al. 2004a; Murphy et al. 2009).

Importantes enzimas envolvidas no metabolismo de colesterol, como esqualeno epoxidase e lanosterol sintase, e na síntese de ácidos graxos, incluindo acetil-CoA carboxilase e acil-CoA sintetase de cadeia longa (ACSL) 3, também foram encontradas em corpúsculos lipídicos de diferentes tipos celulares, sugerindo que processos anabólicos e catabólicos possam ocorrer nestas organelas (Fujimoto et al. 2004; Liu et al. 2004b; Umlauf et al. 2004b; Lin et al. 2005; Wan et al. 2007). Além destas enzimas, quinases conhecidas por regular sinais extracelulares, tais como proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), p38, proteína quinase C (PKC) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), encontram-se localizadas nestes domínios citoplasmáticos de leucócitos que, portanto, podem estar envolvidos na sinalização intracelular (Yu et al. 1998, 2000; Chen et al. 2002).

Outros grupos de proteínas presentes em corpúsculos lipídicos foram descritos. Citocinas e quimiocinas, incluindo TNF- α (Beil et al. 1995; Pacheco et al. 2002), MIF (Assunção-Miranda et al. 2010), CCL5/RANTES e IL-6 (Lim et al. 1996), bem como fatores de crescimento, como o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) (Dvorak et al. 2001), foram detectados nestas organelas de leucócitos ativados. É possível ainda que os corpúsculos lipídicos participem de processos de exocitose de citocinas. Foi demonstrado que

proteínas SNARE, importantes para a fusão de vesículas secretórias com a membrana plasmática (Hong 2005; Jahn e Scheller 2006), medeiam a fusão entre corpúsculos lipídicos (Boström et al. 2007). Entretanto, ainda não foi elucidado como estes mediadores são liberados a partir dos corpúsculos lipídicos e/ou se eles possuem capacidade de sinalização nestas estruturas.

Nos últimos anos, foi proposto que o aumento do número desses domínios citoplasmáticos em leucócitos poderia resultar na elevação da produção de eicosanóides por estas células (Bozza et al. 2007, 2011). Isto porque inicialmente foi demonstrado que os corpúsculos lipídicos de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e células endoteliais atuam como sítios intracelulares de araquidonato esterificado tanto em lipídios neutros quanto em diferentes classes de fosfolipídios (Dvorak et al. 1983; Weller et al. 1989, 1991; Yu et al. 1998; Johnson et al. 1999). Em seguida, foi descrita a presença de enzimas envolvidas na liberação do ácido araquidônico (AA), incluindo fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) e MAPK, em corpúsculos lipídicos (Yu et al. 1998; Wooten et al. 2008; Moreira et al. 2009). Sendo assim, o araquidonato livre poderia, então, ter acesso a enzimas formadoras de eicosanóides, como a 5-lipoxigenase (LO), 15-LO e COX, que se encontram colocalizadas nesses domínios citoplasmáticos, mais especificamente no núcleo da organela do que na membrana (Bozza et al. 1997, 1998; Pacheco et al. 2002; Vieira-De-Abreu et al. 2005; Accioly et al. 2008). Em vista disso, estudos relataram uma correlação positiva entre a formação de corpúsculos lipídicos e o aumento da produção de eicosanóides derivados das enzimas LO e COX, como leucotrieno (LT) B₄ e prostaglandina (PG) E₂ (Bozza et al. 1996a, 1996b, 1997; Pacheco et al. 2002). Por fim, através da imobilização de eicosanóides recém-formados *in situ*, nosso grupo confirmou que os corpúsculos lipídicos atuam como sítios intracelulares de produção de LTC₄, LTB₄ e PGE₂ em leucócitos ativados (Bandeira-Melo et al. 2001b; Vieira-De-Abreu et al. 2005; D'Avila et al. 2006; Pacheco et al. 2007; Accioly et al. 2008; Silva et al. 2009). Esses dados apontam para um importante papel desempenhado por essas organelas no estabelecimento de um ambiente inflamatório (Bozza et al. 2009, 2011; Bozza e Viola 2010). Vale ressaltar que enzimas formadoras de eicosanóides foram encontradas em corpúsculos lipídicos de células não-mielóides, mostrando a relevância dessas inclusões citoplasmáticas na produção de mediadores lipídicos também em condições não inflamatórias (Arend et al. 2004; Ackerman et al. 2005).

1.2.2 Biogênese

Apesar da composição e morfologia dos corpúsculos lipídicos serem bastante conhecidas, o mecanismo de formação destes ainda não foi totalmente esclarecido. Modelos hipotéticos foram propostos para explicar a biogênese destas organelas, sendo que estes compartilham a ideia de que os corpúsculos lipídicos são originados no RE e estão intimamente relacionados com o mesmo. Estes modelos baseiam-se na transferência de lipídios e proteínas do RE para os corpúsculos lipídicos em formação, e algumas evidências suportam esta ideia; entretanto, os mecanismos envolvidos ainda precisam ser melhor caracterizados (Bozza et al. 2009).

A gênese dessas estruturas não é uma manifestação de injúria celular ou simplesmente atribuída ao acúmulo de ácidos graxos, mas sim um fenômeno altamente regulado que depende do estímulo e tipo celular, além de uma variedade de condições patológicas (Bozza e Bandeira-Melo 2005). Assim, agonistas lipídicos e proteicos bem como estímulos infecciosos podem levar à formação de corpúsculos lipídicos em diferentes tipos celulares (Bozza et al. 2009).

Trabalhos de Bozza e colaboradores mostraram a participação do AA e ácido oleico (AO) na biogênese dos corpúsculos lipídicos, onde a aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais foram capazes de inibir a formação destas organelas induzida por estes ácidos graxos. Contudo, o salicilato de sódio, que não inibe a enzima COX, apresentou a mesma propriedade inibitória da aspirina, sugerindo que este fenômeno seja independente da ativação de COX. Os resultados obtidos com a utilização de animais deficientes para COX-1 e COX-2 mostraram que a indução destas organelas, por AA e AO, não foi diferente daquela observada em animais selvagens. Estes resultados propõem que a formação de corpúsculos lipídicos é independente da ativação tanto de COX-1 quanto de COX-2 (Bozza et al. 1996b, 2002).

Vários estudos demonstraram que citocinas e quimiocinas ativam vias de sinalização intracelular que culminam na biogênese de corpúsculos lipídicos (Bozza et al. 1998; Bandeira-Melo et al. 2001a, 2001b, 2002b). Dentro desse contexto, observamos que a quimiocina MCP-1 está envolvida na regulação da gênese destas organelas citoplasmáticas, em macrófagos, durante inflamação induzida por LPS ou sepse experimental. Este evento mostrou ser dependente do receptor CCR2, da sinalização envolvendo MAPK e PI3K, bem como da dinâmica microtubular (Pacheco et al. 2007). Adicionalmente, dados do nosso grupo mostraram que o MIF é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos, sendo este processo dependente do seu receptor CD74, da eotaxina e do receptor CCR3 (Vieira-de-Abreu et al. 2011).

A relação entre a formação de corpúsculos lipídicos e infecções por parasitas intracelulares, tanto em modelos de infecções clínicas quanto experimentais, tem sido documentada. Estas organelas parecem estar correlacionadas com os mecanismos de patogênese, sobrevivência e multiplicação do micro-organismo invasor. Entretanto, os mecanismos que desencadeiam o fenômeno de biogênese de corpúsculos lipídicos induzidos por patógenos intracelulares não são completamente entendidos (Bozza et al. 2007; D'Avila et al. 2008; Saka e Valdivia 2012).

1.2.3 Envolvimento dos corpúsculos lipídicos na infecção por membros da família Flaviviridae

A interação mais extensivamente documentada entre um patógeno viral e os corpúsculos lipídicos do hospedeiro refere-se ao vírus da hepatite C (HCV), um dos membros da família *Flaviviridae* (Saka e Valdivia 2012). Estima-se que aproximadamente 170 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV e, de forma importante, foi constatado que 75% dos pacientes progridem para hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Hajarizadeh et al. 2013). Nos últimos anos, foi proposto que o impacto da infecção crônica pelo HCV sobre o metabolismo lipídico seja importante tanto na progressão da doença hepática quanto na resposta ao tratamento antiviral (Negro 2014). A esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo hepatocelular de corpúsculos lipídicos, é o fenótipo histológico proeminente durante a infecção pelo HCV, acometendo 73% dos pacientes infectados pelo genótipo 3 e 40% daqueles infectados por outros genótipos (Negro e Sanyal 2009; Syed et al. 2010).

Além de atuar como marcador patológico, os corpúsculos lipídicos são frequentemente citados como organelas alvo para proteínas do HCV. Graças ao estabelecimento de um sistema de cultivo celular para a produção de partículas virais infecciosas, a associação de duas proteínas do HCV, C e NS5A, aos corpúsculos lipídicos já é conhecida há quase 20 anos (Moradpour et al. 1996; Barba et al. 1997; Hope e McLauchlan 2000; Shi et al. 2002). A detecção da proteína NS5A – envolvida na replicação e montagem de partículas virais infecciosas – na superfície destas organelas é menos aparente quando comparada a proteína C – envolvida na formação do nucleocapsídeo, onde é empacotado o genoma viral – já que grande parte fica localizada na membrana do RE (Brass et al. 2002; McLauchlan 2009). Embora ambas as proteínas sejam encontradas nos corpúsculos lipídicos, os mecanismos, motivos e/ou domínios pelos quais as mesmas se ancoram à superfície destas organelas são distintos (Filipe e McLauchlan 2015).

A proteína C madura consiste de dois domínios, denominados D1 e D2. O domínio D1 tem uma elevada proporção de aminoácidos carregados positivamente e se liga tanto ao RNA quanto a proteínas (Ashfaq et al. 2011). A proteína C de membros pertencentes ao gênero *Flavi-* e *Pestivirus* são compostas por um domínio similar em tamanho ao D1, que possui alto conteúdo de arginina/lisina, entretanto não tem o domínio D2. Foi observado que o domínio D2 – composto por duas α -hélices anfipáticas ligadas por uma alça hidrofóbica – é responsável por ancorar a proteína C aos corpúsculos lipídicos (Boulant et al. 2006). Além disso, foi demonstrado que mutações no domínio C-terminal hidrofóbico (D2) prejudicavam a produção de partículas virais infecciosas (Boulant et al. 2007). Similarmente, o impedimento da maturação da proteína C leva tanto ao bloqueio da localização desta proteína nos corpúsculos lipídicos quanto à redução da secreção de vírus infecciosos, sugerindo o envolvimento dos corpúsculos lipídicos no ciclo de replicação do HCV (Targett-Adams et al. 2008b).

No caso da proteína NS5A, que consiste de três domínios (DI-DIII), foi demonstrado que uma hélice anfipática dentro do DI promove a interação desta proteína com os corpúsculos lipídicos (Hinson e Cresswell 2009) e, também, que mutações no domínio envolvido na associação com estas organelas previne a produção de progênie infecciosa (Miyinari et al. 2007). Sendo assim, características comuns envolvidas na ancoragem de proteínas virais aos corpúsculos lipídicos incluem hélice anfipática e/ou aminoácidos carregados positivamente (Filipe e McLauchlan 2015).

Pesquisas recentes revelam que pelo menos três componentes celulares estejam envolvidos na interação entre C e NS5A com os corpúsculos lipídicos ou facilitam a interação entre essas duas proteínas virais em células infectadas (figura 1.7). Dentre eles, foi demonstrado que a enzima diacilglicerol aciltransferase 1 (DGAT1), que catalisa o estágio final da síntese de triglicerídeos e está envolvido na biogênese de corpúsculos lipídicos, interage com ambas as proteínas e facilita o recrutamento para esta organela (Herker et al. 2010; Camus et al. 2013). O segundo fator responsável pelo direcionamento destas proteínas aos corpúsculos lipídicos é a Rab18. Estudos sugerem que esta pode tanto regular a proximidade entre os corpúsculos lipídicos associados a proteína C com membranas derivadas do RE, onde a replicação ocorre, quanto promover a associação física entre corpúsculos lipídicos-NS5A e outros componentes da maquinaria de replicação celular (Salloum et al. 2013; Dansako et al. 2014). Por fim, o último componente é a proteína TIP47, associada aos corpúsculos lipídicos e responsável por promover não apenas a maturação destes, mas também controlar a incorporação de TAGs (Bulankina et al. 2009). Evidências sugerem que esta proteína interage com a região N-terminal da NS5A e, desta forma, promove a associação

de ambas as proteínas aos corpúsculos lipídicos. Também foi constatado que o silenciamento da TIP47 reduz a liberação de partículas virais, por um mecanismo que pode envolver a Rab9 (Ploen et al. 2013a, 2013b; Vogt et al. 2013).

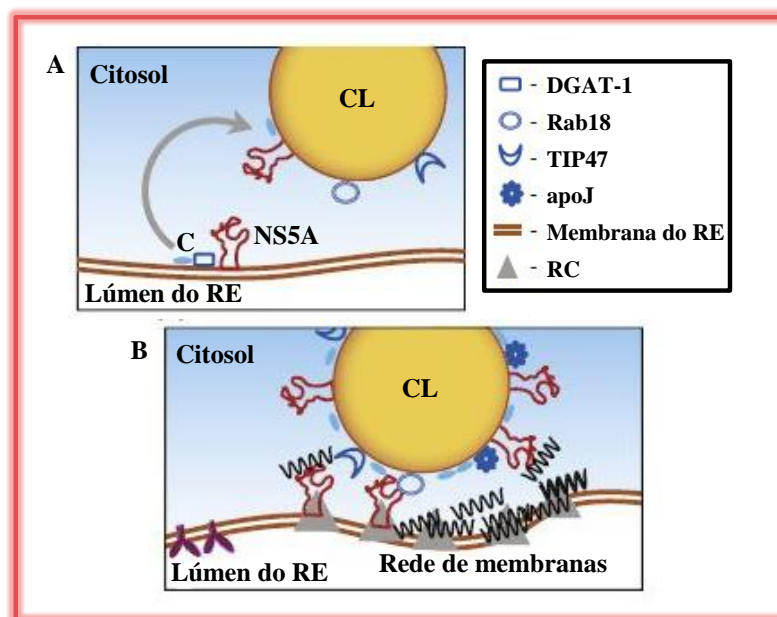


Figura 1.7 HCV utiliza a maquinaria do hospedeiro a fim de promover a interação entre corpúsculos lipídicos e proteínas virais para facilitar a replicação viral. (A) DGAT1 promove a interação entre NS5A e C na superfície do RE e garante que elas sejam direcionadas ao mesmo corpúsculo lipídico (como indicado pela seta), que contém Rab18 e TIP47 associadas. (B) Os corpúsculos lipídicos aproximam-se do complexo de replicação (RC), localizado no RE, que contém NS5A e RNA do HCV (mostrado em preto). A proximidade é aumentada pela interação da Rab18, na superfície dos corpúsculos lipídicos, com a NS5A, no RC, facilitando a transferência do genoma viral para estas organelas. TIP47, na superfície dos corpúsculos lipídicos, também interage com a NS5A associada ao RNA viral para promover a transferência deste para a superfície das inclusões dinâmicas. Nesta, a interação entre C e NS5A parece ser aumentada pela apoJ, que migra do Golgi para os corpúsculos lipídicos durante a infecção do HCV (Adaptada de Filipe e McLauchlan 2015).

De modo interessante, já que os corpúsculos lipídicos fornecem os substratos necessários para a produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e ainda possuem proteínas virais na sua superfície, acredita-se que eles possam facilitar a interação entre o HCV e a via de VLDL, a fim de promover a montagem do vírus (Filipe e McLauchlan 2015). Conseqüentemente, pesquisas revelaram que as proteínas virais NS5A e C interagem com a apolipoproteína (apo) E (Benga et al. 2010; Cun et al. 2010) e apoJ (figura 1.7) (Lin et al. 2014), com impacto na produção de partículas virais infecciosas.

É possível que a NS5A possa facilitar o transporte do RNA viral, encontrado em complexos de replicação, para os corpúsculos lipídicos que contém a proteína C, promovendo a encapsidação e, conseqüentemente, a formação do nucleocapsídeo (Filipe e McLauchlan 2015). Dessa forma, foi observado que a proximidade entre os corpúsculos lipídicos e o RNA do HCV é dependente da associação dos mesmos com a proteína C (Targett-Adams et al.

2008a, 2008b). Além disso, a importância da associação dessas duas proteínas aos corpúsculos lipídicos foi enfatizada por um estudo que mostra que a não colocalização da C e NS5A na mesma organela lipídica prejudicava a montagem e liberação de partículas virais (Appel et al. 2008). Assim, parece que a produção do HCV não depende apenas do recrutamento de proteínas virais aos corpúsculos lipídicos, mas também da interação direta entre C e NS5A. O conjunto desses dados indicam que a via de produção de partículas virais infecciosas, que depende destas organelas dinâmicas, pode ser alvo de estratégias futuras para a prevenção e tratamento da infecção pelo HCV.

A habilidade de membros da família *Flaviviridae* interagir com corpúsculos lipídicos não se restringe apenas ao HCV. Um patógeno intimamente relacionado a este, o vírus GB-B (GBV-B) – associado com hepatite aguda em micos experimentalmente infectados (Stapleton et al. 2011) – também interage com os corpúsculos lipídicos através da proteína C, que apresenta uma região homóloga ao domínio D2 da C do HCV (Hope et al. 2002).

Uma vez que o domínio D2 não está presente na proteína C dos flavivírus, uma associação entre esta proteína do DENV e os corpúsculos lipídicos não era esperada. Estudos reportaram que a proteína C encontrava-se localizada tanto no citoplasma quanto no núcleo de células infectadas pelo DENV. Ao contrário da distribuição citoplasmática, a localização nuclear foi cuidadosamente analisada por diversos grupos de pesquisa (Wang et al. 2002; Sangiambut et al. 2008). Ao investigarmos a localização da proteína C do DENV-2, utilizando para isto condições apropriadas a fim de manter a integridade dos corpúsculos lipídicos, demonstramos que esta proteína encontrava-se localizada nos corpúsculos lipídicos de distintos tipos celulares e, portanto, fomos os primeiros a mostrar uma relação destas organelas com o DENV (Samsa et al. 2009). Além disso, constatamos que a associação da proteína C a estas organelas se dava através de resíduos hidrofóbicos específicos presentes na hélice $\alpha 2$ (L50 e L54), sugerindo que estes atuem como o domínio C-terminal D2 dos hepacivírus. Ainda neste trabalho, observamos, através de ensaios mutagênicos – no qual impedíamos a ligação da C aos corpúsculos lipídicos e reduzíamos a formação de partículas virais infecciosas – e de inibição farmacológica – onde reduzíamos significativamente a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo vírus e em paralelo a liberação do DENV-2 – a importância dos corpúsculos lipídicos na montagem do DENV (Samsa et al. 2009).

Em seguida, Carvalho e colaboradores (2012) caracterizaram as propriedades de interação entre a proteína C do DENV com corpúsculos lipídicos de hepatócitos e, através da técnica de espectroscopia de força baseada em microscopia de força atômica, foi constatado que esta associação é forte, dependente de altas concentrações intracelular de íons potássio, mas não de sódio. Adicionalmente, a inibição da bomba Na^+/K^+ -ATPase em células

infectadas pelo DENV resultou na dissociação da proteína C dos corpúsculos lipídicos e, conseqüentemente, inibição da produção de partículas virais infecciosas, confirmando a relevância desta interação. Complementarmente, os sítios de ligação desta proteína com os corpúsculos lipídicos foram mapeados, possibilitando a criação de um peptídeo com atividade inibitória, ou seja, que impede a ligação da C a estas organelas, contribuindo, então, para o desenvolvimento de possíveis intervenções farmacológicas contra a dengue (Martins et al. 2012; Faustino et al. 2015a).

Recentemente foi descrito o mecanismo pelo qual a proteína C é transportada da membrana do RE, onde a proteína é sintetizada, para os corpúsculos lipídicos. O estudo constatou que a via do hospedeiro GBF1-Arf1/Arf4-COPI é necessária para o transporte da C para os corpúsculos lipídicos, sendo este processo independente tanto de COPII quanto da integridade do Golgi (Iglesias et al. 2015).

De forma similar ao HCV, o DENV utiliza a maquinaria do hospedeiro para o seu benefício, a fim de promover uma replicação viral eficiente. Dessa forma, foi demonstrado que a NS3 medeia o recrutamento da enzima ácido graxo sintase (FAS) para os sítios de replicação viral, visando aumentar a síntese lipídica para o estabelecimento do complexo de replicação eficiente (Heaton et al. 2010). Embora esta pesquisa não tenha avaliado o possível papel dos corpúsculos lipídicos nesse processo, foi recentemente observado que a Rab18 está envolvida na interação da FAS com a NS3 e também é responsável pelo direcionamento desta enzima tanto para o RE quanto para os corpúsculos lipídicos (Tang et al. 2014). Esses dados fortemente sugerem que a maquinaria funcional da Rab18 é requerida para facilitar o ciclo de replicação do DENV, que requer grande quantidade de lipídios, tais como para a replicação e/ou montagem do vírus.

De forma interessante, foi demonstrado que a proteína C do DENV é capaz de interagir com a VLDL, mas não com a lipoproteína de baixa densidade (LDL), através da mesma porção utilizada para a associação aos corpúsculos lipídicos. Além disso foi observada a participação da apoE nesta interação, sugerindo que durante a infecção possa ocorrer a formação de partículas lipovirais, sendo esta uma possível nova etapa do ciclo de replicação do DENV (Faustino et al. 2014, 2015b).

Um diferente papel dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo DENV foi reportado por Heaton e Randall (2010). Estes observaram a depleção de corpúsculos lipídicos concomitante a elevada quantidade de autofagossomos durante a infecção. Embora já se saiba sobre a contribuição da autofagia para a replicação eficiente do DENV (Lee et al. 2008; Khakpoor et al. 2009), os mecanismos envolvidos ainda eram elusivos. Baseando-se em um estudo recente que ligava a autofagia ao metabolismo lipídico (Singh et al. 2009), Heaton e

Randall (2010) demonstraram que o DENV induz a degradação de corpúsculos lipídicos via autofagia, a fim de mobilizar triglicerídeos para serem utilizados na produção de energia (ATP) através da β -oxidação. Embora essa observação providencie uma explicação plausível de como o DENV se aproveita dessas organelas, além de corroborar uma associação entre corpúsculos lipídicos e autofagia, estudos são necessários para melhor compreensão desse processo.

Entretanto, nossos estudos mostraram que leucócitos isolados de pacientes com FHD apresentam um aumento no número de corpúsculos lipídicos quando comparado com leucócitos obtidos de voluntários sadios, sendo este fenômeno reproduzido *in vitro* através da infecção de diferentes tipos celulares (Samsa et al. 2009; Assunção-Miranda et al. 2010). Em paralelo ao aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV, observamos um aumento na secreção de PGE₂. Contudo, nossos dados não são suficientes para afirmar se estas organelas estão envolvidas na síntese e secreção de PGE₂ durante a infecção, sendo necessários estudos adicionais que avaliem esta hipótese. Por fim, também constatamos que o MIF encontra-se estocado nos corpúsculos lipídicos de macrófagos humanos infectados pelo DENV *in vitro*; todavia, estudos complementares são essenciais para definir a relação funcional entre o MIF e estas organelas (Assunção-Miranda et al. 2010).

Apesar dos corpúsculos lipídicos serem geralmente associados à produção de partículas virais infecciosas e/ou replicação, foi observada uma possível participação destas organelas em mecanismos antivirais durante a infecção por membros da família *Flaviviridae* (Helbig et al. 2011, 2013). Estes estudos constataram que a proteína antiviral do hospedeiro viperina, que é regulada durante diversas infecções virais, pode ser também induzida durante a infecção pelo HCV (Helbig et al. 2011) ou pelo DENV (Helbig et al. 2013). Esta proteína encontra-se localizada nos corpúsculos lipídicos durante a infecção por ambos os vírus. No caso da infecção pelo HCV, a viperina interage com a proteína NS5A nestas inclusões citoplasmáticas. Além disso, a remoção da hélice anfipática desta proteína redirecionou a localização da viperina, antes no RE e nos corpúsculos lipídicos, para o citoplasma, coincidindo com uma redução do efeito antiviral. Já durante a infecção pelo DENV, esta proteína mostrou-se eficaz na redução da amplificação do RNA genômico e da secreção de partículas virais infecciosas, embora não participe da entrada do DENV. Adicionalmente, a viperina, localizada nos corpúsculos lipídicos durante a infecção, foi capaz de interagir com as proteínas C e NS3, bem como com o RNA viral. Entretanto a atividade antiviral exercida pela viperina não estava diretamente associada a localização nestas organelas citoplasmáticas.

Sendo assim, embora avanços recentes tenham demonstrado o envolvimento dos corpúsculos lipídicos na infecção por membros da família *Flaviviridae*, pesquisas são

necessárias para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na biogênese e função destas organelas dinâmicas durante a infecção pelo DENV.

1.3 Hipótese e justificativa

Parece que o papel exercido pelos corpúsculos lipídicos, durante processos infecciosos, os torne alvo bastante interessante para determinados patógenos, especialmente aqueles que modulam processos do hospedeiro a fim de facilitar a replicação e, conseqüentemente, a propagação dos mesmos. De fato, isto parece ser relevante durante a infecção pelo DENV, uma vez que os corpúsculos lipídicos atuam como sítios de localização da proteína do capsídeo viral e estão intimamente relacionados com a produção de partículas virais infecciosas (Samsa et al. 2009).

Na literatura atual, apesar de muitos estudos terem documentado o papel dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo HCV, pouco se sabe sobre o envolvimento destas organelas durante a infecção pelo DENV. Sendo assim, o estudo da biogênese e função dos corpúsculos lipídicos na dengue parece ser de grande importância para o entendimento da replicação, bem como para o estudo da modulação da síntese de mediadores inflamatórios.

Além disso, é possível que o estudo dos mecanismos responsáveis pela intensificação da resposta inflamatória na dengue contribua para a compreensão da patogênese da doença. Entretanto, os principais efetores envolvidos nesta resposta exacerbada não são totalmente esclarecidos. Enquanto a participação de linfócitos e monócitos ativados é amplamente descrita (Durbin et al. 2008; Jaiyen et al. 2009; Azeredo et al. 2010; Dung et al. 2010), a contribuição de outros efetores como as plaquetas é pouco explorada. As plaquetas, classicamente conhecidas por suas funções hemostáticas, são cada vez mais descritas como células inflamatórias (Weyrich et al. 2003; Vieira-de-Abreu et al. 2012).

A adesão de plaquetas ativadas por diferentes estímulos a monócitos sinaliza para a síntese de mediadores pró-inflamatórios e formação de corpúsculos lipídicos (Weyrich et al. 1996, 2005; Dixon et al. 2006; Badrnya et al. 2013; Feng et al. 2014). Dentro deste contexto, Hottz e colaboradores (2014) demonstraram que monócitos obtidos de voluntários saudáveis expostos a plaquetas isoladas de pacientes com dengue secretam IL-1 β , CXCL8/IL-8, IL-10 e MCP-1. Entretanto, os mecanismos envolvidos na interação plaqueta-monócito, durante a dengue, sobre a ativação dos monócitos ainda precisam ser esclarecidos e é de suma importância para a compreensão dos mecanismos que promovem a exacerbção da resposta inflamatória observada durante as formas graves da doença.

A nossa hipótese é de que os corpúsculos lipídicos estejam diretamente envolvidos na patogênese da dengue, contribuindo para a secreção aumentada de mediadores inflamatórios e

atuando como plataforma para a replicação viral. Dessa forma, investigamos, nesta tese, os mecanismos moleculares envolvidos na formação e função destas organelas citoplasmáticas em distintos tipos celulares infectados com o DENV. Além disso, avaliamos a participação de plaquetas ativadas com o DENV na imunomodulação dos monócitos, focando em seu impacto na amplificação da resposta inflamatória que possa culminar tanto na secreção de mediadores inflamatórios, quanto na gênese de corpúsculos lipídicos. A compreensão destes eventos é de grande relevância para o entendimento da patogenia da dengue, onde a própria modulação dos corpúsculos lipídicos possa representar um potencial alvo terapêutico.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

→ Estudar o papel do vírus dengue na formação e função dos corpúsculos lipídicos.

2.2 Objetivos específicos

Parte I: Biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus dengue in vitro.

→ Analisar a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo vírus dengue em distintos tipos celulares;

→ Avaliar a modulação farmacológica da formação de corpúsculos lipídicos e o seu impacto na replicação do vírus dengue;

→ Investigar a modulação de genes envolvidos no metabolismo lipídico durante a infecção viral.

Parte II: Plaquetas ativadas com o vírus dengue modulam o metabolismo lipídico e a ativação de monócitos através da interação direta entre estas células e da sinalização mediada por citocinas inflamatórias.

→ Estudar os efeitos de plaquetas ativadas com o vírus dengue *in vitro* sobre a imunomodulação de monócitos, no que diz respeito à formação de agregado celular, biogênese de corpúsculos lipídicos e secreção de mediadores inflamatórios;

→ Investigar o efeito de drogas que atuam na biogênese de corpúsculos lipídicos sobre a secreção de mediadores inflamatórios;

→ Identificar a participação de mediadores inflamatórios secretados por plaquetas ativadas com o vírus dengue na sinalização que culmina na ativação dos monócitos.

3 Materiais e métodos

3.1 Voluntários

Amostras de sangue periférico foram obtidas de voluntários saudáveis. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC (#016/2010) e os experimentos executados de acordo com este protocolo. O consentimento para a participação na pesquisa foi obtido de todos os voluntários saudáveis antes de qualquer procedimento associado ao estudo.

3.2 Cultura de células

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas de voluntários saudáveis, através de gradiente de densidade em Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Os gradientes foram montados em tubos de polipropileno estéreis (Corning), com 25 mL de sangue sobreposto a uma coluna de 15 mL de Ficoll. O número de gradientes variou de acordo com o volume de sangue obtido. Os gradientes foram centrifugados a 900 x g por 20 min a temperatura ambiente e os anéis de leucócitos mononucleares, formados na interface do gradiente, foram recolhidos e lavados três vezes com RPMI-1640 (Gibco). Os precipitados foram reunidos e ressuspensos em meio de cultura. Uma alíquota dessa suspensão foi retirada para quantificação e análise da viabilidade em câmara de Neubauer com azul de tripan 0,4%. As células foram, então, plaqueadas em placas de 8 poços (Lab-Tek®, Thermo Scientific) com meio de cultura RPMI 1640, e mantidas na estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, por 2-3 h para adesão, principalmente, dos monócitos. Após o período de incubação, o sobrenadante das culturas foi descartado e os poços foram lavados vigorosamente por pelo menos três vezes, com meio RPMI-1640, para remoção de células não aderentes, e, conseqüentemente, enriquecimento em monócitos. Ao final das lavagens foram adicionados meio suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e as células mononucleares foram mantidas em estufa por 18 h.

Células das linhagens de hepatocarcinoma humano, HepG2 e Huh7, foram inicialmente cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 mL do meio de cultura DMEM (modificado com 1g/L de glicose, 1 mM de piruvato de sódio, 4 mM de L-glutamina e 0,04 mM de vermelho de fenol; Gibco) suplementado com 10% de SFB, e mantidas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂.

Células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), uma linhagem de fibroblastos provenientes de rim de hamster, foram mantidas, inicialmente, em garrafas de cultura de 25 cm², contendo

10 mL do meio mínimo essencial α (α -MEM; Gibco) suplementado com 10% de SFB, a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂.

Células A549, uma linhagem celular epitelial derivada de carcinoma pulmonar humano, foram inicialmente cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 mL do meio de cultura DMEM, (modificado com 1g/L de glicose, 1 mM de piruvato de sódio, 4 mM de L-glutamina e 0,04 mM de vermelho de fenol; Gibco) suplementado com 10% de SFB, e mantidas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂.

Células de mosquito *Aedes albopictus*, C6/36, foram cultivadas, inicialmente, em garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 mL do meio de cultura L-15 (Leibovitz; Invitrogen) suplementado com 0,3% de triptose fosfato, 0,75 g/L de bicarbonato de sódio, 1,4 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e 10% de SFB, a 28°C em estufa do tipo B.O.D.

As células HepG2 e C6/36 foram gentilmente cedidas pela Dra. Andrea Da Poian (Universidade Federal do Rio de Janeiro) enquanto as células BHK-21 pela Dra. Andrea Gamarnik (Instituto Leloir).

3.3 Produção viral

3.3.1 Preparo dos estoques do DENV-2

Para a produção dos estoques do DENV-2 (cepa 16681), as células C6/36 foram infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 em meio de cultura sem SFB por 90 min. Passado esse período, o meio de cultura foi trocado, suplementado com 2% de SFB e as células foram mantidas por 9 dias a 28°C em estufa do tipo B.O.D. Após esse tempo, o meio de cultura contendo as partículas virais foi coletado e centrifugado a 1.000 x g por 5 min para a remoção de *debris* celulares. O sobrenadante foi aliqotado em tubos criogênicos estéreis e armazenados a -80°C. Como controle desse preparo (controle de secretado), as células C6/36 foram submetidas ao mesmo procedimento citado anteriormente, entretanto não foram infectadas – amostras mock. O DENV-2 16681 foi gentilmente cedido por Halstead em 1996 e inicialmente produzido em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Vírus – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para obtenção do DENV-2 com título concentrado, tanto a suspensão viral quanto o mock foram centrifugados em filtros de centrífuga Centricon YM-100 de acordo com as especificações do fabricante (Merck Millipore). Após a filtração, as frações retidas (DENV-2 concentrado e mock) foram coletadas e diretamente utilizadas nos experimentos.

3.3.2 Preparo do DENV-2 inativado

O DENV-2 foi inativado através da incubação do estoque viral a 65°C por 30 minutos. Este procedimento foi realizado imediatamente antes da infecção das células.

3.4 Titulação viral

Células BHK-21 confluentes foram infectadas com diluições crescentes do estoque viral na ausência de SFB. Após o período de adsorção de 90 min, o inóculo viral foi removido e adicionado às células uma solução de carboximetilcelulose 1% em meio de cultura α -MEM suplementado com 1% de SFB. Após 5 dias a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂, as células foram fixadas em formaldeído, com concentração final de 4%, por 1 h. Ao término deste tempo, foram lavadas abundantemente e coradas com solução de 1% de cristal violeta e 20% de etanol por 40 min. O título foi calculado a partir do número de placas contadas nos poços correspondentes às diluições e expresso em unidade formadora de placa por mL (PFU/mL).

3.5 Infecção viral *in vitro*

Células de linhagens HepG2, Huh-7, BHK-21 e A549, cultivadas em garrafas de cultura, foram tripsinizadas e a suspensão de células recolhida e adicionada à quantidade equivalente de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Essa suspensão foi centrifugada a 500 x g por 10 min e a 4°C. Passado este procedimento, as células foram ressuspensas em meio de cultura suplementado com 2% de SFB, plaqueadas em placas de 24 poços, contendo ou não lamínulas, e incubadas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 ou 48 h, as células semiconfluentes foram infectadas, com a MOI indicada, pelo DENV-2 ou DENV-2 inativado por aquecimento. A infecção foi realizada em meio de cultura sem SFB por 90 min. Ao término do período de adsorção, o inóculo viral foi removido e adicionado às células meio de cultura suplementado com 2% de SFB. As culturas, então, foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, por 24 ou 48 h para posterior análise. Como controle da infecção, as células foram submetidas ao mesmo procedimento, porém ao invés de serem infectadas foram incubadas com o mock.

As PBMC foram extensivamente lavadas para a remoção de células não aderidas e, em seguida, os monócitos foram infectados pelo DENV-2, MOI = 4, em meio de cultura RPMI-1640 sem SFB. Após 2 h, o meio foi trocado por RPMI-1640 suplementado com 2% de SFB e as células foram mantidas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h.

A viabilidade celular durante a infecção foi determinada por ensaio de exclusão com o corante azul de tripan e as análises neste estudo foram realizadas com viabilidade celular > 90%.

3.6 Tratamentos com inibidores específicos ou agonista proteico

Após o período de adsorção viral (90 min), as células HepG2, Huh-7 ou BHK-21 foram tratadas com diferentes concentrações de drogas que atuam sobre o metabolismo lipídico: C75 (Cayman Chemicals ou Sigma) – um inibidor da enzima ácido graxo sintase – ou triacsin C (Sigma) – um inibidor da enzima acil-CoA sintetase – por 24 ou 48 h. Em paralelo, células HepG2 infectadas foram tratadas com diferentes concentrações do inibidor de MIF, ISO-1 (Calbiochem), ou anticorpos neutralizantes anti-MIF (R&D Systems) por 24 h. As drogas citadas foram ressuspensas em DMSO (Sigma) estéril e na hora do uso diluídas em meio de cultura. Como controle experimental, as células foram tratadas com DMSO, na mesma concentração máxima da droga utilizada, diluído em meio. As células infectadas e tratadas foram mantidas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂.

Células HepG2 ou PBMC, cultivadas em meio de cultura com 2% de SFB, foram estimuladas com diferentes concentrações de MIF recombinante humano (rhMIF) (R&D Systems) seguidas, ou não, de tratamento com diferentes concentrações de ISO-1. Como controle experimental, as células foram tratadas com o diluente do rhMIF (PBS + albumina do soro bovino) em meio de cultura. As células estimuladas com a proteína recombinante ou controle foram mantidas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h.

A viabilidade celular na presença da proteína recombinante e/ou das drogas foi determinada por ensaio de exclusão com o corante azul de tripan e as análises neste estudo foram realizadas com viabilidade celular > 90%.

3.7 PCR em tempo real (qRT-PCR)

3.7.1 Para quantificação viral

A extração do RNA de células BHK-21 ou HepG2 infectadas com o DENV-2 e tratadas com inibidores do metabolismo lipídico, por 24 h, foi realizada através da adição, à cultura celular, de 1 mL do reagente Trizol® (Invitrogen). Após homogeneização, as amostras foram incubadas com 200 µL de clorofórmio (Vetec) por 5 min a 25°C, misturadas por 2 min e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min e a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado pela adição de 700 µM de álcool isopropílico (Vetec). As amostras foram mantidas a 25°C por 15 min e centrifugadas a 14.000 x g por 10 min e a 4°C.

O precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol (Vetec) 75% e, em seguida, centrifugado a 7.500 x g por 5 min e a 4°C, secado em capela e dissolvido em 20 µL de água livre de RNase. O RNA foi quantificado através de espectrofotômetro a 260/280 nm.

O cDNA foi sintetizado utilizando kit específico (*High-Capacity cDNA reverse transcription kit*, Applied Biosystems). Para isso, 5µg de cada amostra de RNA foi misturada com 2 µL do tampão de transcrição reversa 10x, 0,8 µL de dNTPs 25x, 2 µL de iniciadores randômicos 10x, 1 µL de transcriptase reversa MultiScribe™ e água livre de RNase para 20 µL totais. As amostras foram mantidas a 25°C por 10 min e a 37°C por 2 h.

A PCR em tempo real (do inglês *Real Time Quantitative Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*, qRT-PCR) foi realizada pelo sistema Taqman (Applied Biosystems) em termociclador (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems), utilizando-se iniciadores para a região não codificante 5' do DENV (*forward*: 5'-ATTAGAGAGCAGATCTCTG-3'; *reverse*: 5'-TGACACGCGGTTTC-3'; *probe*: 5'-TCAATATGCTGAAACGCG-3') nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 min seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 seg, 45°C por 30 seg e 72°C por 1 min.

Para a construção da curva padrão, diferentes concentrações do vetor D2pGEMt foram amplificadas. Os valores de Ct, obtidos para as concentrações conhecidas do plasmídeo, foram plotados contra o log do número de cópias de genoma equivalente (DNA equivalente ao RNA viral). A curva resultante foi utilizada tanto para determinar o número de cópias do genoma equivalente ao RNA do DENV nas amostras experimentais, quanto para o cálculo da eficiência da reação (97%) (Conceição et al. 2010b).

3.7.2 Para análise da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico

Para a purificação do mRNA de células HepG2 infectadas, ou não, com o DENV-2 e tratadas com diferentes concentrações de ISO-1 (Calbiochem), anticorpos neutralizantes anti-MIF (R&D Systems), rhMIF (R&D Systems) ou veículo, por 24 h, foi utilizado o RNAeasy Plus Mini Kit (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida foi feita a produção das fitas de DNA complementar (cDNA) com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis for RT-PCR* (Applied Biosystems), também segundo o protocolo do fabricante. Como controle normalizador da reação foi utilizado o gene constitutivo hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT). Foram utilizadas para estas reações sondas TaqMan® (Applied Biosystems) e o termociclador *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As reações foram feitas em duplicatas para cada gene, utilizando 300 ng de cada um dos diferentes cDNA diluídos em água, 0,5 µL da sonda e 5 µL de tampão universal PCR Mastermix TaqMan®, gerando um volume final de 10 µL. As

condições da reação foram: 60°C por 2 min, seguido de 95° C por 10 min e 40 ciclos: 95°C por 15 seg e 60°C por 1min.

A análise dos dados foi feita por normalização pelo controle endógeno: a partir dos valores de Ct de cada gene calculamos a diferença para o final da reação (40 ciclos - Ct). Após, calculamos o número de fitas amplificadas através do cálculo $2^{(40-Ct)}$. A razão entre o número de fitas amplificadas do gene teste pelo número de fitas amplificadas do gene constitutivo gera o nível de mRNA normalizado, que é expresso nos gráficos (Szatmari et al. 2006).

Abaixo estão listados os genes avaliados:

HPRT	Hs01003267_m1
ABCA1	Hs01059118_m1
PLIN2 (ADRP)	Hs00605340_m1
ACAT1	Hs01011096_m1
NR1C3 (PPAR γ)	Hs01115513_m1
NR1C1 (PPAR α)	Hs00947537_m1
FASN	Hs00188012_m1

3.8 Isolamento de plaquetas

As plaquetas foram isoladas utilizando o método de Hamburger e McEver (1990). 50 ou 100 mL de sangue foram colhidos a partir de punção venosa usando escalpe de 21G em seringa contendo ACD (8 g/L de ácido cítrico, 22,4 g/L de citrato de sódio e 2 g/L de dextrose; pH 5,1). O sangue foi centrifugado a 200 x g por 20 min a temperatura ambiente para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi coletado e centrifugado a 500 x g por 20 min na presença de 100 nM de PGE₁ (Cayman Chemical 13010.1). O sobrenadante foi descartado, as plaquetas ressuspensas em PSG (5mM de PIPES, 145 mM de NaCl, 4mM de KCl, 50 μ M de Na₂HPO₄, 1 mM de MgCl₂.6 H₂O, 5,5 mM de glicose; pH 6,8) contendo 100 nM de PGE₁ e centrifugadas a 500 x g por 20 min a temperatura ambiente. As plaquetas foram ressuspensas em meio 199 (M199 com EBSS, L-glutamina e HEPES; Lonza 12-117F) e mantidas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ até a realização dos ensaios.

3.9 Isolamento de monócitos

PBMC foram isoladas do sangue total, sem o PRP, através da centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), como previamente descrito no item 3.2. Após lavagens subsequentes com PBS, as células mononucleares foram ressuspensas para 10⁸/mL em PBS contendo 1mM de EDTA e 2% de SFB. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD14 (1:10) por 15 min, com esferas magnéticas cobertas com dextran (1:20) por 10 min e ressuspensas para um volume final de 2,5 mL em PBS contendo

1mM de EDTA e 2% de SFB. Os monócitos (CD14⁺) foram selecionados a partir da exposição a um campo magnético por 5 min (Kit para seleção positiva de CD14 humano, StemCell, Easy Sep Technology). As células positivas para CD14, então, foram ressuspensas em 2,5 mL do tampão previamente citado e a última etapa foi repetida por mais 2 vezes. A viabilidade (> 90% de células viáveis) foi avaliada pela marcação com azul de tripan.

3.10 Ativação de plaquetas com agonista ou DENV *in vitro*

Plaquetas isoladas de voluntários saudáveis foram incubadas com 0,5 U/mL de trombina (Sigma T1063) ou com o DENV-2 MOI = 1, a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂, por 2 h. Passado este tempo, as células foram centrifugadas a 900 x g por 10 min e a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, armazenado a -80°C até o momento do uso e as plaquetas foram lavadas por três vezes com M199, a fim de garantir que as partículas virais não aderidas fossem removidas. Como controle experimental, as células foram incubadas com meio de cultura ou mock nas mesmas condições.

3.11 Interação plaqueta-monócito *in vitro*

Para o estudo de interação foram utilizados plaquetas e monócitos autólogos. Plaquetas ativadas com trombina ou DENV-2 (como descrito no item 3.10) foram incubadas com monócitos, a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂, por 30 min, 1, 2 ou 18 h. Como controle experimental, plaquetas expostas ao M199 ou mock foram incubadas com monócitos nas mesmas condições descritas. Cada ponto experimental continha 10⁵ monócitos e 10⁷ plaquetas em um volume de 200 µL de M199. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 900 x g e ensaios subsequentes foram realizados. Em determinados experimentos, as plaquetas e os monócitos foram tratados, 30 min antes da interação, com ISO-1 (Calbiochem) 100 µM, C75 (Sigma) 1µg/mL ou veículo (DMSO) e mantidos, a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂, por 18 h. Os sobrenadantes das plaquetas, dos monócitos e dos agregados plaqueta-monócito foram coletados e congelados a -80°C até o momento do uso.

3.12 Citometria de fluxo

Plaquetas foram distinguidas pela marcação com anti-CD41 conjugado a fluoresceína isotiocianato (FITC) ou ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen) (1:20, 30 min) e pelos tamanho e complexidade característicos. Já os monócitos, pela marcação com anti-CD14 conjugado a FITC ou PE (BD Pharmingen) (1:10, 20 min) e pelos tamanho e granulosidade específicos. Os agregados plaqueta-monócito foram observados pela dupla positividade para os anticorpos citados acima. Para o estudo da biogênese de corpúsculos lipídicos, as células foram

incubadas com a sonda lipídica fluorescente BODIPY™ 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3^a,4^a-diazas-indaceno) (Molecular Probes) (1:50.000, 30 min). Controles de isotipo foram usados para controlar a ligação inespecífica dos anticorpos. As células marcadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 min. 2.000 a 5.000 eventos por região foram adquiridos em citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) após compensação apropriada das cores. Todas as aquisições foram analisadas com o programa CellQuest Pro (BD Bioscience).

3.13 Coloração e numeração dos corpúsculos lipídicos

3.13.1 Por tetróxido de ósmio

As lamínulas contidas nas placas de 24 poços dos grupos controle ou infectado com o DENV-2 (24 ou 48 h), tratados ou não, foram fixadas em formalina 3,7% em PBS (pH 7,4) por 15 min. Em seguida, lavadas em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4), diluído em água Milli-Q, e fixadas em tetróxido de ósmio 1,5%, diluído em tampão cacodilato, por 30 min. Passado o tempo determinado, as lamínulas foram lavadas em água destilada e tratadas com tiocarbohidrazida 1% por 5 min. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e tampão cacodilato 0,1 M. Por fim, as lamínulas foram contrastadas em tetróxido de ósmio 1,5% durante 3 min, lavadas com água destilada e secadas em capela de exaustão, onde o procedimento de coloração foi realizado. As lâminas foram montadas, a morfologia das células fixadas foi observada e os corpúsculos lipídicos foram enumerados por microscópio de campo claro, em objetiva de imersão (100x) considerando-se um total de 50 células consecutivas por lâmina. Similarmente, o mesmo procedimento foi realizado nos poços da Lab-Tek® (Thermo Scientific).

3.13.2 Por Oil Red O

A coloração de corpúsculos lipídicos foi realizada com o corante de lipídios neutros, oil red O (ORO), onde as lamínulas contendo as células foram fixadas em formalina 3,7% em PBS (pH 7,4) por 15 min e lavadas três vezes com água destilada. Posteriormente, as lamínulas receberam propilenoglicol 100% durante 5 minutos, seguido de ORO 0,5% por 8 min. Em seguida, foram lavadas novamente com água destilada e cobertas com propilenoglicol 80% por 5 min. Passado o tempo determinado, as lamínulas foram lavadas por duas vezes com água destilada e montadas com o meio Vectashield® (Vector) contendo DAPI para a contra-coloração do núcleo. A morfologia das células fixadas foi observada em microscopia de fluorescência, equipado com câmera digital, em objetiva de 60x. Os

corpúsculos lipídicos foram analisados no campo claro e um total de seis campos por lâmina, em triplicata, foram fotografados. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji) utilizando-se uma macro específica, gentilmente cedida pela Dra. Luciana Moreira.

3.13.3 Por sonda lipídica fluorescente (BODIPY)

Os agregados plaqueta-monócito foram citocentrifugados e as lâminas fixadas em paraformaldeído 4% por 15 min. Já as lamínulas contendo as células BHK-21 foram fixadas em formalina 3,7% em PBS (pH 7,4) por 15 min. Após esse período, foram lavadas por três vezes com PBS. Em seguida, incubadas com sonda lipídica fluorescente – BODIPY™ 493/503 (Molecular Probes) – durante 5 min. Posteriormente, foram lavadas com PBS e montadas com o meio Vectashield® (Vector) contendo DAPI para a contra-coloração do núcleo. As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência ou confocal (Olympus), em objetiva de 60x. Um total de dez campos por lâmina foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji) utilizando-se uma macro específica, gentilmente criada pelo Dr. Jens Rietdorf.

3.14 Localização subcelular de COX-2 por microscopia confocal

Após 18 h de interação entre plaquetas ativadas, ou não, e monócitos, as células foram citocentrifugadas e fixadas em formaldeído 4% por 15 min. Posteriormente, foram lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS por 20 min. Passado essa etapa, as células foram lavadas com PBS e incubadas com cloreto de amônio 50 mM por 10 min. Em seguida, foram lavadas com solução contendo Triton X-100 0,1% e BSA 0,2% em PBS (esta será utilizada durante o restante do procedimento, tanto para a realização de diluições quanto lavagens) e bloqueadas com soro de burro 1% por 30 min. Passado esse tempo, as células foram incubadas a 4°C com o anticorpo primário contra COX-2 (anticorpo policlonal de cabra, Santa Cruz SC-1747) (1:250) por 18 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas três vezes por 10 min e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-cabra conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), a temperatura ambiente, diluído na solução descrita (1:1000) por 45 min. A especificidade da marcação foi feita utilizando controle negativo, através do uso de isotipo controle IgG (Jackson Laboratories) de cabra no lugar do anticorpo primário. Por fim, as células foram lavadas três vezes por 10 min, montadas em meio Vectashield® (Vector) contendo DAPI para a contra-coloração do núcleo e analisadas no microscópio confocal Olympus FV101-O. O programa Olympus Fluoview FV1000 image acquisition software versão 5.0 foi utilizado para fotografar as lâminas.

3.15 Dosagem de PGE₂

Os níveis de PGE₂ nos sobrenadantes provenientes das interações de plaquetas ativadas com monócitos (tratadas com C75 ou veículo) foram avaliados por ensaio imunoenzimático, conforme as instruções do fabricante (Cayman Chemical, Inc). Placas de 96 poços foram cobertas com 200 µl de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo, diluído em tampão fosfato de potássio (0,05 M), durante o período de uma noite. No dia seguinte, as ligações inespecíficas foram bloqueadas pela adição de 200 µl de tampão fosfato de potássio (0,05 M) com BSA 1% e a placa foi mantida sob agitação por 4 h. Após este período, a placa foi lavada com Tween 20 a 0,05% em PBS (PBST). Em seguida, foram adicionados 50 µl das amostras previamente diluídas em EIA Buffer 1:200 ou 50 µl da PGE₂ na curva-padrão (1 ng/mL, 500, 250, 125, 63, 31 e 16 pg/mL diluídos em tampão fosfato de potássio 0,05 M com BSA 1%). O anticorpo anti-PGE₂ (50 µl) e a PGE₂ conjugada com colinesterase foram adicionados e incubados durante cerca de 16 h. Poços controle (branco) foram incluídos e receberam somente o tampão fosfato com 1% de BSA e a PGE₂ conjugada com colinesterase. Após esta etapa, a placa foi lavada por cinco vezes com PBST. Em seguida, foram adicionados 200 µl do reagente de Elmans, que contém o substrato para a enzima colinesterase (diluído em água Milli-Q, segundo as instruções do fabricante), para revelar a reação. A placa foi mantida sob agitação durante 2 h e os resultados obtidos com a leitura a 405 nm na leitora de placa. Os dados foram analisados com o programa “Soft Max Pro”, e a dosagem baseada na respectiva curva-padrão.

3.16 Dosagem de citocinas

As concentrações das citocinas CXCL8/IL-8, MIF, CXCL4/PF4 e CCL5/RANTES nos sobrenadantes das plaquetas, dos monócitos e dos agregados plaqueta-monócito foram quantificadas através da técnica de ELISA, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos (Duo set kit – R&D systems). Para essas análises foi utilizado o protocolo da Pharmingen, onde placas de 96 poços (Nunc) foram revestidas com anticorpos de captura. As placas foram cobertas e incubadas em torno de 16 h na geladeira. No dia seguinte, após 3 lavagens com PBS/Tween, as placas foram bloqueadas com PBS/BSA 1% para evitar as ligações inespecíficas. Após 1 h de intervalo, as placas foram submetidas a quatro lavagens, com o reagente específico, onde foram adicionadas as curvas-padrão bem como os sobrenadantes das células. Novamente foram incubadas por 16 h na geladeira. No último dia, após lavagem, os anticorpos de detecção conjugados com biotina foram adicionados, deixando-se por mais 1 h. As lavagens foram feitas e o substrato (avidina-peroxidase) foi colocado para incubação por cerca de 30 min. Em seguida, o revelador (OPD) foi adicionado. A leitura foi feita em

leitora de placa a 450 nm. Os dados foram analisados através do programa Soft Max Pro, com as dosagens baseadas nas respectivas curvas-padrão.

3.17 Ensaio de permeabilidade endotelial em Transwell

Células endoteliais de microvasculatura de derme humana (HMEC-1), foram cultivadas em meio MCDB131 (Sigma Aldrich) com 10% de SFB (Gibco, Invitrogen) até a confluência. Após tripsinização, as células foram plaqueadas em sistema de transwell de 96 poços (0,4 μm - Costar, Corning Inc) revestidos com gelatina 2% (Sigma Aldrich). Passado 72 h, o meio de cultura da câmara superior do transwell foi substituído por sobrenadantes de plaquetas ativadas, ou não, com trombina ou DENV-2. Para caracterizarmos a contribuição do MIF na permeabilidade celular, os sobrenadantes foram tratados com ISO-1 (Calbiochem) 100 μM ou veículo. Após 2 h de incubação à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, os sobrenadantes foram removidos e a permeabilidade foi mensurada pela passagem de albumina conjugada a FITC (150 μM em PBS) através da monocamada de células endoteliais. O conteúdo da câmara inferior do transwell foi recolhido após 15 min e a intensidade de fluorescência medida em leitora de placa a 520 nm de emissão e excitação a 480 nm. As alterações na permeabilidade foram expressas como mudança percentual em relação à passagem de albumina em células HMEC-1 não estimuladas (basal). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.18 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os dados obtidos neste estudo foram representados como média e erro padrão da média (EPM). As variáveis numéricas foram testadas para distribuição normal usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparações envolvendo mais de dois grupos a análise de variância (Oneway ANOVA) foi usada para determinar as diferenças e o pós-teste de Newman-Keuls foi utilizado para identificar a localização das diferenças entre os grupos. Para comparações entre células de um mesmo doador, na presença ou ausência de estímulo, foi utilizado o teste t pareado ou o teste U de Mann-Whitney (no caso de distribuição não-paramétrica). Foi considerado significativo os valores de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Parte I: Biogênese e função dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo DENV-2 *in vitro*

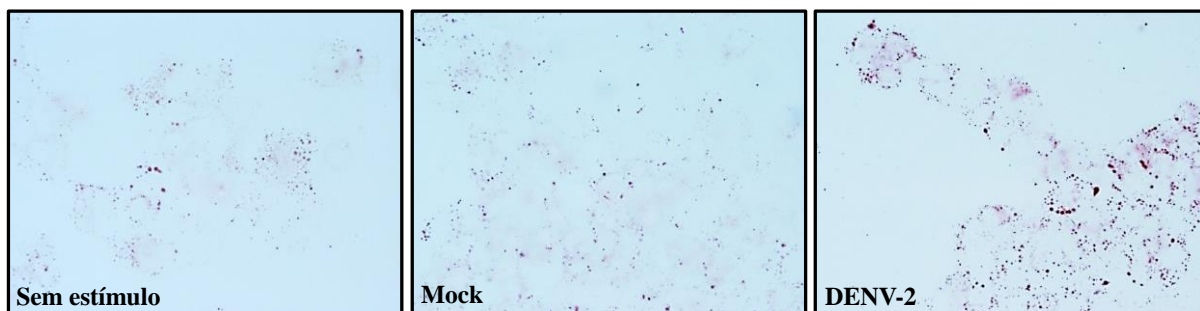
4.1.1 O DENV-2, mas não o DENV-2 inativado, induz a biogênese de corpúsculos lipídicos em distintos tipos celulares *in vitro*

A formação de corpúsculos lipídicos pode ser desencadeada por vários estímulos inflamatórios e infecciosos (Bozza et al. 2009). De fato, este fenômeno mostrou-se relevante durante a dengue (Samsa et al. 2009; Assunção-Miranda et al. 2010). Inicialmente constatamos um aumento da biogênese dessas organelas em células BHK-21 infectadas com o DENV-2 por 48 h *in vitro* (Samsa et al. 2009). De forma interessante, também observamos que leucócitos isolados de pacientes com FHD, causada pelo sorotipo 3, possuíam um número significativamente maior de corpúsculos lipídicos quando comparado com leucócitos obtidos de voluntários saudáveis (Assunção-Miranda et al. 2010). No entanto, os mecanismos envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV ainda precisam ser melhor elucidados. Por esse motivo, resolvemos avaliar, nesta primeira parte do estudo, a biogênese e função dessas organelas durante a infecção pelo DENV-2 *in vitro*.

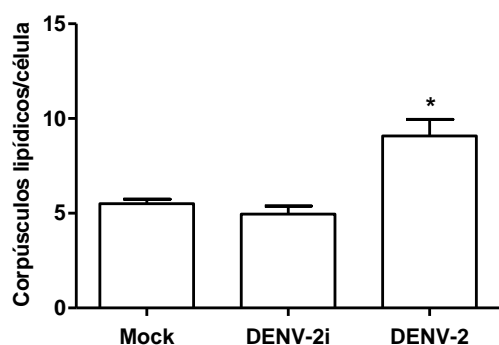
Observações clínicas e experimentais apontam para o envolvimento do fígado na dengue. Dados indicam que a permissividade celular seja modulada não apenas pelo sorotipo e cepa viral, mas também pelo próprio tipo celular (Seneviratne et al. 2006). Tendo em vista que os hepatócitos são considerados um dos principais alvos durante a infecção pelo DENV (Huerre et al. 2001), as células de linhagens hepáticas (HepG2 e Huh-7) apresentam-se como um bom modelo para o estudo da infecção *in vitro*. Além dessas, outras linhagens celulares têm sido extensivamente utilizadas para buscar uma melhor compreensão da relação entre o DENV e o hospedeiro, incluindo as células BHK-21 (Samsa et al. 2009) e A549 (Chiu et al. 2014; Iglesias et al. 2015).

Sendo assim, a fim de complementar nossos dados publicados, resolvemos avaliar a formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 em distintos tipos celulares *in vitro*. Dessa forma, investigamos o aumento em número e tamanho dessas organelas nas células HepG2 (figura 4.1), Huh-7 (figura 4.2), BHK-21 (figura 4.3) e A549 (figura 4.4) infectadas com o DENV-2 ou DENV-2 inativado por aquecimento, durante 24 ou 48 h. Nossos resultados indicam que o DENV-2, mas não o DENV-2 inativado, induz o aumento da biogênese e/ou do tamanho de corpúsculos lipídicos quando comparado com células incubadas com o mock.

(A)



(B)



(C)

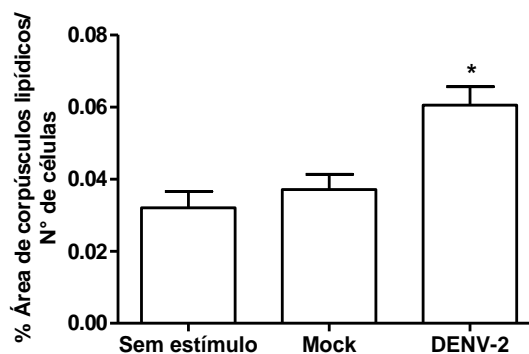
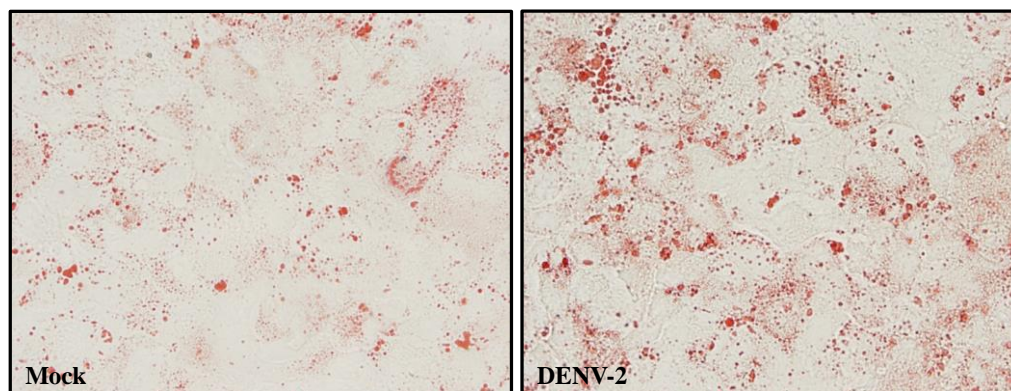


Figura 4.1 Efeito do DENV-2 sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células HepG2 *in vitro*. Células HepG2 foram cultivadas em triplicata com meio de cultura (sem estímulo), estimuladas com mock ou infectadas com DENV-2 ou DENV-2 inativado por aquecimento (DENV-2i), MOI de 2 (A,C) ou 4 (B), a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h, as células foram coradas por diferentes técnicas para a análise dos corpúsculos lipídicos. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação às células estimuladas com mock ou infectadas com DENV-2i; $p < 0,05$. (A,C) As células foram coradas com oil red O (ORO) e os corpúsculos lipídicos, de seis campos por lâmina, analisados por microscopia de campo claro. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji), utilizando-se uma macro específica, e os dados foram representados como % da área dos corpúsculos lipídicos pelo número total de células no campo analisado. As imagens em A são representativas e mostram células sem estímulo, estimuladas com mock ou infectadas com DENV-2. A média dos seis campos, em triplicata, foi plotada no gráfico C. (B) As células HepG2 foram contrastadas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos, de 50 células consecutivas, foi realizada em microscópio de campo claro. Os dados foram representados como média do número de corpúsculos lipídicos por célula.

(A)



(B)

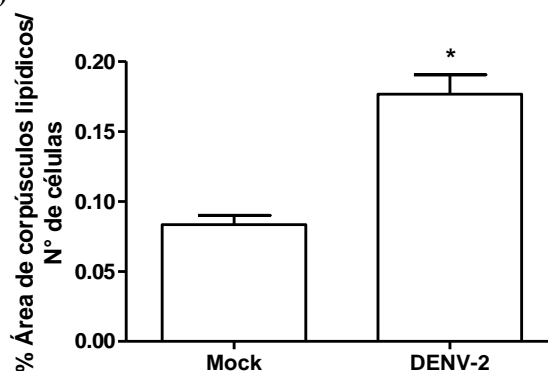
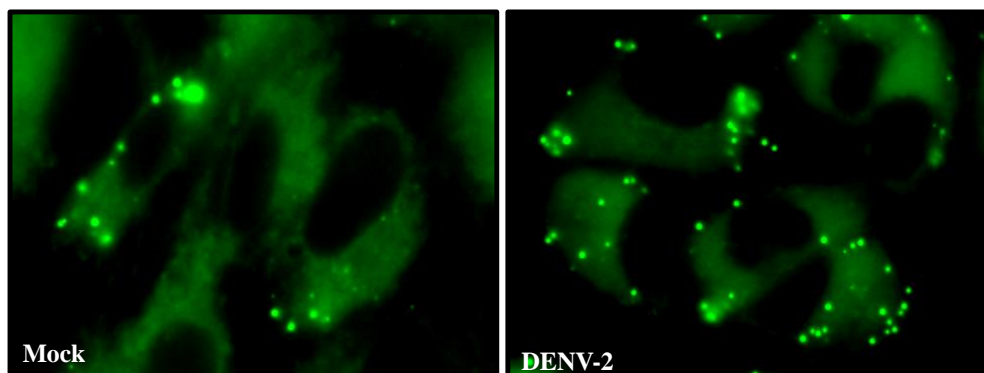
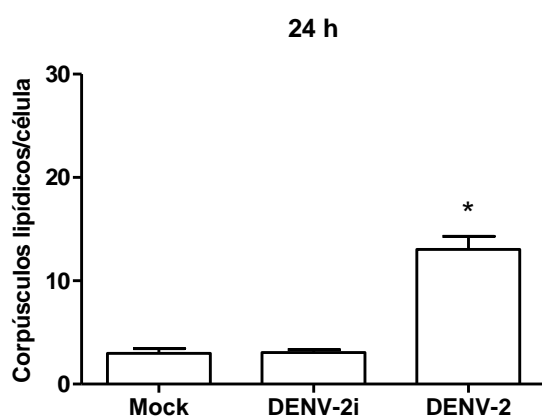


Figura 4.2 Efeito do DENV-2 sobre a área de corpúsculos lipídicos em células Huh-7 *in vitro*. Células Huh-7 foram cultivadas, em triplicata, com mock ou infectadas com DENV-2, MOI de 2, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 h. Após este tempo, as células foram coradas com oil red O (ORO) e os corpúsculos lipídicos, de seis campos por lâmina, analisados por microscopia de campo claro. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji), utilizando-se uma macro específica, e os dados foram representados como % da área dos corpúsculos lipídicos pelo número total de células no campo analisado. (A) As imagens são representativas e mostram células estimuladas com mock ou infectadas com o DENV-2. (B) A média dos seis campos, em triplicata, foi plotada no gráfico. Aproximadamente 400 células em média foram analisadas por lâmina e os resultados expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação às células estimuladas com mock; $p < 0,05$.

(A)



(B)



(C)

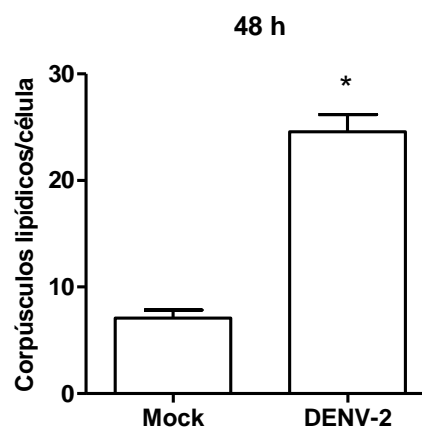
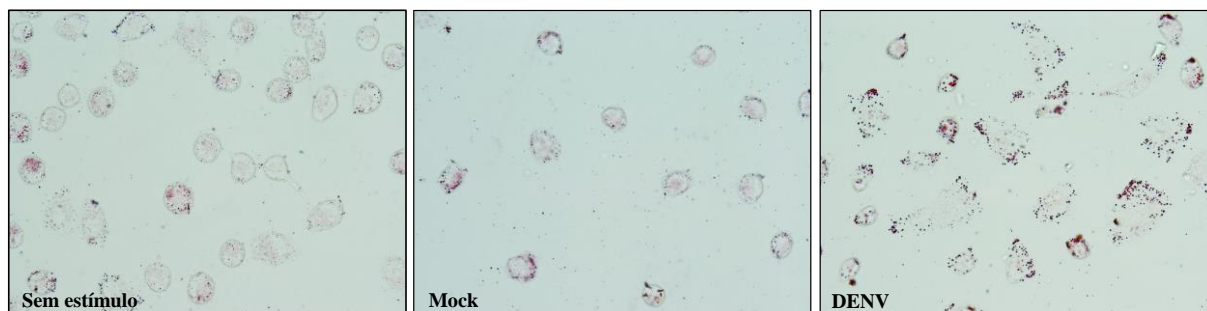


Figura 4.3 Efeito do DENV-2 sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em células BHK-21 *in vitro*. Células BHK-21 foram cultivadas em triplicata com mock, infectadas com DENV-2 ou DENV-2 inativado por aquecimento (DENV-2i), MOI de 10, e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h ou 48 h, as células foram marcadas com BODIPY™ (A) ou contrastadas com tetróxido de ósmio (B-C). As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência, enquanto que a contagem dos corpúsculos lipídicos, de 50 células consecutivas, foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e expressam a média ± EPM. * aumento significativo em relação às células estimuladas com mock ou infectadas com DENV-2i; $p < 0,05$.

(A)



(B)

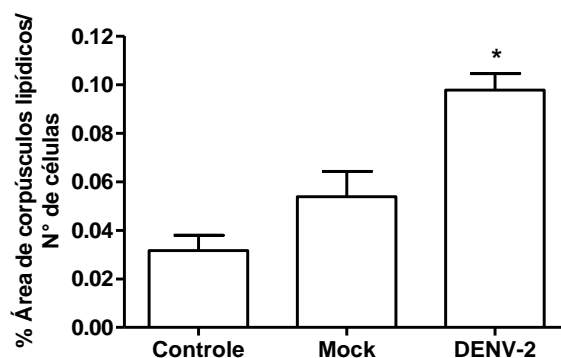


Figura 4.4 Efeito do DENV-2 sobre a área de corpúsculos lipídicos em células A549 *in vitro*. Células A549 foram cultivadas, em triplicata, com meio de cultura (sem estímulo), estimuladas com mock ou infectadas com DENV-2, MOI de 10, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 h. Após este tempo, as células foram coradas com oil red O (ORO) e os corpúsculos lipídicos, de seis campos por lâmina, analisados por microscopia de campo claro. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji), utilizando-se uma macro específica, e os dados foram representados como % da área dos corpúsculos lipídicos pelo número total de células no campo analisado. (A) As imagens são representativas e mostram células sem estímulo, estimuladas com mock ou infectadas com o DENV-2. (B) A média dos seis campos, em triplicata, foi plotada no gráfico. Aproximadamente 100 células em média foram analisadas por lâmina e os resultados expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação às células estimuladas com mock; $p < 0,05$.

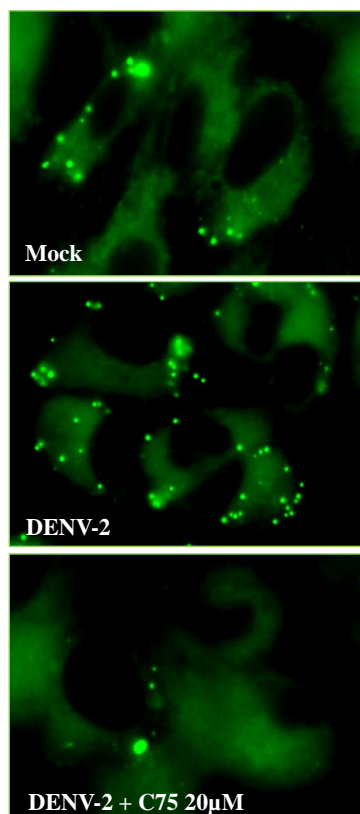
4.1.2 A biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 é bloqueada por inibidores do metabolismo lipídico

A formação de corpúsculos lipídicos, em diferentes tipos celulares, pode ser afetada por drogas capazes de inibir enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios (Fujimoto et al. 2006; Accioly et al. 2008). Durante a infecção pelo DENV, mostramos que a enzima ácido graxo sintase estava envolvida nesse processo (Samsa et al. 2009). Sendo assim, resolvemos estudar o efeito do C75 e triacsin C, drogas moduladoras da lipogênese, sobre a formação de corpúsculos lipídicos induzida durante a infecção pelo DENV-2.

Células BHK-21, HepG2 ou Huh-7 foram infectadas com o DENV-2 *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de C75, um potente inibidor da enzima ácido graxo sintase, durante 24 ou 48 h. Nossos resultados demonstraram que o tratamento das células BHK-21 e HepG2, com esta droga, promoveu uma redução significativa na formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 *in vitro* de uma maneira dose-dependente. Durante a infecção das células HepG2, a concentração de 5 μM de C75 já se mostrou eficaz na redução da biogênese dessas organelas (figura 4.6 C); enquanto que no caso das células BHK-21 era necessário pelo menos uma dose de 10 μM (figura 4.5). Além disso, constatamos que o tratamento das células Huh-7 com C75 levou a uma diminuição na área dos corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 *in vitro* (figura 4.6 A-B).

Em paralelo, observamos que células BHK-21 infectadas pelo DENV-2 *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de triacsin C, um inibidor da enzima acil-CoA sintetase, por 24 h, apresentavam uma redução significativa na biogênese destas organelas induzida durante a infecção apenas na dose de 10 μM (figura 4.7).

(A)



(B)

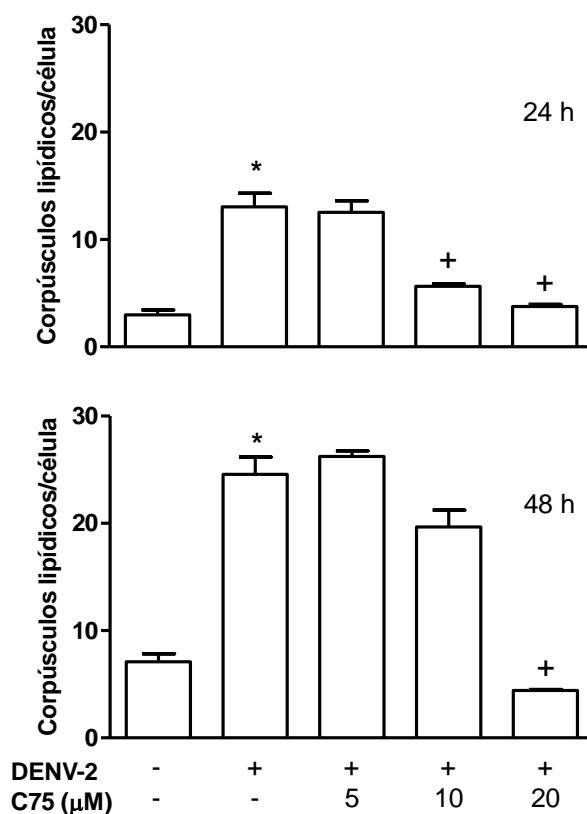
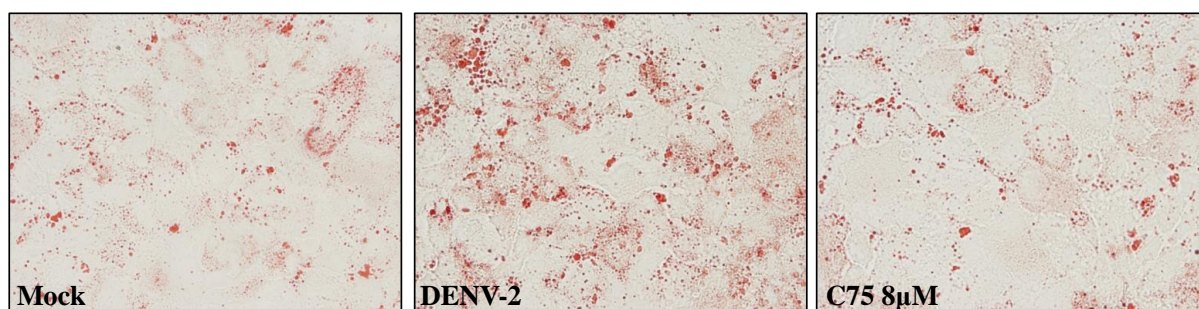
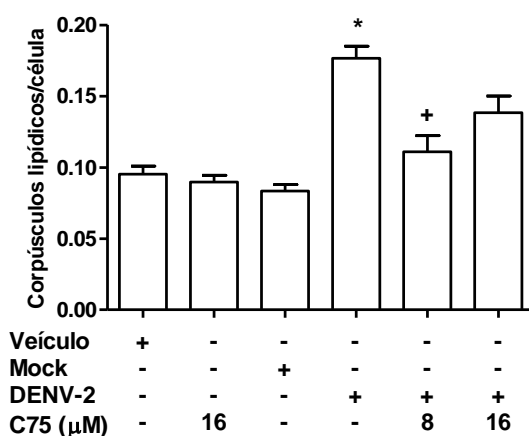


Figura 4.5 Análise de corpúsculos lipídicos em células BHK-21 infectadas pelo DENV-2 *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de C75. Células BHK-21 foram cultivadas em triplicata com mock ou infectadas com DENV-2 MOI de 10. Após o período de adsorção viral (90 minutos), o inóculo foi removido, as células foram tratadas com diferentes concentrações de C75 (Cayman Chemicals) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 ou 48 h. Passados estes tempos, as células foram coradas com BODIPY™ (A) ou contrastadas com tetróxido de ósmio (B). As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência, enquanto que a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock); + redução significativa em relação às células infectadas pelo DENV-2; $p < 0,05$.

(A)



(B)



(C)

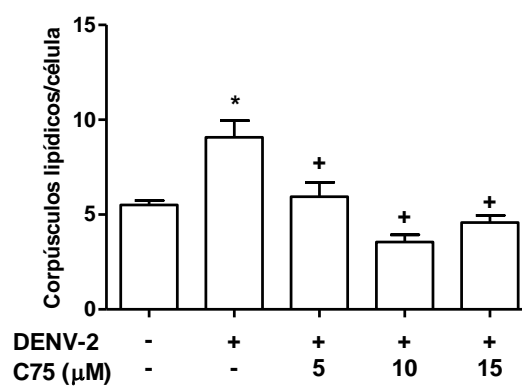


Figura 4.6 Análise de corpúsculos lipídicos em hepatócitos infectados pelo DENV-2 *in vitro* e tratados com diferentes concentrações de C75. Células Huh-7 (A-B) ou HepG2 (C) foram cultivadas em triplicata com veículo, mock ou infectadas com DENV-2 MOI de 2. Após o período de adsorção viral (90 minutos), o inóculo foi removido, as células foram tratadas com diferentes concentrações de C75 (Cayman Chemicals ou Sigma) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 h. Passado este tempo, as células foram coradas com ORO (A-B) ou contrastadas com tetróxido de ósmio (C). Os corpúsculos lipídicos das células Huh-7 (A-B), de seis campos por lâmina, foram analisados por microscopia de campo claro. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji), utilizando-se uma macro específica, e os dados foram representados como % da área dos corpúsculos lipídicos pelo número total de células no campo analisado. (A) As imagens são representativas e mostram células estimuladas com mock, infectadas com o DENV-2 ou infectadas e tratadas com C75. (B) A média dos seis campos, em triplicata, foi plotada no gráfico. Aproximadamente 400 células em média foram analisadas por lâmina. (C) A contagem dos corpúsculos lipídicos, de 50 células HepG2 consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock); + redução significativa em relação às células infectadas pelo DENV-2; p < 0,05.

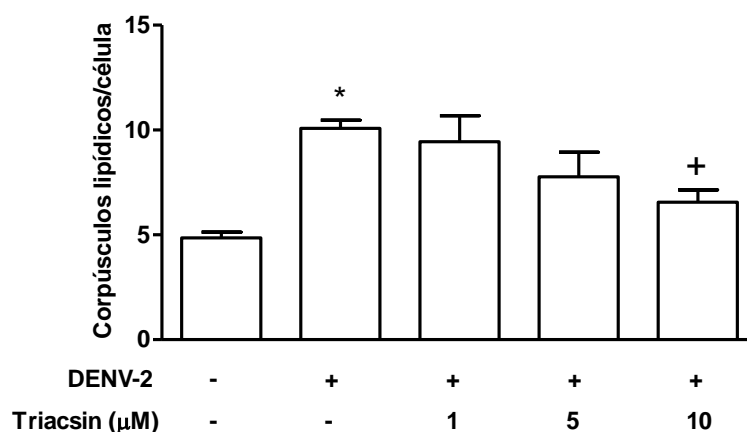


Figura 4.7 Análise quantitativa de corpúsculos lipídicos em células BHK-21 infectadas pelo DENV-2 *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de triacsin C. Células BHK-21 foram cultivadas em triplicata com mock ou infectadas com DENV-2. Após o período de adsorção viral (90 minutos), o inóculo foi removido, as células foram tratadas com diferentes concentrações de triacsin C e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 h. Passado este tempo, as células foram contrastadas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock); + redução significativa em relação às células infectadas pelo DENV-2; $p < 0,05$.

4.1.3 A inibição da biogênese de corpúsculos lipídicos tem impacto sobre a replicação viral

Recentemente demonstramos que a inibição da enzima ácido graxo sintase promove uma redução tanto na formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 *in vitro*, em células BHK-21 durante 48 h, quanto na produção de partículas virais infecciosas; sugerindo um papel dos corpúsculos lipídicos neste processo (Samsa et al. 2009). A fim de complementar este estudo, investigamos o papel de drogas capazes de interferir na biogênese dessas organelas sobre a replicação viral, utilizando, para isto, células HepG2 ou BHK-21 infectadas com DENV-2 e tratadas com diferentes concentrações de C75 ou triacsin C, respectivamente, por 24 h. O número de cópias virais foi quantificado através da técnica de PCR em tempo real. Nossos resultados sugerem que o tratamento das células HepG2, após o período de adsorção do DENV-2, com diferentes concentrações de C75 reduz o número de cópias do RNA viral em 24 h (figura 4.8 A). Em paralelo, ao tratarmos as células BHK-21, após o período de adsorção viral, com diferentes concentrações de triacsin C por 24 h, também observamos uma redução no número de cópias do RNA do DENV-2 (figura 4.8 B).

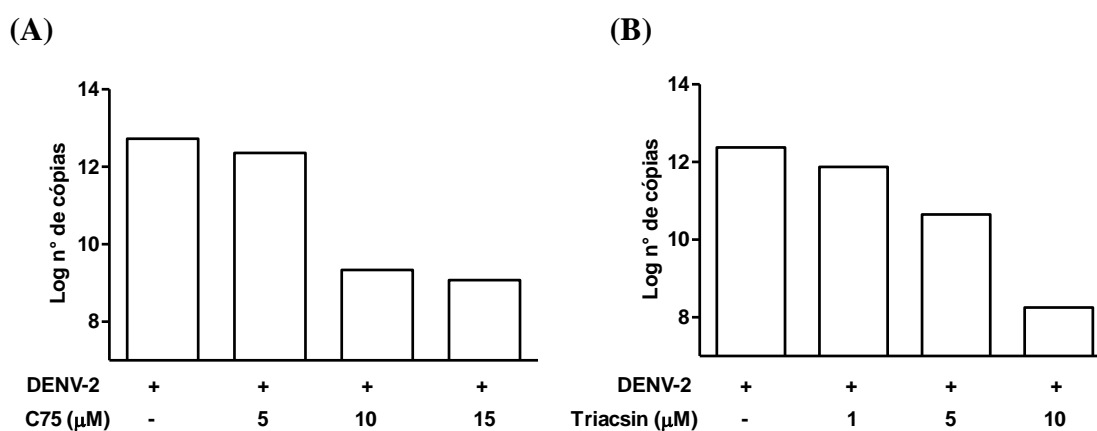


Figura 4.8 Efeito de inibidores do metabolismo lipídico sobre a replicação do DENV-2. Células HepG2 (A) ou BHK-21 (B) foram infectadas com DENV-2 e após o período de adsorção (90 minutos), tratadas com diferentes concentrações de C75 (A) ou triacsin C (B) por 24 h. O número de cópias virais foi quantificado através da técnica de PCR em tempo real; n=2.

4.1.4 O DENV-2 modula a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico

A fim de promover o aumento de constituintes lipídicos importantes no estabelecimento de uma infecção viral eficiente, o HCV promove a ativação da enzima ácido graxo sintase (Yang et al. 2008), do fator de transcrição SREBP (Waris et al. 2007) e dos receptores nucleares PPAR- γ (Kim et al. 2007) e LXR- α (García-Mediavilla et al. 2012). Adicionalmente, foi observado um aumento na expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico (LXR- α , PPAR- γ , SREBP-1c, SREBP-2 e FASN) no fígado de pacientes com hepatite crônica e esteatose, que é caracterizada pelo acúmulo hepatocelular de corpúsculos lipídicos (Lima-Cabello et al. 2011). Assim, já que os nossos resultados demonstraram que a inibição de enzimas envolvidas na lipogênese prejudicava a formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 *in vitro*, resolvemos investigar se durante a infecção das células HepG2 havia uma modulação da expressão gênica de moléculas envolvidas no metabolismo de lipídios. Para tal, quantificamos os níveis de expressão do mRNA dos receptores nucleares regulados por lipídios, PPAR- γ e PPAR- α , e dos genes ADRP, ABCA1, ACAT1 e FASN. Na figura 4.9 estão representados os resultados obtidos para a infecção com o DENV-2 por 24 h e podemos observar a modulação positiva dos genes PPAR- γ (A) e ADRP (B). Por outro lado, com os dados obtidos na figura 4.10, mostramos que os genes PPAR- α (A), ABCA1 (B), ACAT1 (C) e FASN (D) não são modulados durante a infecção das células HepG2 por 24 h.

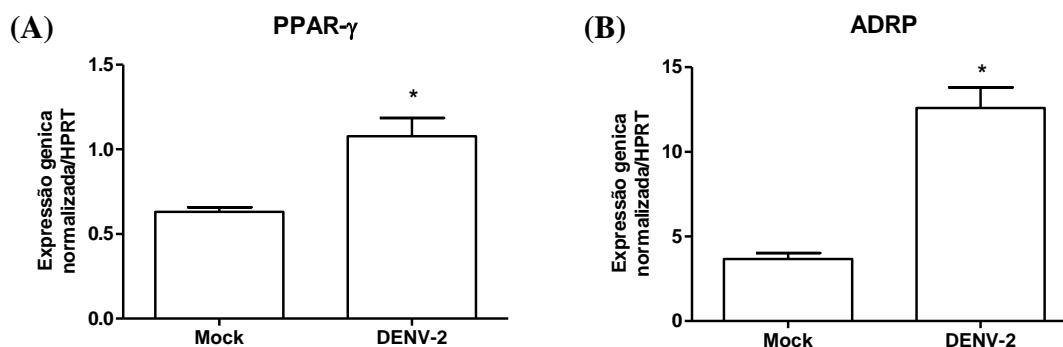


Figura 4.9 O DENV-2 é capaz de aumentar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico. Células HepG2 foram cultivadas com mock ou infectadas com o DENV-2, MOI 2, por 24 h. O mRNA de cada amostra foi purificado e quantificado. Em seguida, foi produzida a fita de cDNA e realizado o qRT-PCR. Foram testados os genes PPAR- γ (A) e ADRP (B). A análise dos dados foi feita por normalização pelo controle endógeno: a partir dos valores de Ct de cada gene calculamos a diferença para o final da reação (40 ciclos - Ct). Calculamos, então, o número de fitas amplificadas através do cálculo $2^{(40-Ct)}$. A razão entre o número de fitas amplificadas do gene teste pelo número de fitas amplificadas do gene constitutivo gera o nível de mRNA normalizado, que é expresso nos gráficos. O gene constitutivo utilizado como controle para a normalização foi o HPRT. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock); $p < 0,05$.

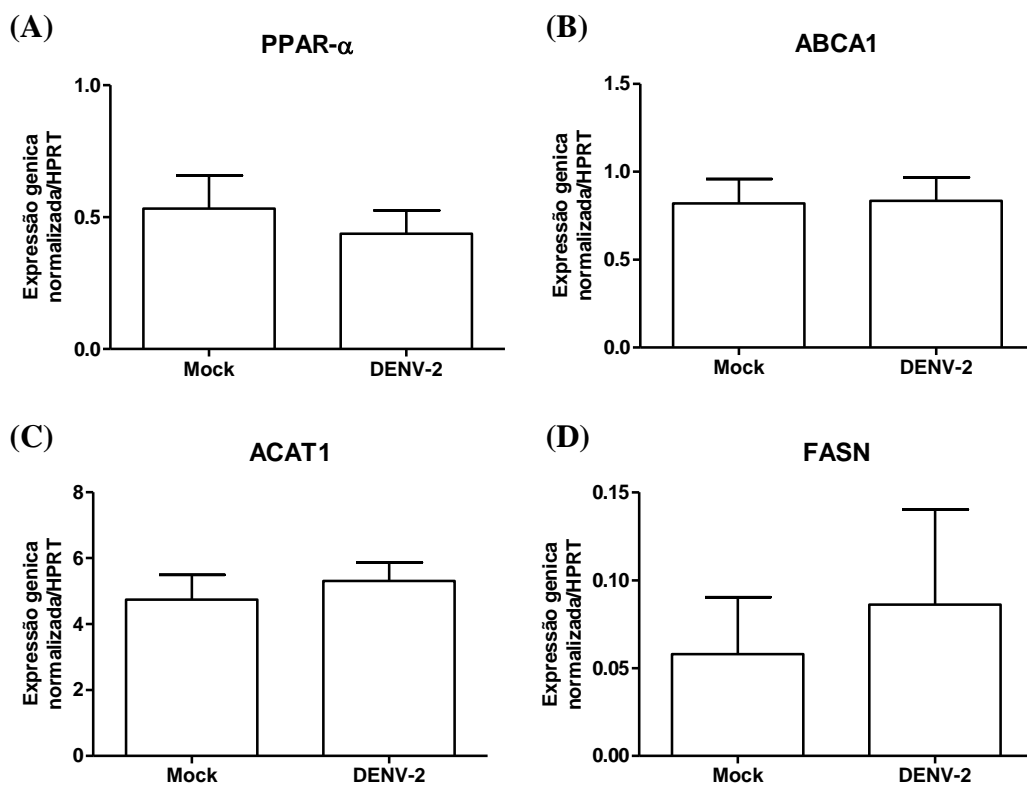


Figura 4.10 Análise da expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios durante a infecção pelo DENV-2. Células HepG2 foram cultivadas com mock ou infectadas com o DENV-2, MOI 2, por 24 h. O mRNA de cada amostra foi purificado e quantificado. Em seguida, foi produzida a fita de cDNA e realizado o qRT-PCR. Foram testados os genes PPAR- α (A), ABCA1 (B), ACAT1 (C) e FASN (D). A análise dos dados foi feita por normalização pelo controle endógeno: a partir dos valores de Ct de cada gene calculamos a diferença para o final da reação (40 ciclos - Ct). Calculamos, então, o número de fitas amplificadas através do cálculo $2^{(40-Ct)}$. A razão entre o número de fitas amplificadas do gene teste pelo número de fitas amplificadas do gene constitutivo gera o nível de mRNA normalizado, que é expresso nos gráficos. O gene constitutivo utilizado como controle para a normalização foi o HPRT. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos independentes.

4.1.5 O MIF induz a biogênese de corpúsculos lipídicos de forma similar ao DENV-2

Vários estudos demonstraram que citocinas e quimiocinas ativam vias de sinalização intracelular que culminam na biogênese de corpúsculos lipídicos (Bozza et al. 1998; Bandeira-Melo et al. 2001a, 2001b, 2002b). Dados do nosso grupo mostraram que o MIF é capaz de induzir a formação dessas organelas em eosinófilos, sendo este processo dependente do seu receptor CD74, da eotaxina e do receptor CCR3 (Vieira-de-Abreu et al. 2011). De forma importante, demonstramos um papel do MIF na patogenia da dengue e observamos que esta citocina encontrava-se em níveis elevados no plasma de pacientes com a forma grave da doença, bem como no sobrenadante de células infectadas *in vitro* (Assunção-Miranda et al. 2010). Dessa forma, resolvemos investigar o papel do MIF sobre a biogênese dos corpúsculos lipídicos em monócitos humanos. Nossos resultados sugerem que o MIF é capaz de induzir a formação destas organelas de uma maneira similar à indução promovida pelo DENV-2 após 24 h (figura 4.11).

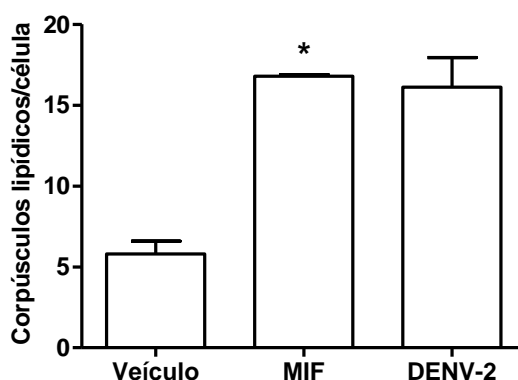


Figura 4.11 MIF induz a biogênese de corpúsculos lipídicos de forma similar ao DENV-2. Monócitos humanos foram obtidos através de gradiente de densidade em Ficoll-Paque. Estas células foram cultivadas em triplicata com veículo (PBS+BSA), rhMIF 2 ng/mL ou infectadas com o DENV-2 (MOI 5), e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 h. Passado este tempo, as células foram contrastadas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos, de 50 células consecutivas, foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados expressam a média ± EPM. * aumento significativo em relação às células incubadas com veículo.

4.1.6 O MIF, secretado durante a infecção, não é capaz de regular a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico

Os resultados obtidos até o momento nos levaram a investigar se o MIF poderia estar envolvido na regulação de genes ligados ao metabolismo de lipídios durante a infecção pelo DENV-2. Para isso, células HepG2 foram infectadas e tratadas com diferentes concentrações do inibidor do MIF ISO-1 (figura 4.12 A-B) ou de anticorpos neutralizantes do MIF humano (figura 4.12 C), durante 24 h. Nossos resultados demonstram que o MIF, produzido durante a

infecção pelo DENV-2 *in vitro*, não é capaz de modular a expressão dos genes PPAR γ (figura 4.12 B) e ADRP (figura 4.12 A,C) nas células HepG2 após 24 h.

Visando confirmar esses dados, células HepG2 foram estimuladas com diferentes concentrações do MIF recombinante humano (rhMIF) seguidas, ou não, de tratamento com diferentes concentrações do seu inibidor por 24h. De fato, nossos estudos mostram que o MIF exógeno também não modula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios nas condições analisadas (figura 4.13).

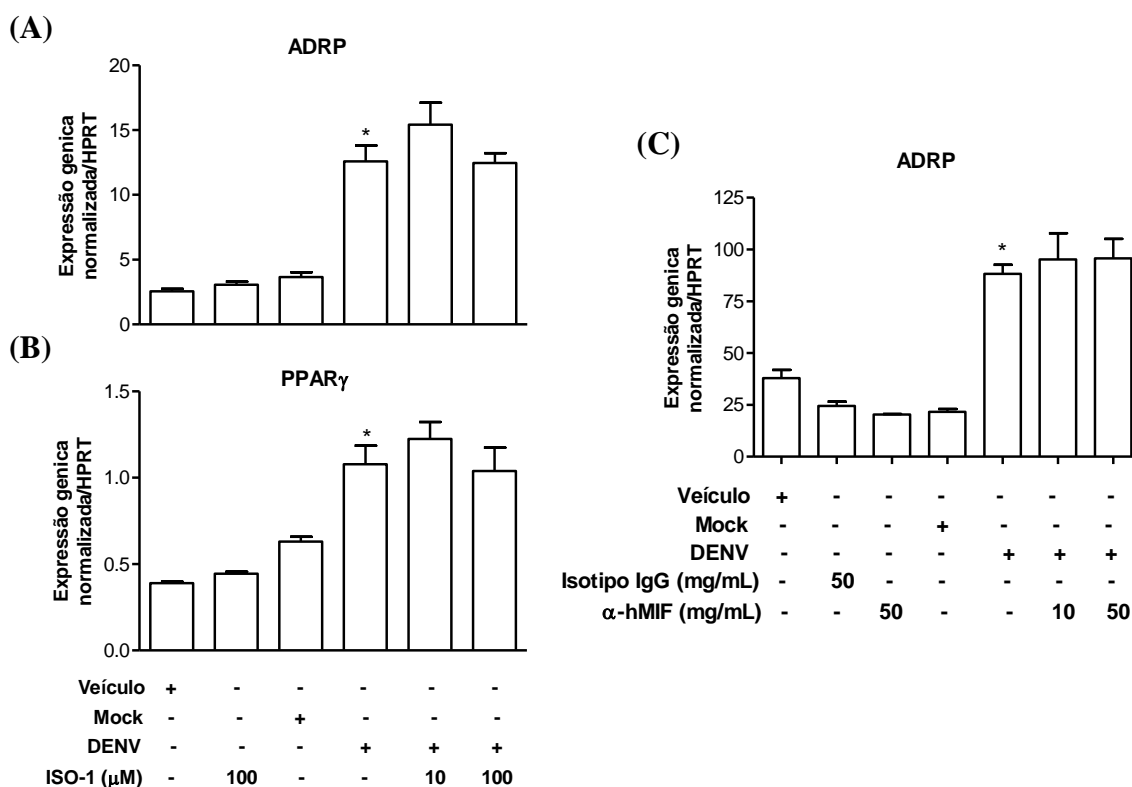


Figura 4.12 Papel do MIF secretado durante a infecção pelo DENV-2 sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico. Células HepG2 foram cultivadas em triplicata com controles negativos, mock ou infectadas com o DENV-2, MOI = 2. Após o período de adsorção viral (90 minutos), o inóculo foi removido, as células foram tratadas com diferentes concentrações de ISO-1 (A-B) ou anticorpos neutralizantes do MIF humano (C) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 h. O mRNA de cada amostra foi purificado e quantificado. Em seguida, foi produzida a fita de cDNA e realizado o qRT-PCR. Foram testados os genes ADRP (A,C) e PPAR γ (B). A análise dos dados foi feita por normalização pelo controle endógeno: a partir dos valores de Ct de cada gene calculamos a diferença para o final da reação (40 ciclos - Ct). Calculamos, então, o número de fitas amplificadas através do cálculo $2^{(40-Ct)}$. A razão entre o número de fitas amplificadas do gene teste pelo número de fitas amplificadas do gene constitutivo gera o nível de mRNA normalizado, que é expresso nos gráficos. O gene constitutivo utilizado como controle para a normalização foi o HPRT. Os resultados mostrados em A e B são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm EPM. Os resultados mostrados em C são provenientes de 1 experimento em triplicata e expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock); $p < 0,05$

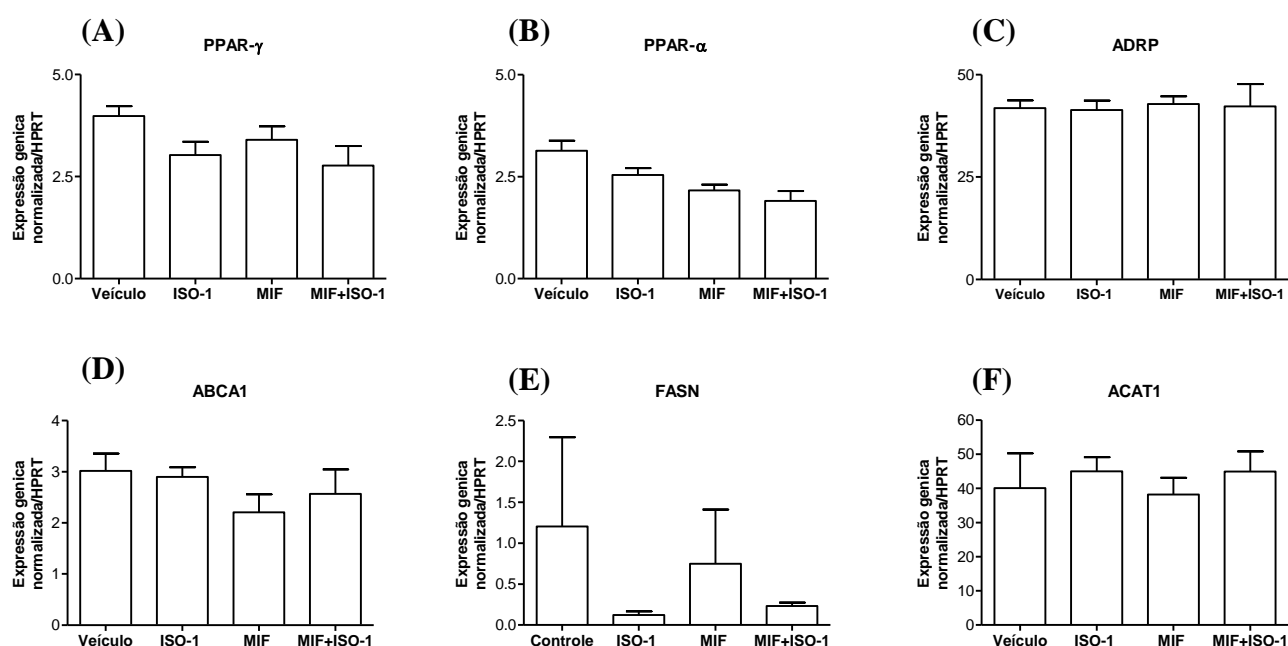


Figura 4.13 Papel do MIF exógeno sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico. Células HepG2 foram cultivadas em triplicata com veículo, rhMIF 20 ng/mL, ISO-1 100 μ M ou rhMIF 20 ng/mL + ISO-1 100 μ M e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24h. O mRNA de cada amostra foi purificado e quantificado. Em seguida, foi produzida a fita de cDNA e realizado o qRT-PCR. Foram testados os genes PPAR- γ (A) e PPAR- α (B), ADRP (C), ABCA1 (D), FASN (E) e ACAT1 (F). A análise dos dados foi feita por normalização pelo controle endógeno: a partir dos valores de Ct de cada gene calculamos a diferença para o final da reação (40 ciclos - Ct). Calculamos, então, o número de fitas amplificadas através do cálculo $2^{(40-Ct)}$. A razão entre o número de fitas amplificadas do gene teste pelo número de fitas amplificadas do gene constitutivo gera o nível de mRNA normalizado, que é expresso nos gráficos. O gene constitutivo utilizado como controle para a normalização foi o HPRT. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e expressam a média \pm EPM.

4.2 Parte II: Plaquetas ativadas com o DENV-2 modulam o metabolismo lipídico e a ativação de monócitos através da interação direta entre estas células e da sinalização mediada por citocinas inflamatórias

4.2.1 Plaquetas ativadas com o DENV-2 in vitro formam agregados com monócitos

Dados na literatura mostram que plaquetas ativadas são capazes de interagir com leucócitos, a fim de facilitar, por exemplo, o acúmulo destas células em vasos inflamados e em tecidos infectados ou danificados (Rondina et al. 2013). Recentemente, estudos do nosso grupo revelaram elevados níveis de agregados plaqueta-monócito em amostras sanguíneas de pacientes com dengue, especialmente em pacientes trombocitopênicos e com aumento na permeabilidade vascular (Hottz et al. 2014). Durante essas interações, a ligação da P-selectina, na superfície das plaquetas, ao PSGL-1, na membrana plasmática dos monócitos, não apenas mantém as células aderidas, mas também sinaliza para vias de expressão genica induzindo respostas funcionais nos leucócitos. Sendo assim, nesta segunda parte do estudo, resolvemos investigar se plaquetas ativadas com o DENV-2 *in vitro* são capazes de modular a ativação dos monócitos, incluindo a biogênese de corpúsculos lipídicos e a secreção de mediadores inflamatórios.

Inicialmente, investigamos a formação de agregados entre plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina *in vitro* e monócitos por diferentes tempos. Para isso, avaliamos a presença do marcador de plaquetas CD41 na população de monócitos (CD14⁺) por citometria de fluxo. Como mostrado na figura 4.14, plaquetas ativadas com DENV-2 ou trombina formam mais agregados com monócitos quando comparado com plaquetas incubadas com mock ou não estimuladas, respectivamente. Além disso, esse fenômeno mostrou ser relevante durante 30 min e 1 h de interação, não havendo diferença na formação do agregado plaqueta-monócito, entre os grupos analisados, nos demais tempos avaliados (2 e 18 h).

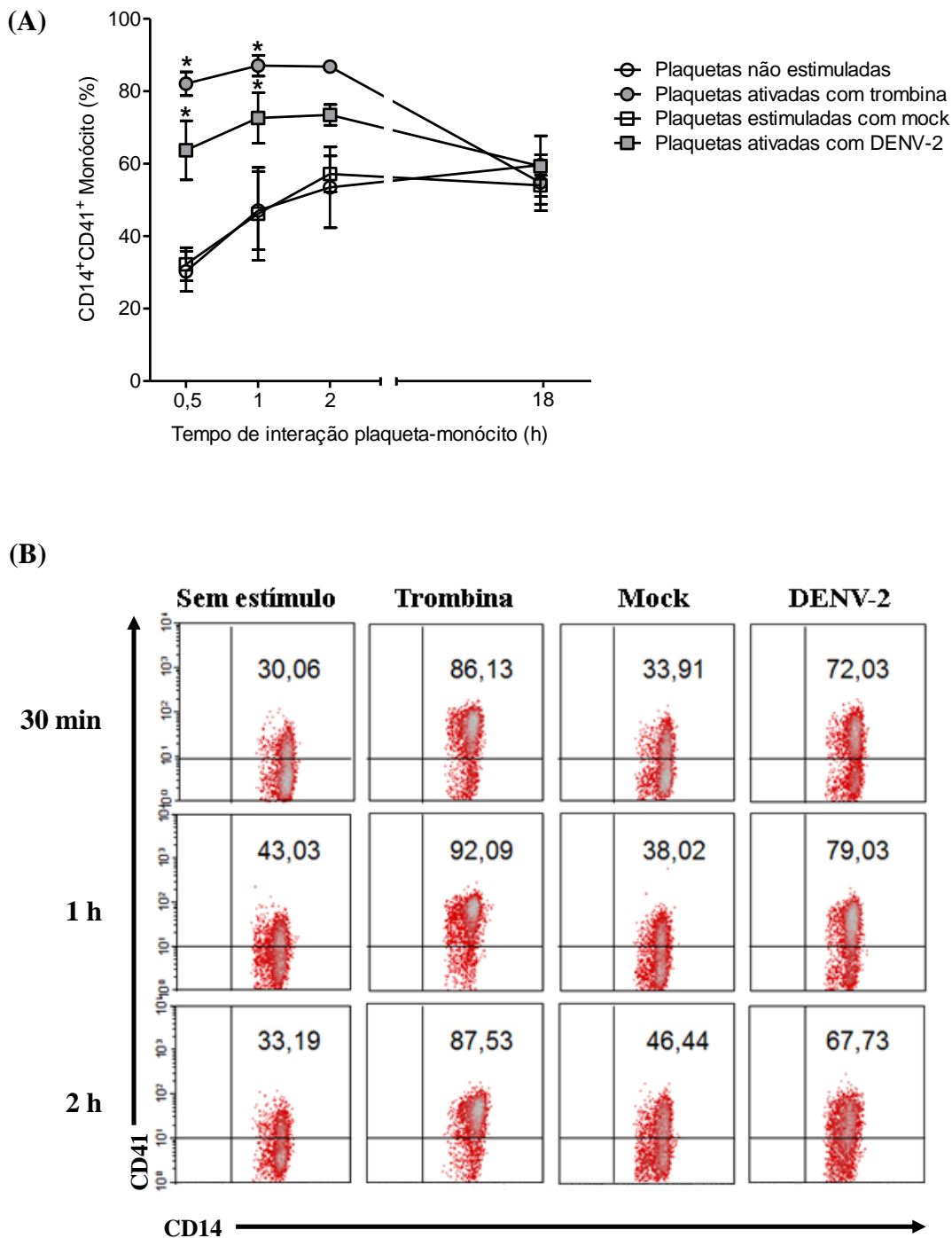


Figura 4.14 Formação de agregados plaqueta-monócito durante a infecção pelo DENV-2 *in vitro*. Monócitos foram expostos a plaquetas não estimuladas, estimuladas com mock, ativadas com trombina ou DENV-2 durante 30 min, 1, 2 ou 18 h. (A) A formação do agregado plaqueta-monócito, em cada condição, foi avaliada através da presença do marcador de plaquetas CD41 na população de monócitos (CD14⁺) por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. * aumento significativo em relação às células não ativadas (não estimuladas ou estimuladas com mock); $p < 0,05$ (B) *Density plots* representativos mostram a expressão de CD41 em monócitos (CD14⁺) expostos a plaquetas não estimuladas, ativadas com trombina, estimuladas com mock ou ativadas com DENV-2 por 30 min, 1, 2 ou 18 h.

4.2.2 Plaquetas ativadas com o DENV-2 *in vitro* induzem a secreção de CXCL8/IL-8 por monócitos

A adesão de plaquetas ativadas a monócitos sinaliza para a síntese de diversas citocinas, na maioria das vezes pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL8/IL-8 e MCP-1 (Weyrich et al. 1996, 2005). Recentemente, Hottz e colaboradores (2014) demonstraram níveis elevados de IL-1 β , CXCL8/IL-8 e IL-10 no sobrenadante de monócitos expostos a plaquetas isoladas de pacientes com dengue, quando comparado a monócitos expostos a plaquetas de voluntários saudáveis. Dessa forma, nós investigamos se no nosso modelo de interação celular, as plaquetas ativadas ao agregar com os monócitos seriam capazes de modular a resposta destes, culminando na secreção de mediadores inflamatórios. Na figura 4.15, podemos observar que plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina por 2 h *in vitro* sinalizam para que monócitos secretem CXCL8/IL-8 após 18 h de interação.

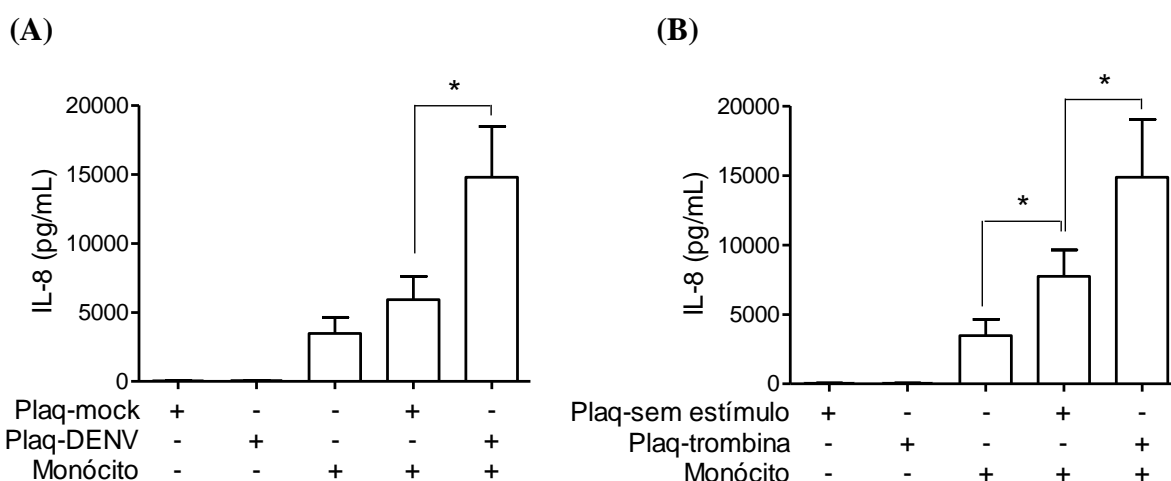


Figura 4.15 Plaquetas ativadas com dengue ou trombina modulam a secreção de CXCL8/IL-8 por monócitos. Monócitos foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A), ativadas com o DENV-2 (A), não estimuladas (B) ou ativadas com trombina (B) durante 18 h. A concentração de CXCL8/IL-8 no sobrenadante de células incubadas em cada condição é mostrada. Os resultados expressam a média \pm EPM de 7 experimentos independentes. * aumento significativo em relação aos monócitos expostos a plaquetas não ativadas (A-B) ou em relação aos monócitos (B); $p < 0,05$.

4.2.3 *Monócitos aumentam a ativação de plaquetas de forma recíproca*

Plaquetas ativadas mediante estímulo secretam diversos mediadores inflamatórios, estocados em α -grânulos, incluindo CCL5/RANTES, CXCL4/PF4 e MIF. Vale ressaltar que estas citocinas estão frequentemente aumentadas no plasma de pacientes com dengue e, em alguns estudos, correlacionam com as contagens de plaquetas (Chen et al. 2006; Kumar et al. 2012; Malavige et al. 2012; Rathakrishnan et al. 2012). Assim, é possível que a secreção dessas moléculas por plaquetas ativadas durante a infecção pelo DENV possa atuar como um mecanismo patogênico importante. Uma vez que nossos resultados mostraram que plaquetas ativadas sinalizam para a secreção de citocinas por monócitos, nos perguntamos se os monócitos são capazes de aumentar a ativação de plaquetas de forma recíproca. Para isso, quantificamos a concentração das citocinas, secretadas por plaquetas ativadas, CCL5/RANTES (figura 4.16 A-B) e CXCL4/PF4 (figura 4.16 C-D) no sobrenadante de plaquetas ativadas ou não ativadas; de monócitos e de monócitos expostos a plaquetas ativadas ou não ativadas após 18 h. Nossos dados demonstram que a presença dos monócitos potenciam a secreção de mediadores inflamatórios por plaquetas ativadas com trombina (figura 4.16 B, D) e, em paralelo, observamos uma tendência no caso de plaquetas ativadas com o DENV-2 (figura 4.16 A,C).

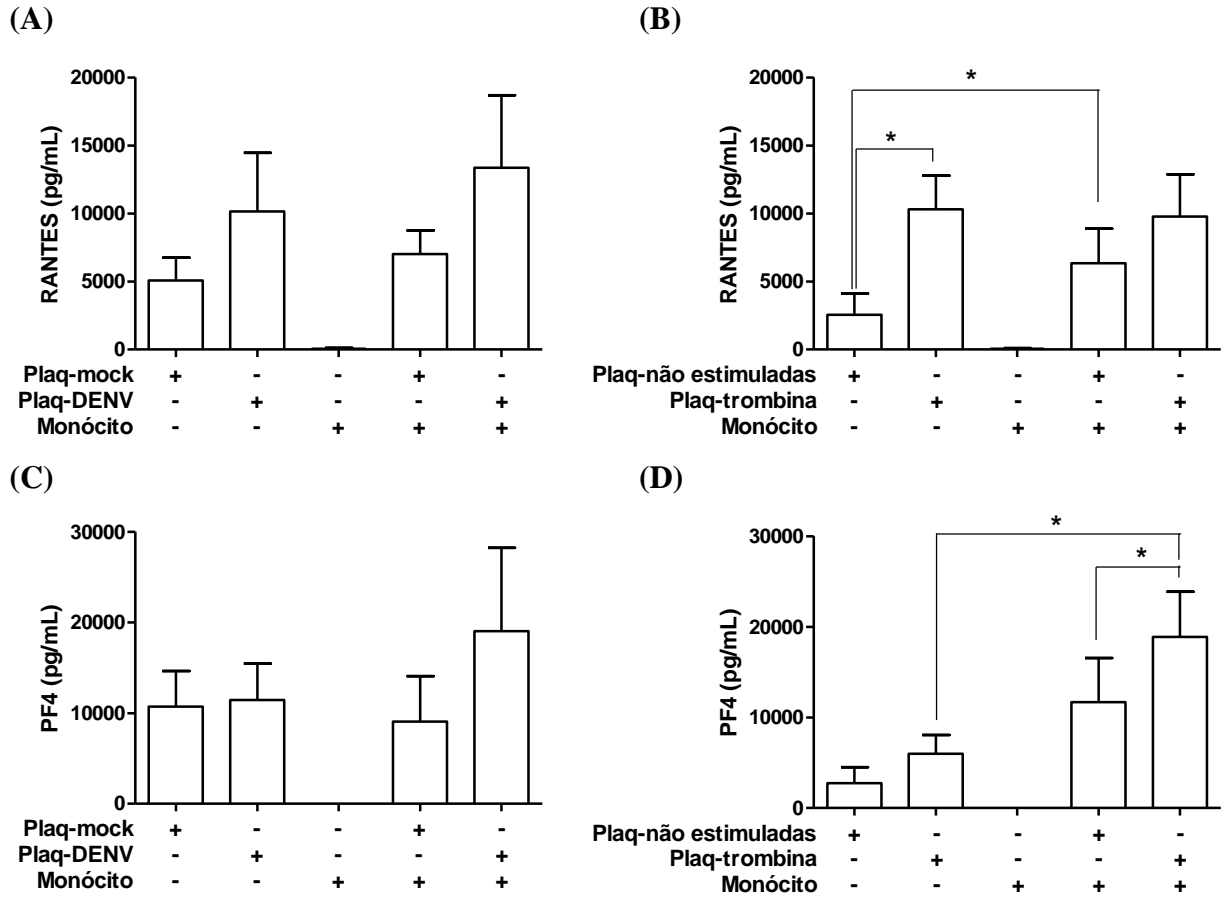


Figura 4.16 Monócitos estimulam uma maior secreção de citocinas por plaquetas *in vitro*. Monócitos foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A,C), ativadas com o DENV-2 (A,C), não estimuladas (B,D) ou ativadas com trombina (B,D) durante 18 h. A concentração de CCL5/RANTES (A-B) e CXCL4/PF4 (C-D) no sobrenadante de células incubadas em cada condição é mostrada. Os resultados expressam a média \pm EPM de 4 experimentos independentes. * aumento significativo em relação às células não ativadas ou na presença de monócitos; $p < 0,05$.

4.2.4 Plaquetas ativadas com o DENV-2 induzem a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos

A adesão de plaquetas ativadas por diferentes estímulos a monócitos sinaliza não apenas para a síntese de mediadores pró-inflamatórios, mas também para a formação de corpúsculos lipídicos (Weyrich et al. 1996, 2005; Dixon et al. 2006; Badrnya et al. 2013; Feng et al. 2014). Estudos recentes demonstraram que plaquetas ativadas por LDL-oxidada (OxLDL) (Badrnya et al. 2013) ou micobactéria (Feng et al. 2014) formam agregados com monócitos e sinalizam para mudanças fenotípicas nos mesmos, incluindo a diferenciação em células espumosas, que é caracterizada pelo aumento no número de corpúsculos lipídicos.

Uma vez que os mecanismos envolvidos na interação plaqueta-monócito durante a dengue ainda precisam ser melhor esclarecidos, resolvemos investigar se plaquetas ativadas com o DENV-2 *in vitro* são capazes de sinalizar para que monócitos formem corpúsculos lipídicos. Sendo assim, a biogênese destas organelas citoplasmáticas foram analisadas através de diferentes técnicas e podemos observar na figura 4.17 um aumento na formação de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito, quando plaquetas ativadas com DENV-2 (figura 4.17 A) ou trombina (figura 4.17 B), mas não incubadas com mock ou meio de cultura, interagem com monócitos. Os dados obtidos por citometria de fluxo foram confirmados através de microscopia confocal e análise das imagens. Na figura 4.18 demonstramos o aumento em número e tamanho dos corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 ou trombina quando comparados com plaquetas não ativadas.

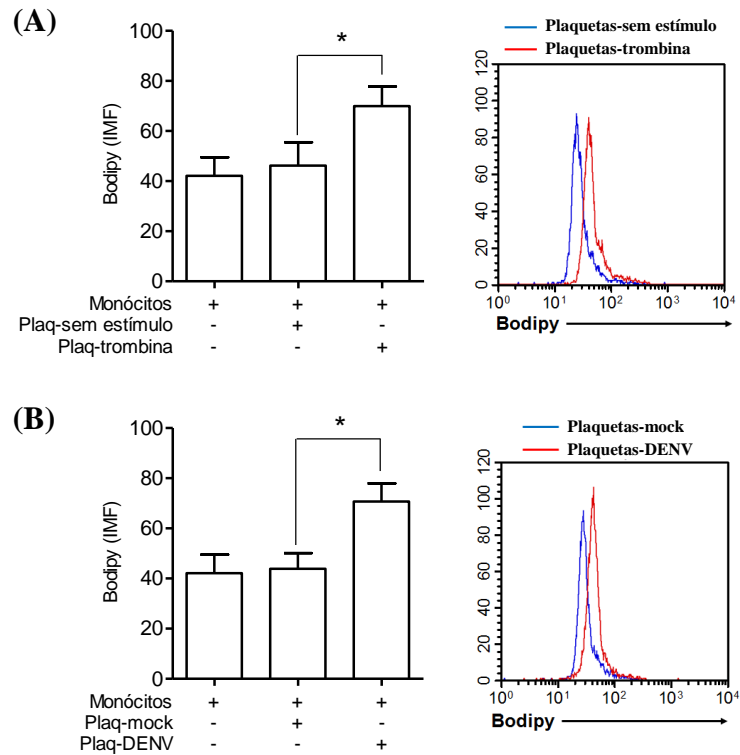
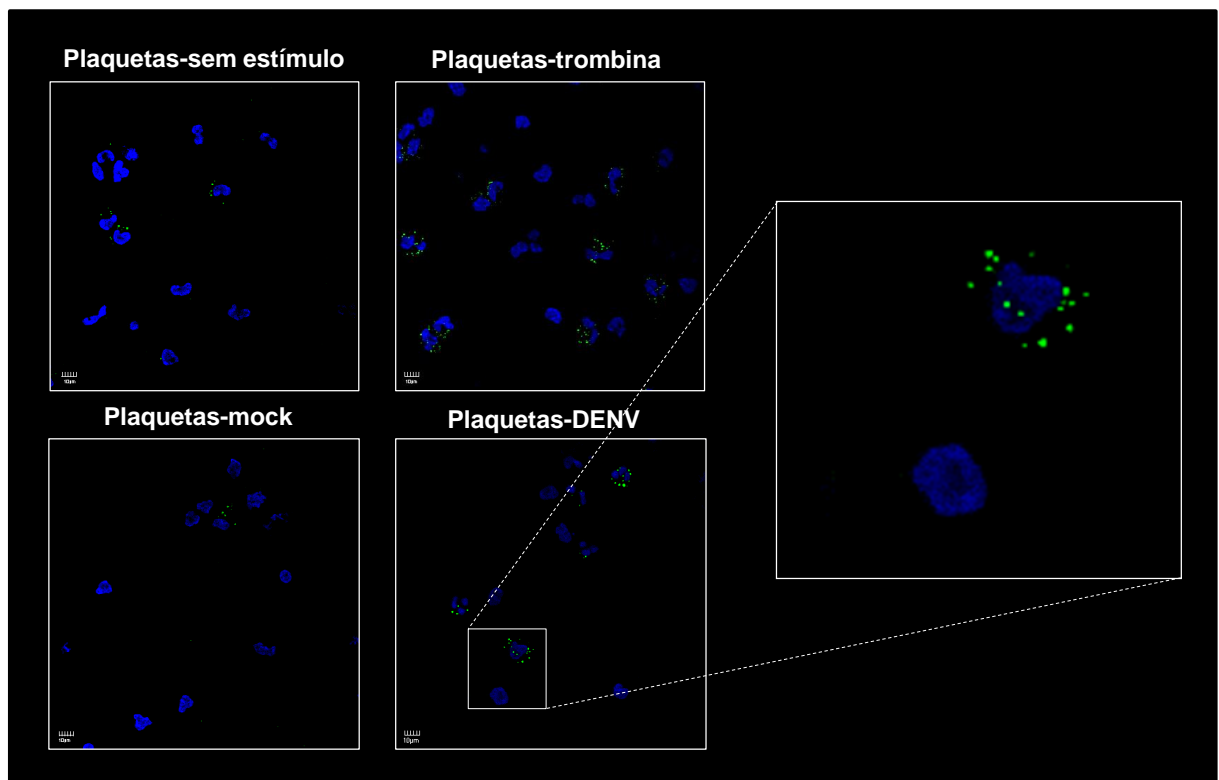


Figura 4.17 Análise da formação de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito *in vitro*. Monócitos foram expostos a plaquetas não estimuladas (A), estimuladas com mock (B), ativadas com trombina (A) ou DENV-2 (B) durante 18 h. Em seguida, as células foram marcadas com BODIPY™ e fixadas em paraformaldeído 4%. A análise do percentual da intensidade média de fluorescência (IMF) para BODIPY™, em cada condição, foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Histogramas representativos mostram o aumento na formação de corpúsculos lipídicos durante a interação de plaquetas ativadas com monócitos, quando comparado à interação entre monócitos e plaquetas não ativadas. As barras representam a média \pm EPM de 5 experimentos independentes. * aumento significativo em relação aos monócitos expostos a plaquetas não ativadas; $p < 0,05$.

(A)



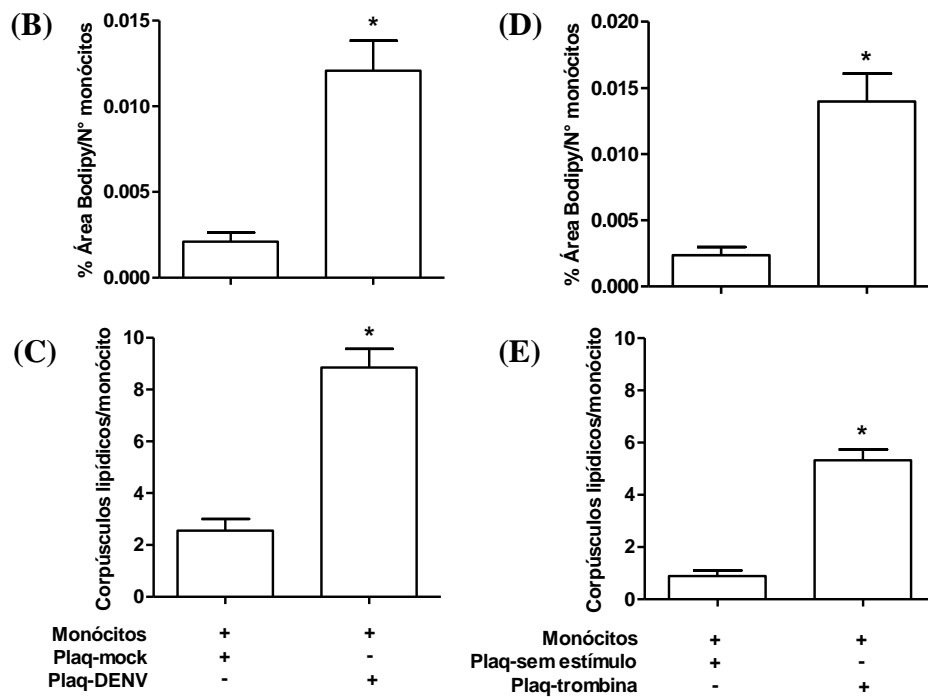


Figura 4.18 Análise da formação de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas *in vitro*. Monócitos foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A-C), ativadas com DENV-2 (A-C), não estimuladas (A, D-E) ou ativadas com trombina (A, D-E) durante 18 h. Em seguida, as células foram fixadas e, em cada condição, marcadas com BODIPY™. Os corpúsculos lipídicos, de dez campos por lâmina, foram analisados por microscopia confocal. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji), utilizando-se uma macro específica, e os dados foram representados como % da área dos corpúsculos lipídicos pelo número total de monócitos no campo analisado. (A) As imagens são representativas e a sequência do painel superior mostra: monócitos expostos a plaquetas sem estímulo e monócitos expostos a plaquetas ativadas com trombina; painel inferior: monócitos expostos a plaquetas estimuladas com mock e monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2. (B,D) A média dos dez campos foi plotada no gráfico. (C,E) A contagem dos corpúsculos lipídicos, de aproximadamente 250 células em média, foi realizada por análise das imagens. Os resultados expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação a monócitos expostos a plaquetas não ativadas.

4.2.5 Plaquetas ativadas pelo DENV-2 *in vitro* induzem a expressão de COX-2 em monócitos

Dixon e colaboradores (2006) demonstraram que a interação de plaquetas ativadas, por trombina, com monócitos sinalizam tanto para o aumento da expressão de COX-2 quanto para a secreção de PGE₂. Durante a infecção pelo DENV-3 *in vitro*, observamos um aumento na produção deste mediador lipídico quando comparado com mock. De forma interessante, este fenômeno mostrou-se dependente do MIF, visto que o bloqueio desta citocina, por inibidor específico ou anticorpos neutralizantes, inibiu a secreção de PGE₂ por macrófagos infectados *in vitro* (Assunção-Miranda et al. 2010).

Nos últimos anos, foi proposto que a elevação na produção de mediadores lipídicos em leucócitos poderia estar associado ao aumento na formação de corpúsculos lipídicos por estas células (Bozza et al. 2011). Visto que constatamos um aumento na biogênese dessas inclusões dinâmicas em monócitos expostos a plaquetas ativadas, nosso próximo passo, então, foi investigar a expressão de COX-2 e síntese de PGE₂ no nosso modelo de formação de agregado celular *in vitro*. Na figura 4.19 podemos observar que plaquetas ativadas pelo DENV-2 ou trombina sinalizam para o aumento da expressão de COX-2 (figura 4.18 A), bem como uma tendência no aumento da produção de PGE₂ (figura 4.18 B-C) em monócitos, quando comparado aos monócitos expostos a plaquetas não ativadas. Além disso, demonstramos que plaquetas ativadas por trombina sinalizam para uma maior secreção de PGE₂ por monócitos quando comparada com monócitos não expostos a plaquetas (figura 4.18 C).

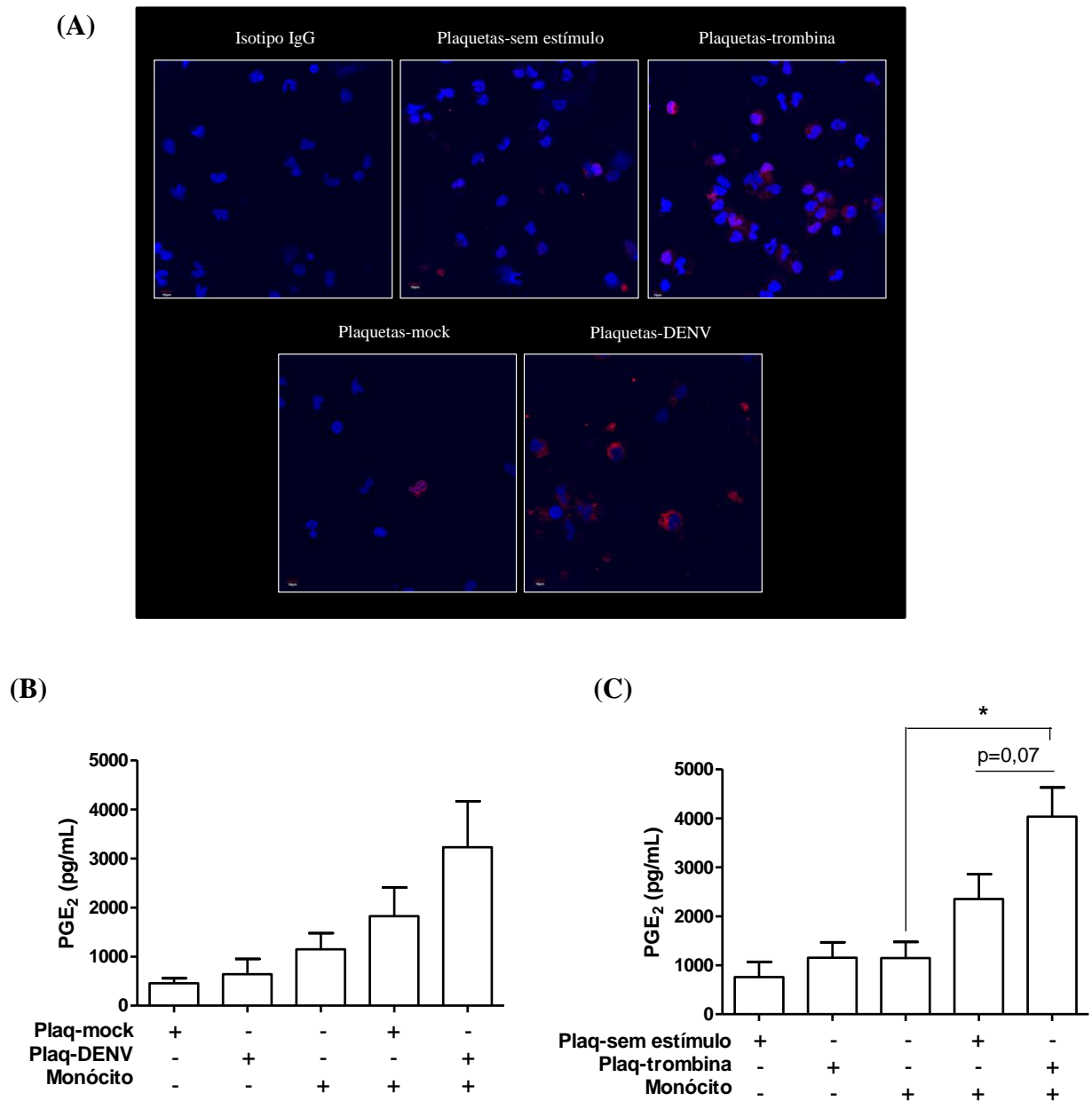


Figura 4.19 Análise da imunomarcção de COX-2 e síntese de PGE₂ por monócitos expostos a plaquetas ativadas *in vitro*. Monócitos foram expostos a plaquetas não estimuladas (A,C), estimuladas com mock (A-B), ativadas com trombina (A,C) ou DENV-2 (A-B) durante 18 h. (A) As células, em cada condição, foram incubadas com o anticorpo anti-COX-2 ou IgG de cabra. Em seguida, as preparações foram incubadas com IgG anti-cabra conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor® 546 e as lâminas foram montadas com meio de montagem específico contendo DAPI. As imagens foram obtidas através do microscópio confocal. A sequência do painel superior mostra: monócitos expostos a plaquetas sem estímulo e incubados com isotipo IgG, monócitos expostos a plaquetas não estimuladas e incubados com anti-COX-2 e monócitos expostos a plaquetas ativadas com trombina e incubados com anti-COX-2; painel inferior: monócitos expostos a plaquetas estimuladas com mock e incubados com anti-COX-2, monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 e incubados com anti-COX-2. n=1 (B-C) A concentração de PGE₂, quantificada por ensaio imunoenzimático, no sobrenadante das células em cada condição é mostrada. Os resultados expressam a média ± EPM de 5 experimentos independentes. * aumento significativo em relação a monócitos na ausência de plaquetas.

4.2.6 A redução da formação de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito tem impacto sobre a secreção de PGE₂, mas não de CXCL8/IL-8

Nossos resultados demonstram que o inibidor da enzima ácido graxo sintase, C75, é capaz de reduzir a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 em distintos tipos celulares. Dados na literatura apontam os corpúsculos lipídicos como sítios intracelulares de produção de LTB₄, LTC₄ e PGE₂ em leucócitos ativados (Bandeira-Melo et al. 2001b; Vieira-De-Abreu et al. 2005; D'Avila et al. 2006; Pacheco et al. 2007; Accioly et al. 2008; Silva et al. 2009). Tendo em vista que plaquetas ativadas, com DENV-2 ou trombina, sinalizam tanto para a formação destas organelas quanto para a secreção de mediadores inflamatórios por monócitos, o nosso próximo passo foi avaliar a ação do C75 neste processo.

Na figura 4.20, podemos observar que o pré-tratamento de monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 (figura 4.20 A) ou trombina (figura 4.20 B), durante 18 h, promove uma redução na biogênese de corpúsculos lipídicos quando comparada com monócitos pré-incubados com veículo e expostos a plaquetas ativadas. De forma interessante, constatamos que monócitos pré-incubados com veículo e expostos a plaquetas ativadas com o DENV-2 secretam níveis elevados de PGE₂, quando comparados com monócitos pré-incubados com veículo e expostos a plaquetas não ativadas (figura 4.21 A). Além disso, o C75, na concentração de 4 µM, reduz significativamente a secreção de PGE₂ por monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 (figura 4.21 A), quando comparado com monócitos incubados com veículo e expostos a plaquetas ativadas com o DENV-2; porém, não modula a secreção de IL-8 por estas células (figura 4.21 C). Com os dados obtidos por monócitos pré-tratados com C75 e expostos a plaquetas ativadas com trombina, podemos observar uma tendência na modulação da síntese de PGE₂ (figura 4.21 B), mas não de IL-8 (figura 4.21 D).

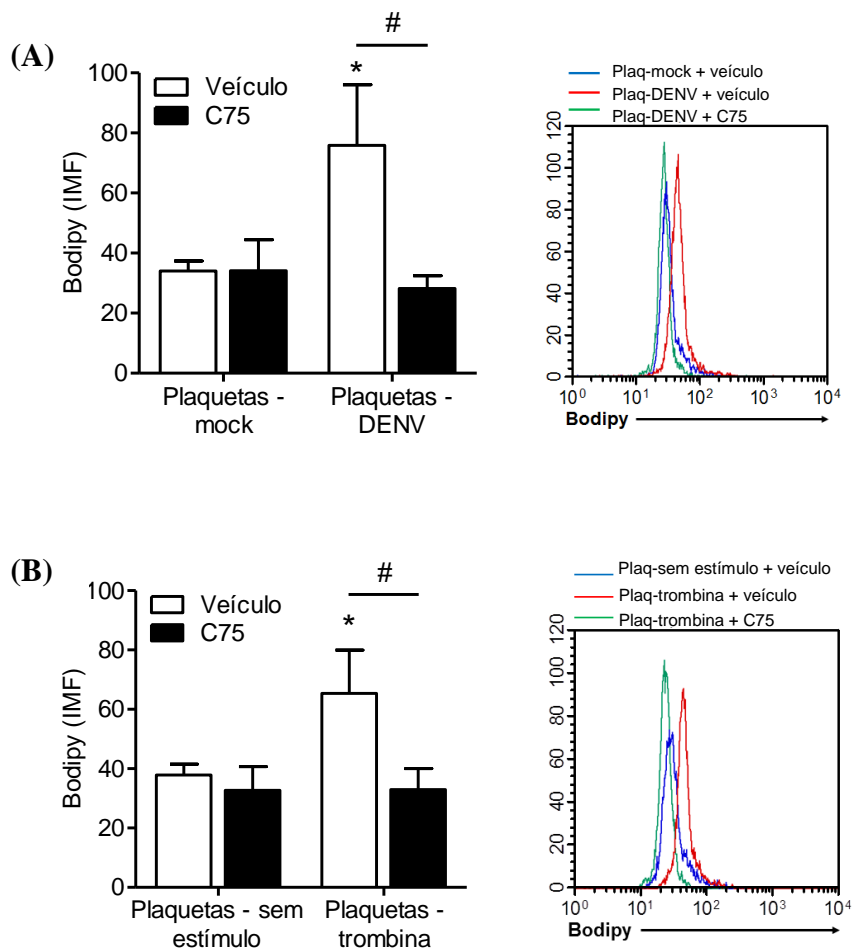


Figura 4.20 Efeito do C75 sobre a formação de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito *in vitro*. Monócitos tratados com veículo ou C75 4 μ M por 30 min foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A), ativadas com DENV-2 (A), não estimuladas (B) ou ativadas com trombina (B) durante 18 h. Em seguida, as células foram marcadas com BODIPYTM e fixadas em paraformaldeído 4%. A análise do percentual da intensidade média de fluorescência (IMF) para BODIPYTM, em cada condição, foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Histogramas representativos mostram o aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos durante a interação de plaquetas ativadas com monócitos pré-tratados com veículo, quando comparado com plaquetas não ativadas expostas a monócitos pré-tratados com veículo; bem como a redução da marcação para BODIPYTM em monócitos pré-tratados com C75 e expostos a plaquetas ativadas, quando comparada com monócitos pré-tratados com veículo e expostos a plaquetas ativadas. As barras representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * aumento significativo em relação às plaquetas não ativadas expostas aos monócitos; # redução significativa em relação a monócitos pré-tratados com veículo e expostos a plaquetas ativadas; $p < 0,05$.

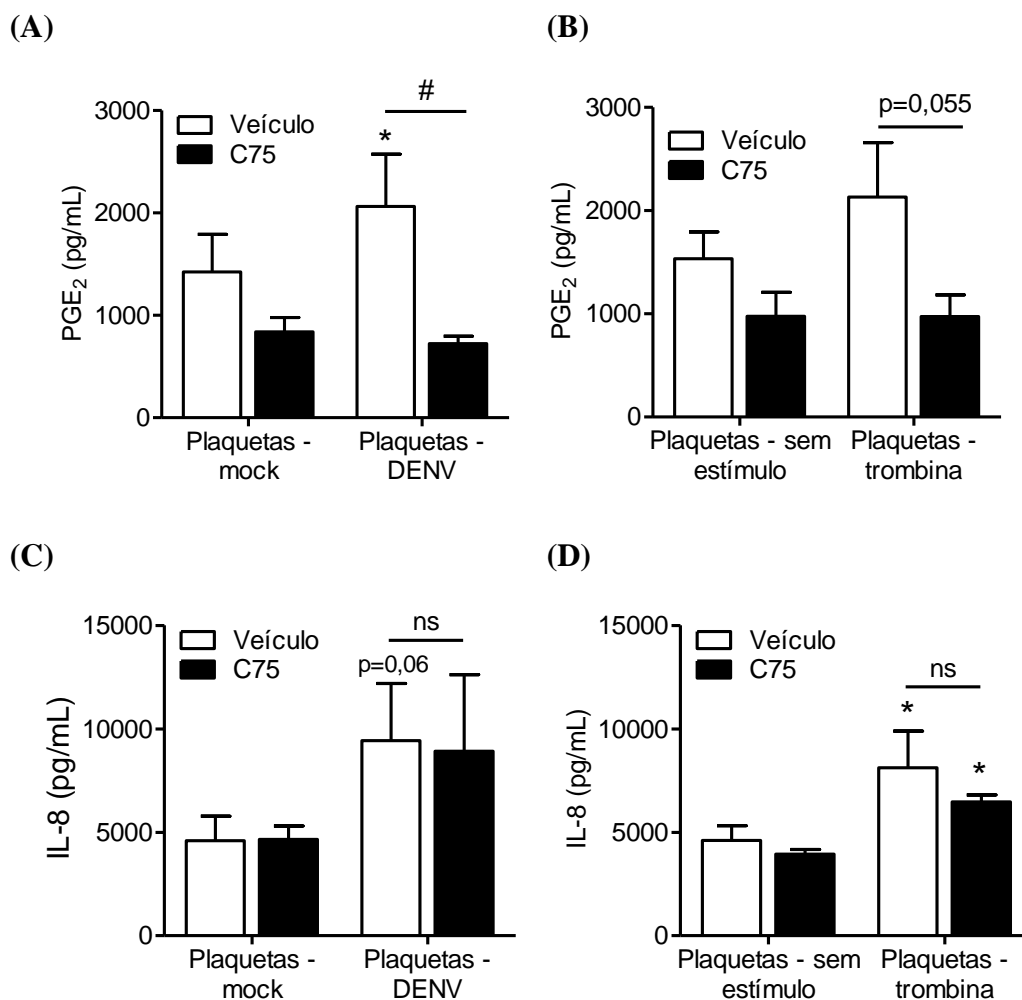


Figura 4.21 Efeito do C75 sobre a secreção de mediadores inflamatórios por monócitos expostos a plaquetas ativadas *in vitro*. Monócitos tratados com C75 4 μ M ou incubados com veículo por 30 min foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A,C), ativadas com DENV-2 (A,C), não estimuladas (B,D) ou ativadas com trombina (B,D) durante 18 h. A concentração de PGE₂ (A-B) e CXCL8/IL-8 (C-D) no sobrenadante de células incubadas em cada condição é mostrada. Os resultados expressam a média \pm EPM de 5 (A-B) ou 3 (C-D) experimentos independentes. * aumento significativo em relação aos monócitos pré-incubados com veículo (A,D) ou C75 (D) e expostos a plaquetas não ativadas; $p < 0,05$.

4.2.7 A interação com plaquetas ativadas pelo DENV-2 é necessária para sinalizar tanto a biogênese de corpúsculos lipídicos, quanto a secreção de mediadores inflamatórios por monócitos

Em busca dos mecanismos envolvidos na sinalização que culmina na biogênese de corpúsculos lipídicos e/ou secreção de mediadores inflamatórios por monócitos expostos a plaquetas ativadas, com DENV-2 ou trombina, investigamos se a presença das plaquetas é, de fato, importante durante este processo. Para isso, os monócitos foram expostos às mesmas condições experimentais, entretanto na ausência de plaquetas. Na figura 4.22, podemos constatar que na ausência destas células ativadas os monócitos não produzem corpúsculos lipídicos (figura 4.22 A) e também não secretam CXCL8/IL-8 (figura 4.22 B).

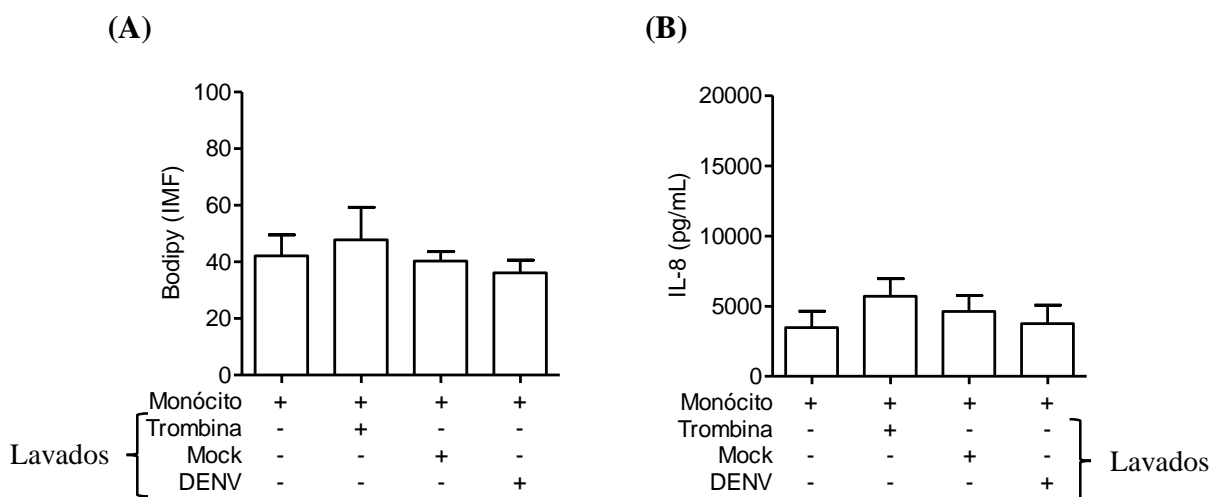


Figura 4.22 A interação com plaquetas ativadas é importante para a formação de corpúsculos lipídicos e secreção de CXCL8/IL-8 por monócitos. Nos tubos (sem as plaquetas) foram adicionados os estímulos (meio de cultura, mock, trombina ou DENV-2) e deixados por 2h. Passado este tempo, os tubos foram lavados por três vezes e os monócitos adicionados. Após 18 h foram feitas as análises. (A) Os monócitos foram marcados com BODIPY™ e fixados em paraformaldeído 4%. A análise do percentual da intensidade média de fluorescência (IMF) para BODIPY™, em cada condição, foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. (B) A concentração de CXCL8/IL-8 no sobrenadante de monócitos incubados em cada condição é mostrada. Os resultados expressam a média \pm EPM de 5 (A) ou 7 (B) experimentos independentes.

4.2.8 O MIF, secretado por plaquetas ativadas com o DENV-2, está envolvido na biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos

Tendo em vista que plaquetas estimuladas com o DENV-2, ou trombina, são importantes para desencadear vias de sinalização específicas que culminem na ativação dos monócitos, no nosso modelo experimental *in vitro*; nos perguntamos se a plaqueta ativada poderia secretar algum fator que estivesse envolvido neste processo. Uma vez que plaquetas mediante estímulo podem secretar MIF (Strüßmann et al. 2013; Wirtz et al. 2015) e que, além disso, nossos resultados sugerem que esta citocina promove a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos, resolvemos investigar se o MIF estaria envolvido na ativação destas células durante a formação do agregado plaqueta-monócito *in vitro*. Então, avaliamos se plaquetas ativadas com o DENV-2 (figura 4.23 A), ou trombina (figura 4.23 B), são capazes de secretar MIF. Como observado na figura 4.23, plaquetas ativadas secretam MIF, quando comparadas com plaquetas não ativadas, após 1,5 h de estímulo que perdura até, pelo menos, 18 h.

Após constatarmos que plaquetas secretam MIF mediante estímulo com o DENV-2 ou trombina, o nosso próximo passo foi estudar o efeito deste mediador inflamatório na formação de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas. A análise da biogênese destas organelas foi realizada por diferentes técnicas e podemos observar, na figura 4.24, que o pré-tratamento de plaquetas ativadas pelo DENV-2 (figura 4.24 A) ou trombina (figura 4.24 B) com o inibidor do MIF, ISO-1, promove uma redução na formação de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito. Os dados obtidos por citometria de fluxo foram confirmados através de microscopia confocal e análise das imagens. Na figura 4.25 demonstramos que o ISO-1 promove uma redução na formação destas inclusões dinâmicas em monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 ou trombina, após 18 h de interação, quando comparada com monócitos expostos a plaquetas ativadas e pré-incubadas com veículo.

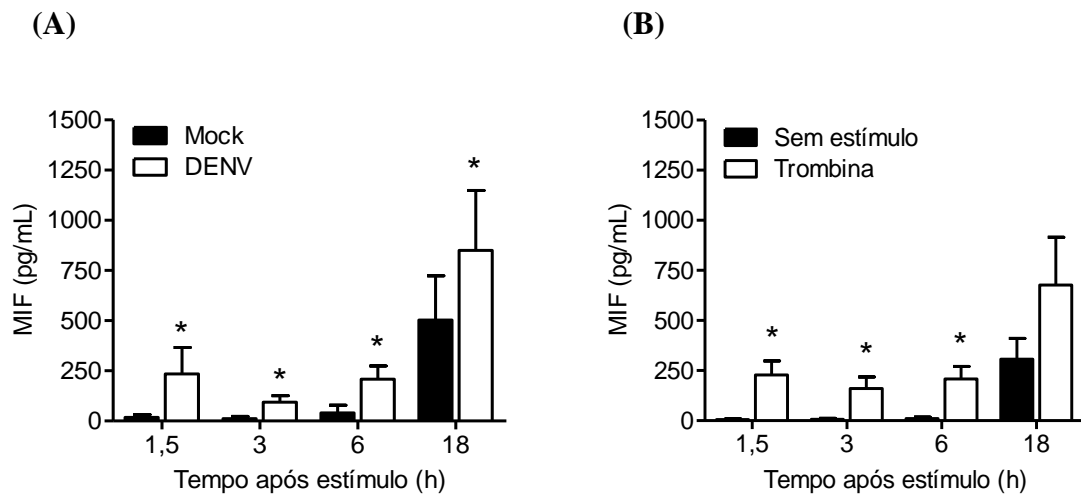


Figura 4.23 Plaquetas ativadas com o vírus dengue ou trombina *in vitro* secretam MIF. Plaquetas foram estimuladas com mock (A), ativadas com DENV-2 (A), não estimuladas (B) ou ativadas com trombina (B) por 1,5, 3, 6 ou 18 h. A concentração de MIF no sobrenadante de plaquetas incubadas em cada condição é mostrada. Os resultados expressam a média \pm EPM de 5 experimentos independentes. * aumento significativo em relação às plaquetas não ativadas; $p < 0,05$.

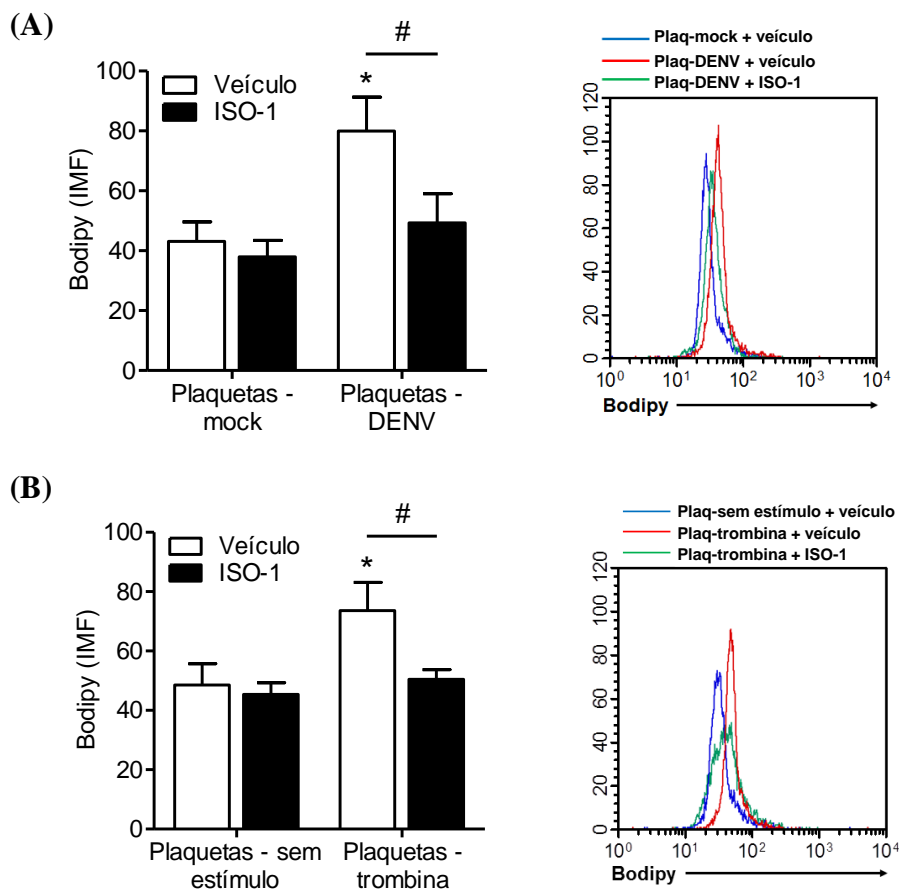
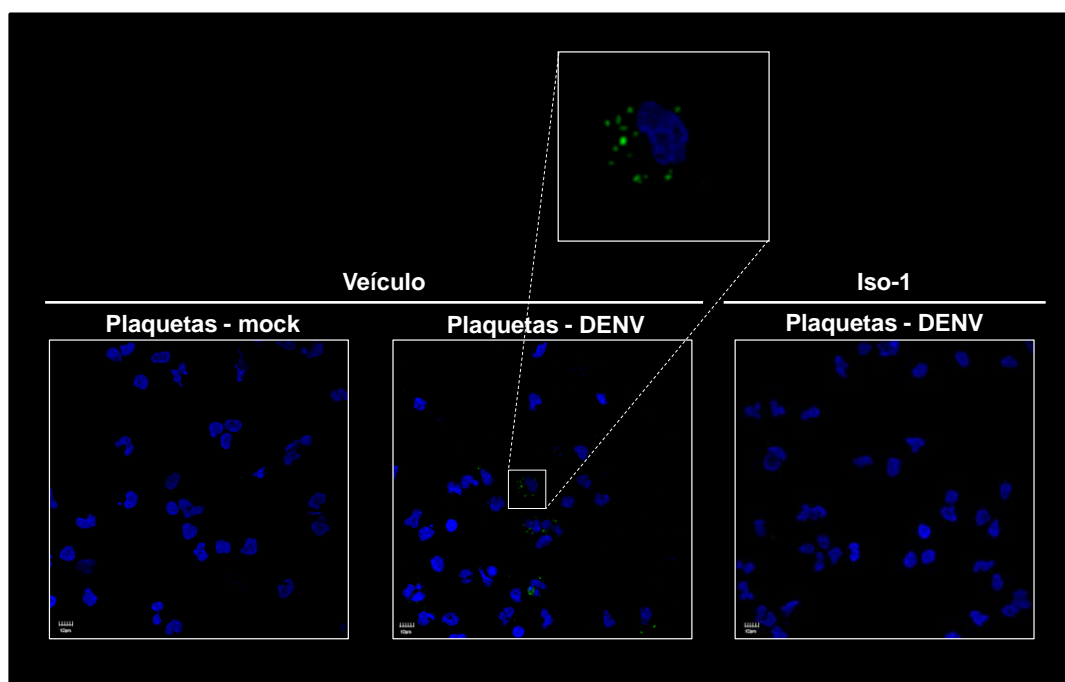
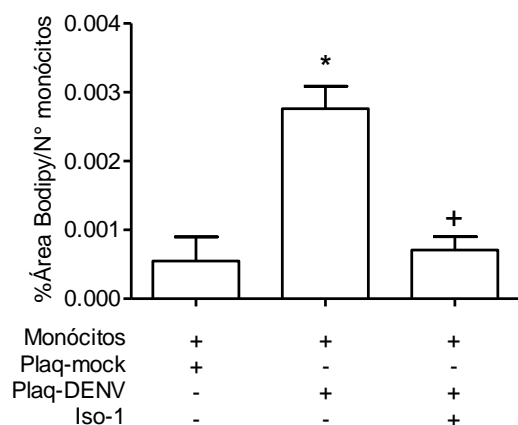


Figura 4.24 Efeito do MIF sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos no agregado plaqueta-monócito *in vitro*. Monócitos foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A), ativadas com DENV-2 (A), não estimuladas (B) ou ativadas com trombina (B) e tratadas com veículo ou ISO-1 100 μ M durante 30 min, por 18 h. Passado este período, as células foram marcadas com BODIPY™ e fixadas em paraformaldeído 4%. A análise do percentual da intensidade média de fluorescência (IMF) para BODIPY™, em cada condição, foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Histogramas representativos mostram o aumento na formação de corpúsculos lipídicos durante a interação entre plaquetas ativadas e pré-tratadas com veículo e monócitos, quando comparado com plaquetas não ativadas, pré-tratadas com veículo e expostas a monócitos; bem como a redução da marcação para BODIPY™ em monócitos expostos a plaquetas ativadas e pré-tratadas com ISO-1, quando comparada com plaquetas ativadas, pré-incubadas com veículo e expostas a monócitos. As barras representam a média \pm EPM de 5 experimentos independentes. * aumento significativo em relação às plaquetas não ativadas, pré-tratadas com veículo e expostas a monócitos; # redução significativa em relação às plaquetas ativadas, pré-tratadas com veículo e expostas a monócitos; $p < 0,05$.

(A)



(B)



(C)

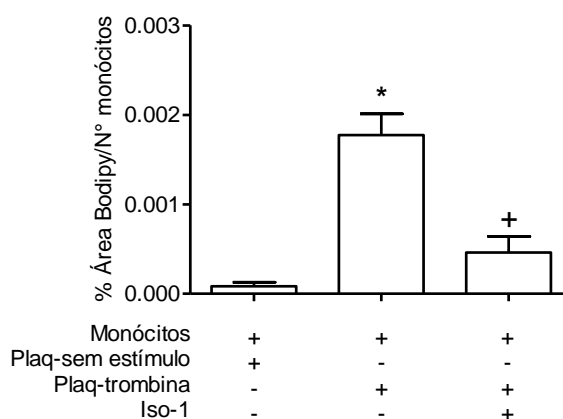


Figura 4.25 Papel do MIF sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas *in vitro*. Monócitos foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A-B), ativadas com DENV-2 (A-B), não estimuladas (C) ou ativadas com trombina (C) e tratadas com veículo ou ISO-1 100 μ M durante 30 min, por 18 h. Passado este período, as células foram fixadas e, em cada condição, marcadas com BODIPY™. Os corpúsculos lipídicos, de dez campos por lâmina, foram analisados por microscopia confocal. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji), utilizando-se uma macro específica, e os dados foram representados como % da área dos corpúsculos lipídicos pelo número total de monócitos no campo analisado. (A) As imagens são representativas e a sequência do painel mostra: monócitos expostos a plaquetas estimuladas com mock e pré-tratadas com veículo, monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 e pré-tratadas com veículo e monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 e pré-tratadas com ISO-1. (B-C) A média dos dez campos foi plotada no gráfico e expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação às plaquetas não ativadas, pré-incubadas com veículo e expostas a monócitos; + redução significativa em relação às plaquetas ativadas, pré-incubadas com veículo e expostas a monócitos.

4.2.9 O sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV-2 não é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos

Nossos resultados obtidos até o momento apontam para uma participação do MIF na sinalização que culmina na ativação de monócitos por plaquetas estimuladas com o DENV-2 ou trombina. Adicionalmente, observamos que no sobrenadante de plaquetas ativadas, por DENV-2 ou trombina, *in vitro* é possível detectar níveis consideráveis desta citocina após 1,5 h de estímulo. Assim, avaliamos se o sobrenadante de plaquetas ativadas por 2 h é capaz de promover o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos. Na figura 4.26, através de citometria de fluxo, mostramos que o sobrenadante proveniente de plaquetas ativadas com DENV-2 (figura 4.26 A) ou trombina (figura 4.26 B) não exerce efeito sobre a formação de corpúsculos lipídicos nos monócitos, quando comparado ao sobrenadante de plaquetas não ativadas. Essas observações foram confirmadas por microscopia confocal e análise das imagens (figura 4.27).

A partir dos dados obtidos, nosso próximo passo foi verificar se o MIF, presente no sobrenadante de plaquetas ativadas, era, de fato, funcional. Para isso, monocamadas de células HMEC-1 foram tratadas com o sobrenadante obtido de plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina por 2 h, bem como de plaquetas não estimuladas, e a permeabilidade da monocamada foi medida através de um ensaio de Transwell. Na figura 4.28 podemos observar que o sobrenadante proveniente de plaquetas ativadas é capaz de induzir permeabilidade em monocamadas de células endoteliais, quando comparado com o sobrenadante de plaquetas não estimuladas. De forma importante, este aumento na permeabilidade foi bloqueado na presença do inibidor do MIF, ISO-1. Sendo assim, esses resultados indicam que o MIF, presente no sobrenadante de plaquetas ativadas, é funcional e pode ativar o endotélio aumentando a permeabilidade vascular durante a infecção pelo DENV.

Além disso, ainda fomos avaliar se plaquetas ativadas são capazes de sinalizar para que monócitos secretem MIF, a fim de amplificar a resposta induzida por este mediador inflamatório durante a formação do agregado celular. Nossos dados sugerem que monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 (figura 4.29 A) ou trombina (figura 4.29 B), por 18 h, não secretem MIF.

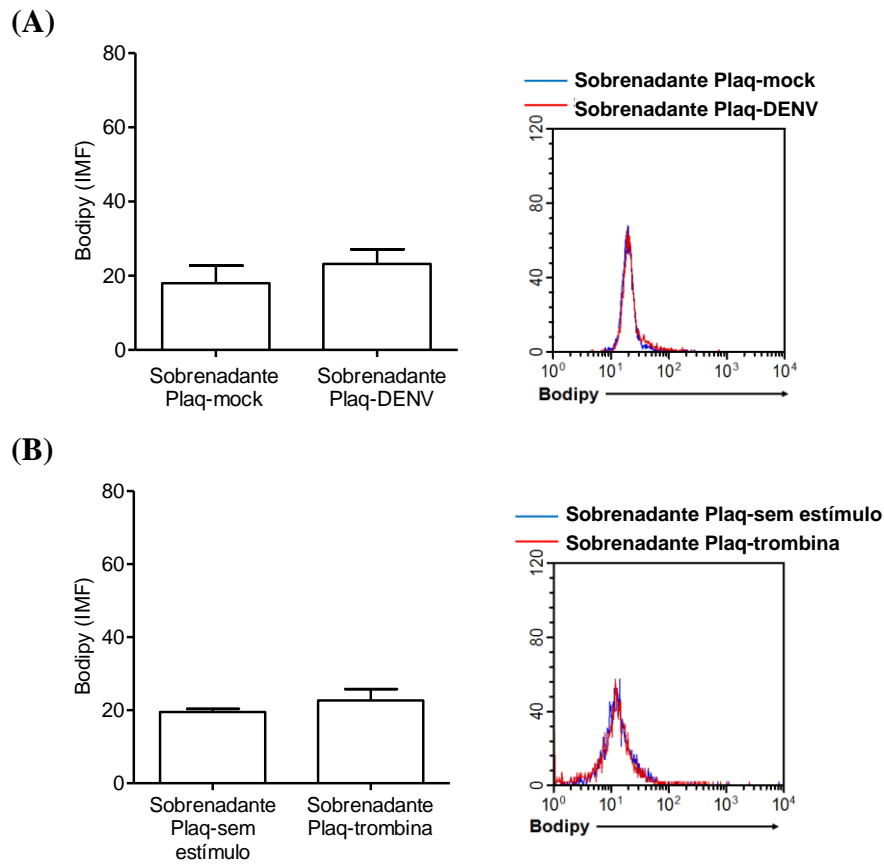


Figura 4.26 O sobrenadante de plaquetas ativadas não promove a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos. Monócitos foram incubados com o sobrenadante proveniente de plaquetas estimuladas com mock (A), ativadas com DENV-2 (A), não estimuladas (B) ou ativadas com trombina (B) por 18 h. Após este período, as células foram marcadas com BODIPY™ e fixadas em paraformaldeído 4%. A análise do percentual da intensidade média de fluorescência (IMF) para BODIPY™, em cada condição, foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. As barras representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. Histogramas representativos mostram que não há modulação na biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos ao sobrenadante de plaquetas ativadas quando comparado com o sobrenadante de plaquetas não ativadas.

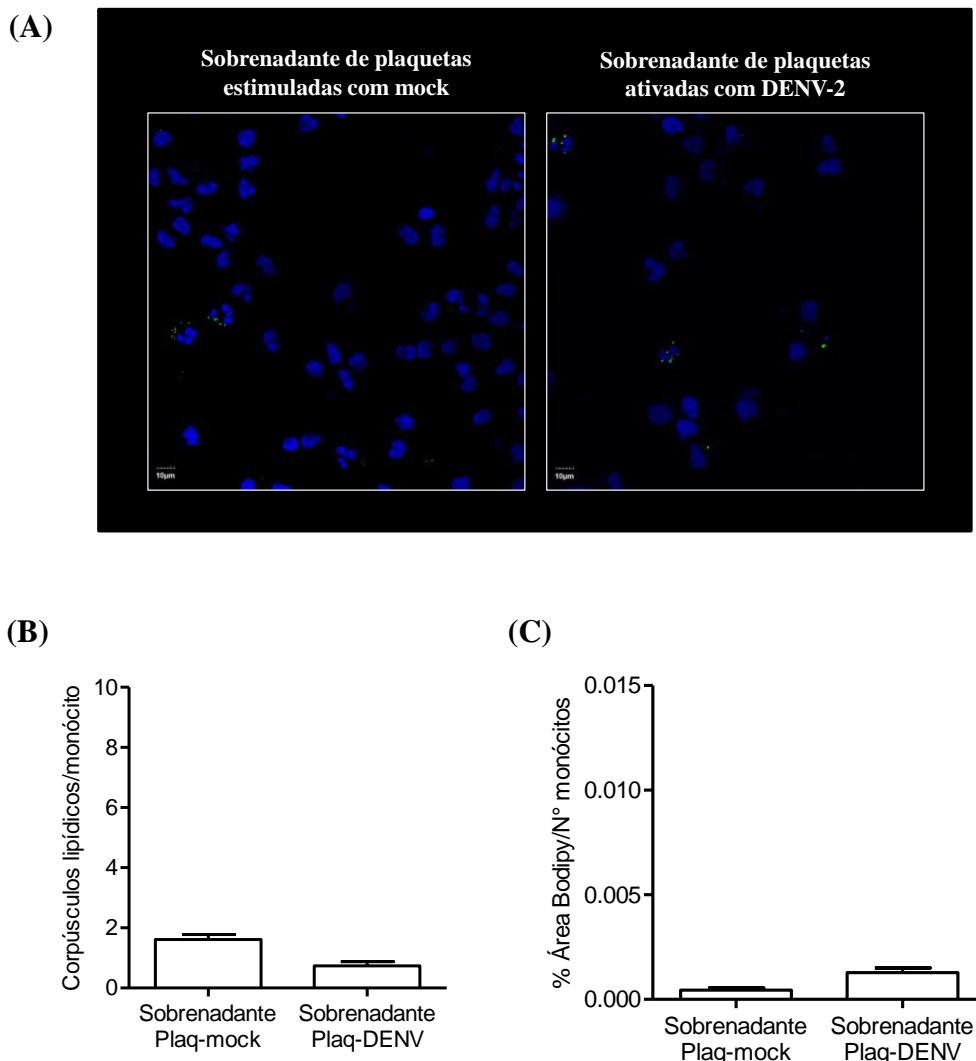


Figura 4.27 O sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV-2 não promove o aumento em número e tamanho de corpúsculos lipídicos em monócitos. Monócitos foram incubados com o sobrenadante proveniente de plaquetas estimuladas com mock ou ativadas com DENV-2 por 18 h. Após este período, as células foram fixadas e, em cada condição, marcadas com BODIPY™. Os corpúsculos lipídicos, de dez campos por lâmina, foram analisados por microscopia confocal. As imagens foram processadas pelo programa Image-J 1.46 (Fiji), utilizando-se uma macro específica, e os dados foram representados como % da área dos corpúsculos lipídicos pelo número total de monócitos no campo analisado. (A) As imagens são representativas e a sequência do painel mostra: monócitos expostos ao sobrenadante de plaquetas estimuladas com mock e monócitos expostos ao sobrenadante de plaquetas ativadas com DENV-2. (B) A contagem dos corpúsculos lipídicos foi realizada em aproximadamente 450 células em média. (C) A média dos dez campos foi plotada no gráfico. Os resultados são representativos dos dados obtidos por citometria de fluxo e expressam a média \pm EPM.

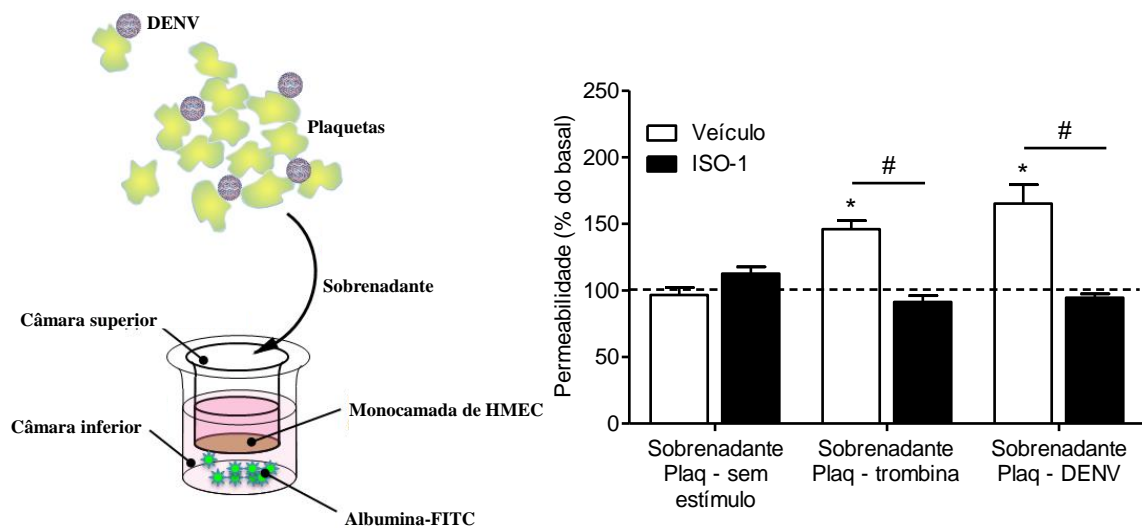


Figura 4.28 O sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV-2 induz aumento de permeabilidade endotelial por mecanismos dependentes de MIF. A passagem passiva de albumina conjugada ao FITC através de monocamadas de células endoteliais incubadas com o sobrenadante de plaquetas não estimuladas, ativadas com o DENV-2 ou trombina foi avaliada através do ensaio de Transwell. As células endoteliais foram estimuladas na presença ou ausência do inibidor do MIF, ISO-1 100 μ M. As barras representam média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * aumento significativo em relação ao sobrenadante de plaquetas não estimuladas e tratadas com veículo; # redução significativa em relação ao sobrenadante de plaquetas ativadas e tratadas com veículo; $p < 0,05$

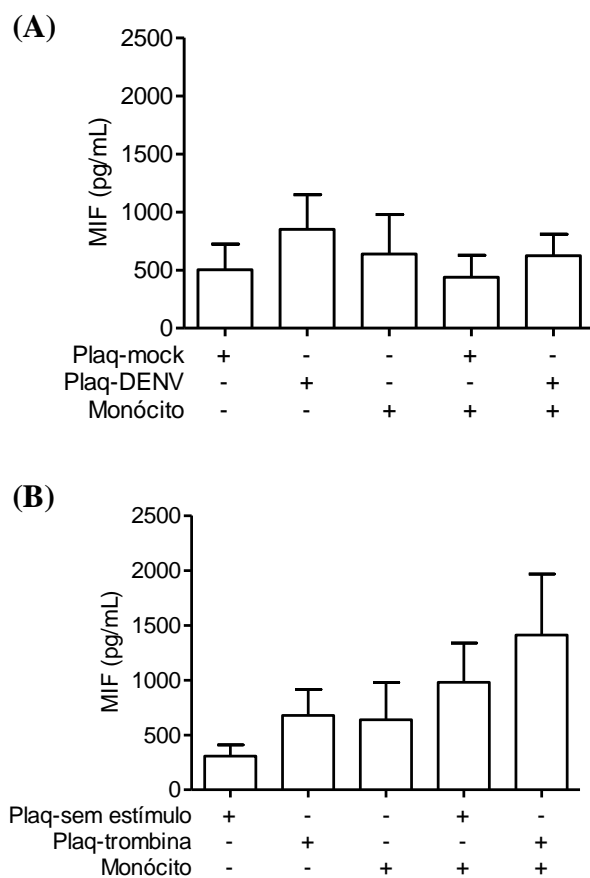


Figura 4.29 Plaquetas ativadas não aumentam a secreção de MIF por monócitos. Monócitos foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A), ativadas com DENV-2 (A), não estimuladas (B) ou ativadas com trombina (B) durante 18 h. A concentração de MIF no sobrenadante das células, em cada condição, é mostrada. Os resultados expressam a média \pm EPM de 4 experimentos independentes.

4.2.10 A biogênese de corpúsculos lipídicos é maior nos agregados formados com plaquetas ativadas pelo DENV-2

Com o conjunto de resultados obtidos, constatamos que o MIF é um importante mediador inflamatório envolvido na ativação de monócitos por plaquetas estimuladas com o DENV-2 ou trombina. Essa citocina, armazenada em α grânulos plaquetários, é rapidamente secretada mediante estímulo, incluindo o DENV-2 como demonstrado neste estudo. Além disso, observamos que plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina podem secretar outros mediadores inflamatórios, como CCL5/RANTES e CXCL4/PF4. De forma surpreendente, o sobrenadante de plaquetas ativadas, rico em citocinas pró-inflamatórias, falhou em induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos. Por outro lado, demonstramos a participação de plaquetas na sinalização que culmina tanto no aumento da formação destas organelas citoplasmáticas quanto na secreção de CXCL8/IL-8 por monócitos.

Por esse motivo, acreditamos que além do possível envolvimento de mediadores inflamatórios, como o MIF, na sinalização que promove uma resposta funcional em monócitos expostos a plaquetas ativadas, um outro sinal seja crucial, incluindo a própria adesão direta entre essas células. Na figura 4.30, observamos que a biogênese de corpúsculos lipídicos é maior nos agregados formados com plaquetas ativadas com DENV-2 (figura 4.30 A) ou trombina (figura 4.30 B). Entretanto, parece que não é o conteúdo lipídico das plaquetas ativadas que esteja contribuindo para o aumento da formação destas inclusões dinâmicas observado na população de monócitos CD14⁺CD41⁺, visto que o DENV-2 ou a trombina falharam em aumentar a gênese de corpúsculos lipídicos em plaquetas (figura 4.31). Esses dados fortemente sugerem que a interação direta com plaquetas ativadas seja crucial para que os monócitos respondam com funções específicas.

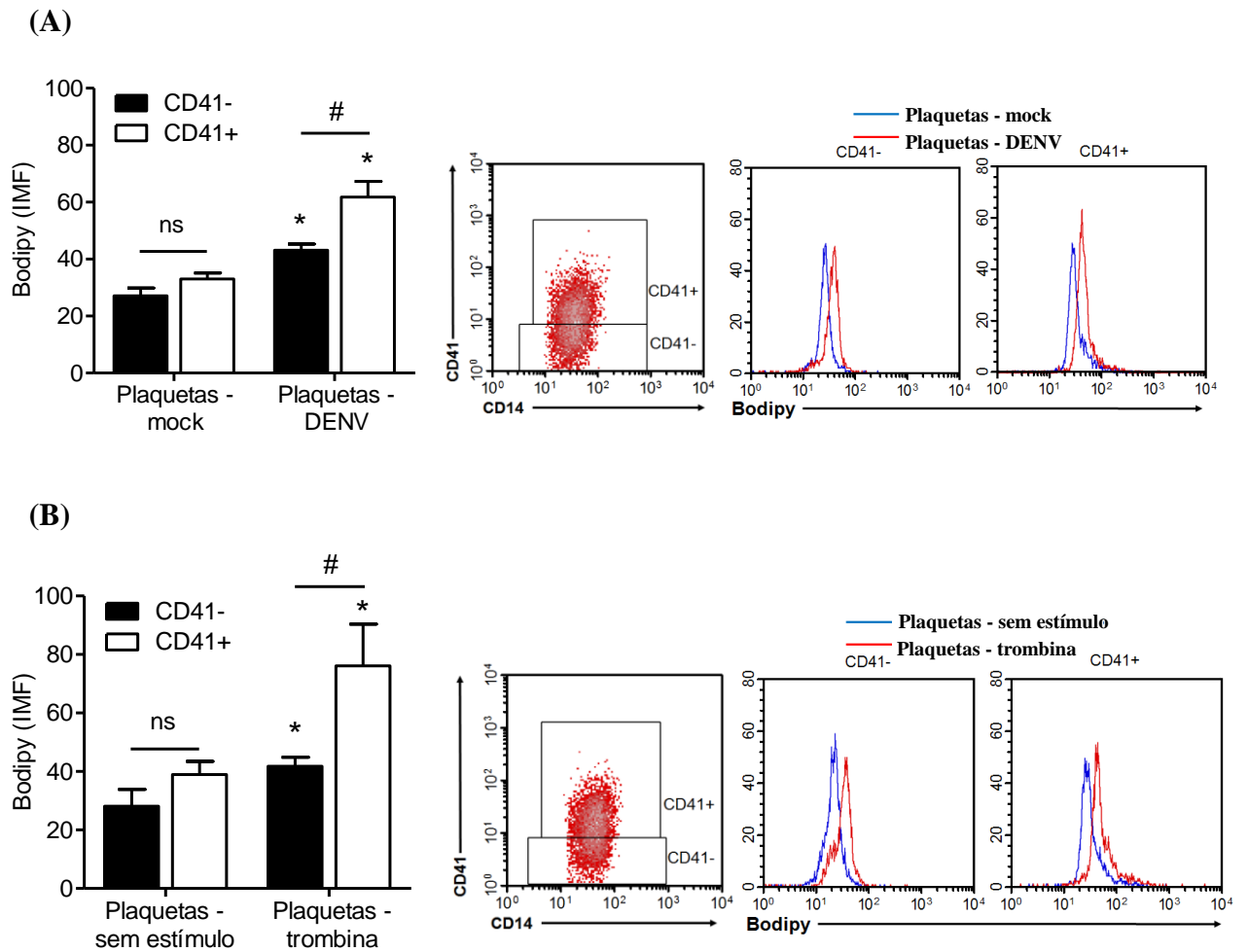


Figura 4.30 A biogênese de corpúsculos lipídicos é maior nos agregados formados por plaquetas ativadas. Monócitos foram expostos a plaquetas estimuladas com mock (A), ativadas com o DENV-2 (A), não estimuladas (B) ou ativadas com trombina (B). Após 18 h de interação, as células foram marcadas com BODIPY™ e fixadas em paraformaldeído 4%. A análise do percentual da intensidade média de fluorescência (IMF) para BODIPY™ em monócitos (CD14+) negativos para plaquetas (CD41-) ou positivos (CD41+), em cada condição, foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. As barras expressam a média \pm EPM de 5 experimentos independentes. * aumento significativo em relação às plaquetas não ativadas; # aumento significativo em relação aos monócitos (CD14+) CD41-; $p < 0,05$. *Density plots* representativos mostram a estratégia de gate, no qual as populações CD14+CD41+ e CD14+CD41-, de cada condição, foram selecionadas para a análise. Histogramas representativos mostram o aumento na formação de corpúsculos lipídicos em monócitos agregados com plaquetas ativadas, quando comparado com plaquetas não ativadas.

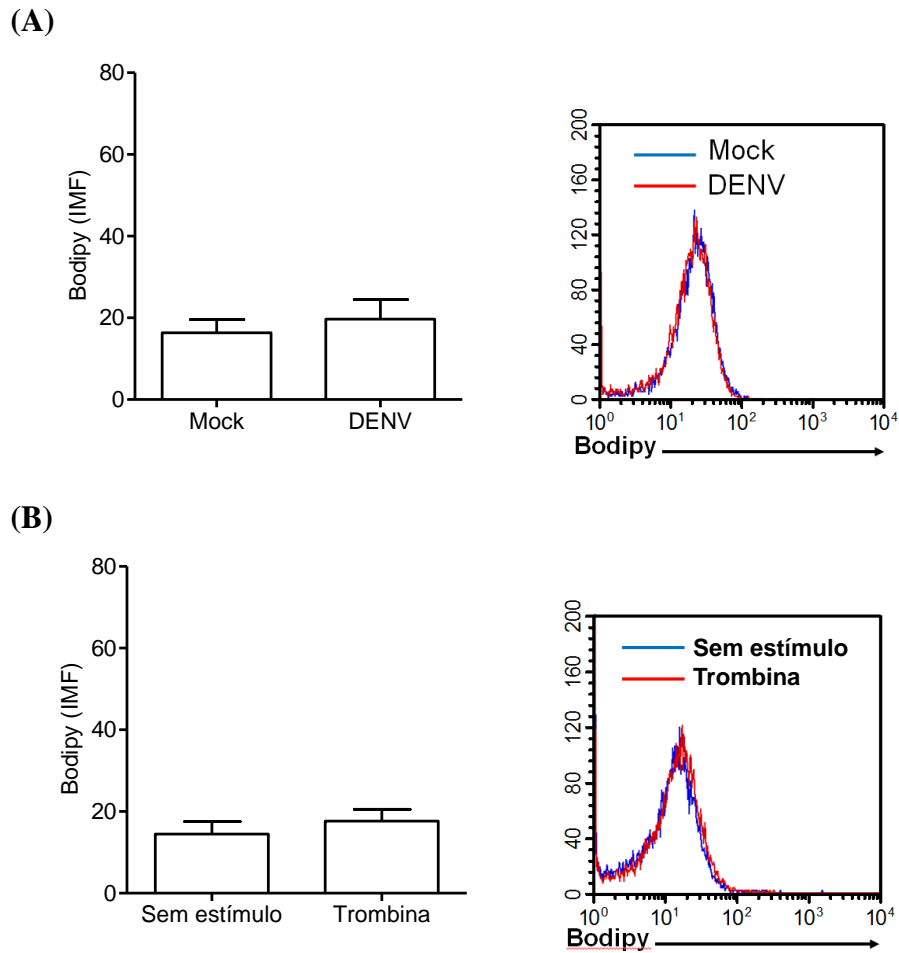


Figura 4.31 DENV-2 ou trombina não induzem a formação de corpúsculos lipídicos em plaquetas. Plaquetas foram estimuladas com mock (A), ativadas com o DENV-2 (A), não estimuladas (B) ou ativadas com trombina (B) por 2h. Após 18 h, as células foram marcadas com BODIPY™ e fixadas em paraformaldeído 4%. A análise do percentual da intensidade média de fluorescência (IMF) para BODIPY™, em cada condição, foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. As barras expressam a média \pm EPM de 5 experimentos independentes. Histogramas representativos mostram que o DENV-2 (A) ou a trombina (B) não modulam a biogênese de corpúsculos lipídicos em plaquetas, quando comparados com plaquetas não ativadas.

5 Discussão

Nos últimos anos, estudos demonstraram as complexas e dinâmicas interações entre os vírus e as células do hospedeiro. Dentro deste contexto, foi extensivamente documentado um papel considerável de lipídios celulares no ciclo de replicação viral. Inicialmente, a importância desses lipídios estava particularmente relacionada à fusão da membrana durante os processos de entrada e envelopamento viral. Recentemente, foi observado que os vírus codificam proteínas que atuam sobre a maquinaria de sinalização e síntese lipídica, a fim de remodelar a célula hospedeira e, assim, estabelecer um ambiente ideal para a sua replicação. De fato, existem diversos mecanismos que explicam como os vírus são capazes de manipular ou alterar o estado metabólico do hospedeiro visando a sua propagação (Heaton e Randall 2011). Assim, as pesquisas que avaliam a interação vírus-hospedeiro providenciam uma melhor compreensão não apenas dos mecanismos moleculares da patogênese viral, mas também da própria biologia celular do hospedeiro (Mazzon e Mercer 2014).

De forma interessante, foi associado à infecções clínicas e experimentais, mas também à neoplasias e diversas condições inflamatórias, o acúmulo intracelular de lipídios em corpúsculos lipídicos (Bozza et al. 2009). Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas compostas por um núcleo hidrofóbico rico em lipídios neutros envolto por uma monocamada de fosfolipídios e inúmeras proteínas associadas, nem todas ainda descobertas. Praticamente todas as células produzem estas organelas, que podem variar significativamente no número e tamanho, na proporção triglicerídeo/éster de colesterol e nos constituintes proteicos de acordo com o estímulo e até mesmo o tipo celular (Bozza e Viola 2010; Herker e Ott 2012). Avanços recentes indicam que os corpúsculos lipídicos não atuam apenas como depósitos de lipídios, mas também como estruturas dinâmicas altamente reguladas que possuem funções como domínios citoplasmáticos envolvidos no metabolismo e tráfego lipídico, na sinalização e ativação celular, bem como no controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Bozza et al. 2009).

Parece que o papel exercido pelos corpúsculos lipídicos, durante processos infecciosos, torne-os alvo bastante interessante para determinados patógenos. Enquanto algumas bactérias intracelulares codificam a própria maquinaria de biossíntese lipídica e promovem a gênese dessas organelas de forma independente do hospedeiro, a fim de providenciar um ambiente favorável rico em ácidos graxos (Daniel et al. 2011); diversos vírus de RNA utilizam os corpúsculos lipídicos em diferentes estágios do seu ciclo de replicação (Miyinari et al. 2007; Samsa et al. 2009). Embora muitos detalhes mecanísticos da interação destas organelas com determinados patógenos ainda precisam ser desvendados, evidências sugerem que os corpúsculos lipídicos são importantes para a replicação de diversos vírus.

O melhor exemplo documentado ao que diz respeito à interação dos corpúsculos lipídicos com um patógeno viral, envolve um dos membros da família *Flaviviridae*, o HCV. O HCV é considerado o principal patógeno humano associado a hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Saka e Valdivia 2012). A esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo hepatocelular de corpúsculos lipídicos, é considerada o fenótipo histológico mais proeminente durante a infecção pelo HCV (Negro e Sanyal 2009; Syed et al. 2010). De forma interessante, além de atuar como marcador patológico, estas organelas estão frequentemente envolvidas na associação com proteínas virais, replicação e produção de partículas virais infecciosas (Miyanari et al. 2007; Targett-Adams et al. 2008a, 2008b).

Na literatura atual, apesar de muitos estudos terem mostrado o papel dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo HCV, pouco se sabe sobre o envolvimento destas organelas durante a infecção por outros membros da família *Flaviviridae* de interesse clínico, como o DENV. Recentemente demonstramos, pela primeira vez, um aumento significativo da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV tanto na infecção *in vitro* (Samsa et al. 2009), quanto em leucócitos isolados de pacientes com a forma grave da doença (Assunção-Miranda et al. 2010). Além disso, observamos que estas organelas citoplasmáticas desempenham funções cruciais durante a infecção pelo DENV, pois constatamos que a proteína do capsídeo viral interagiu especificamente com os corpúsculos lipídicos de diferentes tipos celulares, com implicações na capacidade replicativa e infecciosa do vírus (Samsa et al. 2009). Adicionalmente, demonstramos que a inibição farmacológica da formação de corpúsculos lipídicos afetava a produção de partículas virais infecciosas, sugerindo, assim, a relevância destas organelas durante a infecção pelo DENV (Samsa et al. 2009) e levantando a possibilidade de que estas estruturas possam atuar como potencial alvo terapêutico na dengue. Desta forma, pretende-se com o presente estudo dar continuidade ao que foi desenvolvido durante o mestrado e, assim, melhor caracterizar os efeitos da infecção sobre os mecanismos que regulam a biogênese e a função dos corpúsculos lipídicos.

Nossos resultados inicialmente demonstraram que o DENV-2 foi capaz de induzir o aumento em número e tamanho de corpúsculos lipídicos em linhagens de células hepáticas derivadas de hepatocarcinoma humano (HepG2 e Huh-7), de células epiteliais derivadas de carcinoma pulmonar humano (A549), bem como de fibroblastos provenientes de rim de hamster (BHK-21), após 24 ou 48 h de infecção *in vitro*, quando comparado com células incubadas com o mock. A escolha da MOI utilizada já havia sido previamente padronizada para cada tipo celular (Samsa et al. 2009; Assunção-Miranda et al. 2010). Um ponto curioso deste estudo foi a observação de que o vírus inativado por aquecimento não promovia a

formação dessas inclusões citoplasmáticas *in vitro*, sugerindo que este evento dependa das partículas estruturadas para promover uma infecção produtiva.

No entanto, dados do nosso grupo revelaram que a biogênese de corpúsculos lipídicos independe de uma infecção produtiva quando o estímulo é o bacilo Calmette-Guérin (BCG), já que a micobactéria morta por aquecimento levou à indução da formação destas organelas com a participação do TLR2 (D'Avila et al. 2006). É possível, portanto, que as mudanças conformacionais induzidas na glicoproteína E do DENV prejudiquem a interação do vírus com um possível receptor na membrana celular que seja capaz de promover ou facilitar a sua internalização, além de desencadear uma cascata de sinalização que culmine na gênese dos corpúsculos lipídicos.

Através da análise da expressão do mRNA de receptores envolvidos no reconhecimento de moléculas específicas derivadas de micro-organismos, foi demonstrado que a infecção pelo DENV promovia um aumento na expressão do mRNA de TLR3, TLR8, RIG-I e MDA5, sugerindo que o vírus poderia ser reconhecido pelos mesmos (Conceição et al. 2010a). Dados recentes mostraram que a proteína NS1 do DENV poderia ativar TLR2 e TLR6, que se encontram mais expressos durante a infecção, culminando na secreção de mediadores inflamatórios clássicos dessa via, como IL-6 e TNF- α . Ainda neste estudo, foi observado que camundongos deficientes para o TLR6, quando tratados com a proteína viral NS1 ou infectados pelo DENV, apresentavam uma maior sobrevivência quando comparada com animais selvagens, sugerindo um papel deste receptor na imunopatogênese da doença (Chen et al. 2015). De forma interessante, já foi demonstrado que monócitos isolados de pacientes com dengue apresentavam elevada expressão de TLR2 e TLR4 (Azeredo et al. 2010). Deste modo, não podemos descartar a hipótese de que moléculas do DENV ao serem reconhecidas por tais receptores desencadeiem sinalização intracelular que culmine na biogênese de corpúsculos lipídicos observada durante a infecção.

Assim, é possível que diversos mecanismos estejam envolvidos na regulação da formação destas organelas durante a infecção pelo DENV, com potencial relevância na patogenia da doença. Embora não existam inibidores específicos para os corpúsculos lipídicos, diversos estudos demonstraram que diferentes classes de drogas são capazes de bloquear a formação destas inclusões dinâmicas. Dessa forma, avaliamos o efeito de inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios, o C75 e o triacsin C, sobre a infecção pelo DENV. Ambas as drogas já haviam sido reportadas como inibidoras da formação destas estruturas em distintos tipos celulares (Fujimoto et al. 2006; Accioly et al. 2008). Inclusive, nossos dados prévios já mostraram um papel do C75 na gênese de corpúsculos lipídicos em células BHK após 48 h de infecção. Portanto, ao analisarmos o

efeito destes inibidores sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos, em diferentes tipos celulares e tempos de infecção, observamos uma redução significativa no número e tamanho destas inclusões citoplasmáticas induzidas durante a infecção pelo DENV. Estes resultados fortemente sugerem que a formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV ocorra de forma dependente das enzimas ácido graxo sintase e acil-CoA sintetase.

Heaton e colaboradores (2010) observaram que a proteína NS3 estava envolvida no recrutamento da enzima FAS, cuja atividade estava aumentada durante a infecção pelo DENV, para os sítios de replicação viral. Embora esta pesquisa não tenha avaliado a biogênese e/ou função dos corpúsculos lipídicos neste processo, foi recentemente demonstrado que a Rab18 facilitava a interação entre essa enzima e a proteína NS3, bem como direcionava a FAS tanto para o RE quanto para os corpúsculos lipídicos (Tang et al. 2014). Esses dados fortemente sugerem que o DENV modula o metabolismo do hospedeiro a fim de facilitar o seu ciclo de replicação, que requer grande quantidade de lipídios, tais como para a replicação e/ou montagem. Dentro desse contexto, demonstramos um possível papel dos corpúsculos lipídicos na formação de partículas virais infecciosas, uma vez que a inibição da enzima FAS promoveu uma modulação negativa na formação destas organelas e, em paralelo, na secreção de vírus infecciosos (Samsa et al 2009).

A nossa hipótese é de que a interferência na biogênese de corpúsculos lipídicos possa atuar como um método de intervenção antiviral. De forma interessante, ao investigarmos o papel do C75 e triacsin C sobre a replicação do DENV, nas células BHK-21 e HepG2 após 24 h de infecção, observamos uma redução na amplificação do RNA viral. Assim, estes resultados sugerem a participação dos corpúsculos lipídicos na replicação do DENV.

A fim de promover o aumento de constituintes lipídicos importantes no estabelecimento de uma replicação viral eficiente, o HCV promove a ativação da enzima ácido graxo sintase (Yang et al. 2008), do fator de transcrição SREBP (Waris et al. 2007) e dos receptores nucleares PPAR- γ (Kim et al. 2007) e LXR (García-Mediavilla et al. 2012). Adicionalmente, foi observado um aumento na expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico (LXR- α , PPAR- γ , SREBP-1c, SREBP-2 e FASN) no fígado de pacientes com hepatite crônica e esteatose (Lima-Cabello et al. 2011). Uma vez que os nossos resultados demonstraram que a inibição de enzimas envolvidas na lipogênese prejudicava não apenas a formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 *in vitro*, mas também a replicação viral; resolvemos investigar se durante a infecção havia uma possível modulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios.

Nossos estudos demonstraram que o DENV-2 foi capaz de modular positivamente a expressão dos genes PPAR- γ e ADRP nas células HepG2 após 24 h de infecção. Observações

do nosso grupo revelaram que o PPAR- γ – receptor nuclear ativado por lipídio – tinha sua expressão regulada e estava associado à processos relacionados com a formação de corpúsculos lipídicos, em leucócitos, durante a infecção por micobactéria (Almeida et al. 2009). Vale ressaltar que o PPAR- γ medeia a expressão da ADRP em distintas condições e tipos celulares. A ADRP é um membro da família de proteínas PAT, presente na superfície dos corpúsculos lipídicos e está diretamente envolvida na biogênese destas organelas (Almeida et al. 2012). Além disso, foi demonstrado que o PPAR- γ é capaz de regular diversos genes envolvidos no metabolismo de lipídios, incluindo FASN (Shi et al. 2013) e acil-CoA sintetase (Kan et al. 2015). Sendo assim, os resultados obtidos até o momento sugerem que este receptor nuclear ao ter sua expressão aumentada durante a infecção pelo DENV, possa modular a expressão de diversos genes envolvidos na síntese lipídica, favorecendo a biogênese de corpúsculos lipídicos.

Em contrapartida, não observamos alterações na expressão dos genes PPAR- α , ABCA1, ACAT1 e FASN nestas mesmas condições. Vale destacar que o estudo recente que constatou um aumento na atividade da FAS, durante a infecção pelo DENV, demonstrou que os níveis proteicos não sofriam alterações quando comparados com células cultivadas com mock (Heaton et al. 2010). Complementarmente, através da análise proteômica de células A549 infectadas com o DENV, foi observado que os níveis da FASN permaneciam inalterados quando comparados com o mock (Chiu et al. 2014). Portanto, o conjunto desses dados nos revela que apesar dos níveis proteico e/ou gênico de uma determinada enzima, como a FAS, estarem inalterados durante a infecção pelo DENV, é possível que a atividade desempenhada pela mesma esteja aumentada. Por fim, evidências sugerem que a infecção pelo DENV possa modular positiva- ou negativamente vias específicas da síntese lipídica, visando facilitar a replicação viral e, conseqüentemente, drogas que atuem sobre estas vias possam representar potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da dengue.

Durante a infecção pelo HCV, foi observado que a proteína C promovia um aumento no tamanho e densidade dos corpúsculos lipídicos em células hepáticas (Lyn et al. 2010). Além disso, mostramos que a transfecção de células BHK-21 com um vetor de expressão que codifica a forma madura da proteína C do DENV também era capaz de promover a indução da formação destas estruturas, quando comparada com células BHK-21 transfectadas com um vetor controle. Todavia, esta indução foi menor do que aquela observada durante a infecção com o DENV-2 *in vitro* (Samsa et al. 2009), sugerindo que outros fatores virais ou a infecção em si estejam envolvidos na alteração do metabolismo lipídico do hospedeiro.

De fato, é possível que a infecção como um todo contribua para a gênese dos corpúsculos lipídicos. Estudos demonstraram que durante a infecção pelo DENV há a

produção de diversos mediadores inflamatórios e, portanto, acreditamos que alguns destes possam atuar em sinergismo com o vírus para promover a formação destas estruturas citoplasmáticas. Dados do nosso grupo mostraram que o PAF e moléculas semelhantes ao PAF, mas não o liso-PAF, promovem a biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira dependente do seu receptor acoplado a proteína G e da sinalização abaixo deste, que inclui a ativação da 5-LO, PKC e fosfolipase C (PLC), num mecanismo que pode envolver uma alça autócrina na geração de MCP-1 (Bozza et al. 1996a, 1997, 1998; de Assis et al. 2003). Adicionalmente, demonstramos que a quimiocina MCP-1 estava envolvida, durante inflamação induzida por LPS ou sepse experimental, na regulação da gênese destas organelas em macrófagos, de uma forma dependente do seu receptor CCR2, da sinalização envolvendo MAPK e PI3K, bem como da dinâmica microtubular (Pacheco et al. 2007). Além disso, nosso grupo observou que o MIF é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos, sendo este processo dependente do seu receptor CD74, da eotaxina e do receptor CCR3 (Vieira-de-Abreu et al. 2011). Tendo em vista que estes mediadores inflamatórios se encontram em níveis elevados durante a infecção pelo DENV e ainda desempenham um papel importante na patogênese da doença (Yang et al. 1995; Chen et al. 2006; Fink et al. 2006; Lee et al. 2006; Souza et al. 2009; Assunção-Miranda et al. 2010; Guabiraba et al. 2010; Sierra et al. 2010; Chuang et al. 2011; Yeh et al. 2013; Jeewandara et al. 2015), é razoável que eles possam estar envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos. Porém, esta hipótese ainda não foi investigada.

Estudos demonstraram que os níveis de MIF encontram-se elevados no soro de pacientes obesos (Dandona et al. 2004) e que a perda de peso, através de dieta e atividade física, resulta na redução dos níveis sorológicos deste mediador inflamatório (Church et al. 2005). Além disso, foi observado que durante a adipogênese a concentração intracelular do MIF estava aumentada, sugerindo que ele possa estar diretamente envolvido neste processo (Ikeda et al. 2008). De forma interessante, foi constatado que a inibição do MIF resultava, dentre outros efeitos, na redução do acúmulo de macrófagos espumosos, culminando na estabilização da placa aterosclerótica após injúria vascular (Schober et al. 2004). Sendo assim, estas observações, em associação com o fato de que o MIF é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos, indicam que este mediador pró-inflamatório possa estar envolvido no metabolismo de lipídios e, resolvemos, portanto, investigar este processo.

Nossos resultados sugerem que a proteína MIF recombinante promova a formação de corpúsculos lipídicos de uma maneira similar à indução promovida pelo DENV-2, em monócitos humanos após 24 h. Entretanto, observamos que o MIF, produzido durante a infecção ou fornecido à cultura (proteína MIF recombinante), não foi capaz de modular a

expressão dos genes PPAR- γ , PPAR- α , ADRP, ABCA1, FASN e ACAT1 nas células HepG2, após 24 h. De forma interessante, foi recentemente demonstrado um papel dessa citocina na oxidação lipídica em células HepG2, de forma dependente do seu receptor CD74 e da via da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Moon et al. 2013). Apesar desta evidência ser contraditória em relação aos efeitos adipogênicos do MIF, é possível que este mediador pró-inflamatório possa desempenhar distintas funções de acordo com o tipo celular. Por fim, Baumeier e colaboradores (2015) sugeriram que o MIF poderia regular o metabolismo lipídico hepático através do seu recrutamento para os corpúsculos lipídicos. Entretanto, outros estudos são necessários para elucidar este mecanismo.

Através de estudos anteriores, demonstramos que o MIF encontrava-se estocado nos corpúsculos lipídicos de macrófagos humanos infectados pelo DENV-3 por 24 h *in vitro* (Assunção-Miranda et al. 2010). Dessa forma, além de participar de vias relacionadas ao metabolismo lipídico, o MIF também está envolvido em processos imunológicos e inflamatórios. Dentro deste contexto, além da concentração desta citocina estar relacionada à gravidade da dengue (Chen et al. 2006), constatamos, através da infecção experimental com o DENV *in vivo*, manifestações clínicas de menor gravidade em camundongos deficientes para o MIF quando comparadas aos animais selvagens (Assunção-Miranda et al. 2010). Além disso, evidências recentes indicam que o MIF possa contribuir para o aumento da permeabilidade vascular durante a infecção pelo DENV (Chuang et al. 2011; Yeh et al. 2013). Assim, o conjunto desses dados revelam um importante papel do MIF durante a infecção pelo DENV e, desta maneira, resolvemos aprofundar o nosso entendimento no que diz respeito à participação deste mediador pró-inflamatório na patogênese da doença, porém num cenário pouco estudado, que envolve a formação de agregados plaqueta-monócito.

Evidências sugerem que as plaquetas atuem como efetores imunes e inflamatórios (Weyrich et al. 2003; Vieira-de-Abreu et al. 2012). Elas armazenam e secretam diversas substâncias biologicamente ativas, incluindo fatores de crescimento, citocinas – como o MIF – e quimiocinas. Seu impacto sobre as células do sistema imunológico está associado com o recrutamento de leucócitos e células endoteliais para os sítios de infiltração de patógenos ou injúria vascular. Além disso, plaquetas interagem com neutrófilos, monócitos e linfócitos, promovendo sua ativação e formando agregados plaqueta-leucócito, que culmina tanto na imobilização de micro-organismos quanto na prevenção da sua propagação (Weyrich et al. 1996; Nishimura et al. 2012; Strüßmann et al. 2013; de Azeredo et al. 2015). Adicionalmente, foi observado que as plaquetas expressam diversos receptores na sua superfície, incluindo lectinas, integrinas, TLR e receptores que reconhecem a porção Fc de imunoglobulinas; permitindo a interação direta com diversos patógenos e imunocomplexos (Aslam et al. 2006;

Fitzgerald et al. 2006; Qian et al. 2008). Apesar do avanço recente no conhecimento sobre a biologia e as funções das plaquetas, pouco se sabe a respeito da participação destas células na ativação imune e amplificação inflamatória durante a dengue.

Embora o DENV tenha sido detectado em plaquetas isoladas de pacientes com dengue, não havia evidências de que estas células eram capazes de replicar o vírus (Noisakran et al. 2009). Baseado nessas descobertas e em estudos prévios demonstrando que plaquetas anucleadas traduzem moléculas de mRNA (Weyrich et al. 2009), Simon e colaboradores (2015) constataram que plaquetas podem sintetizar a proteína NS1 e replicar o genoma do DENV. Recentemente, nosso grupo observou um aumento na expressão de P-selectina em plaquetas provenientes de pacientes com dengue ou expostas ao DENV *in vitro* (Hottz et al. 2013b). Dessa forma, considerando que durante a infecção pelo DENV as plaquetas encontram-se ativadas, foi demonstrado níveis elevados de agregados plaqueta-monócito e plaqueta-neutrófilo tanto em primatas quanto em humanos (Onlamoon et al. 2010; Tsai et al. 2011). Complementarmente, Hottz e colaboradores (2014) mostraram um aumento na formação de agregados plaqueta-monócito em amostras sanguíneas de pacientes com dengue, especialmente em pacientes trombocitopênicos e com aumento na permeabilidade vascular.

A adesão de plaquetas ativadas a monócitos sinaliza para a síntese de diversas citocinas, na maioria das vezes pró-inflamatórias (Weyrich et al. 1996, 2005). Além disso, dados recentes mostraram que plaquetas ativadas por OxLDL (Badrnya et al. 2013) ou micobactéria (Feng et al. 2014) formam agregados com monócitos e sinalizam para mudanças fenotípicas nos mesmos, incluindo a diferenciação em células espumosas, que é caracterizada pelo aumento no número de corpúsculos lipídicos. Uma vez que os mecanismos inflamatórios na dengue e na interação plaqueta-monócito ainda precisam ser esclarecidos, resolvemos investigar, nesta segunda parte do estudo, o papel de plaquetas estimuladas *in vitro* com o DENV, ou trombina, sobre a ativação de monócitos, com foco na sinalização que culmina na possível biogênese de corpúsculos lipídicos.

Inicialmente, nossos resultados demonstraram que plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina formam mais agregados com monócitos quando comparados com plaquetas incubadas com mock ou não estimuladas, respectivamente. Além disso, esse fenômeno mostrou ser relevante apenas em tempos precoces de interação (30 min e 1 h), não havendo diferença na formação do agregado plaqueta-monócito, entre os grupos, nos demais tempos analisados (2 e 18 h).

Pesquisas recentes demonstraram que a incubação de plaquetas com o DENV-2 *in vitro* aumenta significativamente a expressão de P-selectina na superfície celular após 6 h quando comparada com o mock. Além disso, a cinética da expressão de P-selectina em

plaquetas expostas ao DENV-2 foi diferente daquela observada com a trombina, sugerindo que o DENV ativa plaquetas por diferentes mecanismos (Hottz et al. 2013b). Dados na literatura mostram que a ligação da P-selectina ao PSGL-1 é crítica para a formação do agregado plaqueta-monócito (Vieira-de-Abreu et al. 2012). Adicionalmente, a adesão intercelular é estabilizada de forma direta ou indireta (via ponte de fibrinogênio) por outros receptores, como a glicoproteína (GP) Ib e a integrina $\alpha_2\beta_3$, nas plaquetas, e as integrinas β_2 nos monócitos (Ed Rainger et al. 2015). Por esse motivo, estudos adicionais são necessários para avaliar os receptores envolvidos durante a interação entre essas células.

O nosso próximo passo foi analisar a secreção de mediadores inflamatórios durante a formação de agregados entre plaquetas ativadas com o DENV-2, ou trombina, e monócitos *in vitro*. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem o acúmulo de CXCL8/IL-8 em grânulos plaquetários e sua secreção mediante estímulo por trombina (Su et al. 1996; Jonnalagadda et al. 2012), a ativação plaquetária por DENV-2 ou trombina, no nosso estudo, não induziu a secreção deste mediador inflamatório após 18 h de estímulo. No entanto, observamos níveis aumentados de IL-8 quando plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina por 2 h foram expostas a monócitos por 18 h *in vitro*, sugerindo que durante a formação do agregado celular ocorre sinalização que leva à ativação de monócitos. Estes dados estão de acordo com um estudo do nosso grupo, no qual foi observado que monócitos obtidos de voluntários saudáveis quando expostos a plaquetas isoladas de pacientes com dengue secretam CXCL8/IL-8, bem como outros mediadores inflamatórios (Hottz et al. 2014).

A fim de confirmar a importância das plaquetas neste processo e excluir a possibilidade de que partículas virais, não aderidas a plaquetas, ou trombina suspensas no meio de cultura poderiam participar da resposta observada nos monócitos, demonstramos que quando estas células foram expostas às mesmas condições experimentais, porém na ausência de plaquetas, não foi detectada a secreção de IL-8 após 18 h. De fato, o conjunto de dados obtidos até o momento sugerem que plaquetas ativadas com DENV ou trombina expõem na sua superfície receptores que são reconhecidos por monócitos, levando não apenas à interação direta entre estas células mas também desencadeando sinalização específica que culmina na ativação dos monócitos, que, então, liberam IL-8.

As últimas descobertas apontam que durante a dengue grave há a ativação descontrolada de células do sistema imunológico, aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios e, conseqüentemente, disfunção endotelial desencadeada pelo vírus e por distintos mecanismos imunopatológicos (Costa et al. 2013). Diversos estudos mostraram níveis elevados de CXCL8/IL-8 em amostras provenientes de pacientes com dengue, principalmente em pacientes com a forma grave da doença (Raghupathy et al. 1998; Juffrie et

al. 2000; Bozza et al. 2008; Pandey et al. 2015). Adicionalmente, esta citocina mostrou-se diretamente associada à trombocitopenia observada durante a infecção (Bozza et al. 2008) e, portanto, é possível que os níveis de CXCL8/IL-8 possam ser utilizados como preditor da dengue grave (Pandey et al. 2015). Acreditamos que a formação do agregado plaqueta-monócito contribua para a secreção aumentada de mediadores inflamatórios observada durante a dengue e, conseqüentemente, para a patogênese da doença.

Outros mediadores inflamatórios são liberados durante a infecção pelo DENV, incluindo CXCL4/PF4 (Srichaikul et al. 1989) e CCL5/RANTES (Rathakrishnan et al. 2012; Hottz et al. 2013a). Ambas citocinas são estocadas em α -grânulos plaquetários e, por este motivo, é de se esperar que as plaquetas contribuam para o aumento da secreção de mediadores inflamatórios observado durante a dengue. Dessa forma, resolvemos investigar a participação do agregado plaqueta-monócito na secreção de CXCL4/PF4 e CCL5/RANTES. Nossos dados demonstraram que plaquetas ativadas por trombina são capazes de secretar ambas citocinas. De forma interessante, quando as plaquetas eram incubadas com os monócitos observamos uma potenciação nessa secreção. Não observamos diferença estatística no caso de plaquetas ativadas com o DENV-2, sendo necessário o aumento de amostras experimentais independentes. Por fim, constatamos que a ativação celular ocorre de forma recíproca, ou seja, plaquetas ativadas sinalizam para desencadear respostas funcionais nos monócitos e estes, por sua vez, ao serem ativados medeiam uma maior ativação daquelas.

Estudos recentes demonstraram que plaquetas ativadas por diferentes estímulos sinalizam para a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos (Badrnya et al. 2013; Feng et al. 2014). Assim, resolvemos avaliar este processo no nosso modelo de interação entre plaquetas ativadas, com o DENV-2 ou trombina, e monócitos *in vitro*. Através de diferentes técnicas, constatamos um aumento em número e tamanho dos corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina, quando comparados com os controles. Além disso, demonstramos que o C75 – inibidor da enzima ácido graxo sintase que mostrou-se eficaz na redução da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida durante a infecção pelo DENV em distintos tipos celulares, bem como na replicação viral – promoveu uma redução na formação destas organelas em monócitos pré-tratados e expostos a plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina. Esses dados sugerem que plaquetas ativadas com o DENV-2 sinalizam para diferentes respostas fenotípicas nos monócitos, incluindo a biogênese de corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente da enzima ácido graxo sintase.

Recentemente, foi demonstrado pelo nosso grupo que plaquetas ativadas com o DENV-2 *in vitro* ou isoladas de pacientes com dengue exibem sinais clássicos da via

intrínseca de apoptose, incluindo o aumento na exposição de fosfatidilserina na superfície celular, dentre outros (Hottz et al. 2013b). Além das suas atividades imunomodulatórias, o reconhecimento de fosfatidilserina é considerado o principal sinal para a fagocitose de células apoptóticas. Dados na literatura mostraram que plaquetas ativadas por distintos estímulos podem ser internalizadas por monócitos (Badrnya et al. 2013; Hottz et al. 2014). Dessa forma, não podemos excluir o fato de que plaquetas ativadas pelo DENV-2 *in vitro* possam ser fagocitadas por monócitos e, assim, desencadear vias de sinalização que contribuam para o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos observado nos monócitos. Porém, estudos adicionais são necessários para validar esta hipótese.

O aumento na síntese de eicosanóides – família de lipídios derivados do ácido araquidônico e que controlam processos celulares importantes como apoptose, proliferação, metabolismo e migração celular – derivados da 5-LO e COX (LTC₄, LTB₄ e PGE₂) foi extensivamente associado à formação aumentada de corpúsculos lipídicos, tanto *in vitro* (Bozza et al. 1996a, 1996b, 1997, 1998; Bartemes et al. 1999; Pacheco et al. 2007) quanto *in vivo* (Pacheco et al. 2002; Silva et al. 2002; de Assis et al. 2003; Melo et al. 2003; Vieira-De-Abreu et al. 2005; Maya-Monteiro et al. 2008). Porém, esta relação em associação com a detecção de enzimas formadoras de eicosanóides nos corpúsculos lipídicos não eram suficientes para afirmar que estes mediadores lipídicos poderiam ser sintetizados nestas organelas durante processos inflamatórios ou infecciosos. Desta forma, através da imobilização de eicosanóides recém-formados *in situ*, nosso grupo confirmou que os corpúsculos lipídicos atuam como sítios intracelulares de produção de LTC₄, LTB₄ e PGE₂ em leucócitos ativados (Bandeira-Melo et al. 2001b; Vieira-De-Abreu et al. 2005; D’Avila et al. 2006; Pacheco et al. 2007; Accioly et al. 2008; Silva et al. 2009); apontando para um importante papel desempenhado por essas organelas no estabelecimento de um ambiente inflamatório (Bozza et al. 2009, 2011; Bozza e Viola 2010).

Dixon e colaboradores (2006) demonstraram que a interação de plaquetas ativadas, por trombina, com monócitos sinalizam tanto para o aumento da expressão de COX-2 quanto para a secreção de PGE₂. De forma interessante, nosso estudo revelou que o DENV-2, de maneira semelhante à trombina, modula positivamente a expressão desta enzima, bem como a secreção deste eicosanóide por monócitos. Adicionalmente, o C75 reduziu a secreção de PGE₂ por monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2, sugerindo um envolvimento dos corpúsculos lipídicos neste processo. Além disso, o papel exercido pelo C75 pareceu ser específico, uma vez que esta droga não modulou a secreção de IL-8 por monócitos incubados com plaquetas ativadas. Todavia, estudos são necessários para investigar se a COX-2 e um dos seus produtos finais (PGE₂) encontram-se localizados nestas estruturas dinâmicas, já que

ambos foram modulados em monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2, cuja biogênese de corpúsculos lipídicos encontra-se aumentada.

Em busca dos mecanismos envolvidos na sinalização que culmina na biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas com DENV-2 ou trombina, investigamos se a participação das plaquetas, era, de fato, importante neste processo. Constatamos que monócitos expostos às mesmas condições experimentais, entretanto na ausência de plaquetas, não acumularam corpúsculos lipídicos, mostrando que, a princípio, este efeito observado não se dava devido à presença de resquícios de partículas virais, não aderidas a plaquetas, ou trombina suspensas no meio de cultura. Esses dados implicam não apenas que plaquetas ativadas em si possam estar diretamente envolvidas neste processo, mas também que estas células possam secretar algum fator específico que poderia desencadear a gênese de corpúsculos lipídicos.

Uma vez que plaquetas mediante estímulo secretam MIF (Strüßmann et al. 2013; Wirtz et al. 2015) e que nossos estudos sugerem que esta citocina pode induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos; resolvemos avaliar se o MIF estaria envolvido na ativação destas células durante a formação do agregado plaqueta-monócito *in vitro*. Primeiramente, observamos que plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina secretaram MIF após 1,5 h de incubação, sendo este efeito mantido até, pelo menos, 18 h. Em seguida, constatamos que o pré-tratamento de plaquetas ativadas com o inibidor do MIF, ISO-1, promoveu uma redução na biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos, após 18 h de interação. Desta forma, acreditamos que o MIF, secretado por plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina, participe da sinalização que culmina na ativação de monócitos no agregado celular, em especial ao que diz respeito à formação de corpúsculos lipídicos.

Contudo, ao avaliarmos o efeito do sobrenadante de plaquetas ativadas por 2 h, que contém quantidades consideráveis de MIF, sobre a gênese de corpúsculos lipídicos em monócitos, tivemos uma resposta não esperada. De forma surpreendente, os monócitos incubados com o sobrenadante proveniente de plaquetas ativadas com o DENV-2 não tiveram a formação dessas organelas modulada. Assim, realizamos um outro teste para comprovar se o MIF presente neste sobrenadante era mesmo funcional. Através de ensaio em Transwell, observamos que o mesmo sobrenadante, proveniente de plaquetas ativadas, foi capaz de induzir permeabilidade em monocamadas de células endoteliais, sendo este aumento bloqueado na presença do ISO-1. De modo interessante, esses resultados indicam que o MIF, presente no sobrenadante de plaquetas ativadas, é funcional, podendo, portanto, ativar o endotélio e contribuir para o aumento da permeabilidade vascular durante a infecção pelo

DENV; entretanto, não é capaz de promover a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos.

Vários estudos demonstraram que citocinas e quimiocinas, incluindo o MIF, ativam vias de sinalização intracelular que culminam na biogênese de corpúsculos lipídicos (Bozza et al. 1998; Bandeira-Melo et al. 2001a, 2001b, 2002a, 2002b; Vieira-de-Abreu et al. 2011). Embora tenhamos quantificado apenas o MIF no sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV-2 ou trombina em tempos precoces, é possível, ainda, que outros potenciais indutores da formação destas organelas estejam presentes, como CCL5/RANTES e CXCL4/PF4, por exemplo. Todavia, a concentração do MIF, ou de outras citocinas, presente neste sobrenadante não foi suficiente para promover a biogênese de corpúsculos lipídicos.

Dados na literatura demonstraram que a quimiocina CXCL4/PF4 é capaz de induzir mudanças fenotípicas em macrófagos, resultando no aumento do potencial aterogênico por torná-los mais suscetíveis a diferenciação em células espumosas (Sachais et al. 2007; Gleissner 2012). De forma interessante, quando plaquetas foram ativadas por OxLDL houve uma intensa secreção desta quimiocina, porém o sobrenadante destas células falhou em induzir o aumento da incorporação de OxLDL por monócitos. Entretanto, anticorpos neutralizantes de CXCL4/PF4 reduziram os efeitos mediados por plaquetas nos monócitos (Badrnya et al. 2013). Esses dados corroboram os efeitos observados pelo MIF neste estudo, sugerindo que estes mediadores possam ser depositados na superfície dos monócitos e atuem apenas localmente, o que implica na importância do contato entre plaquetas e monócitos.

De fato, uma vez que nossos dados demonstraram que a participação de plaquetas é importante para desencadear a sinalização que culmina no aumento tanto da formação de corpúsculos lipídicos quanto na secreção de CXCL8/IL-8 por monócitos, no nosso modelo experimental que envolve a formação de agregados plaqueta-monócito *in vitro*, acreditamos que além do possível envolvimento de mediadores inflamatórios, como o MIF, um outro sinal seja crucial, incluindo a própria adesão direta entre essas células. Dentro deste contexto, nossos estudos indicaram que a biogênese de corpúsculos lipídicos foi maior nos agregados formados com plaquetas ativadas com DENV-2 ou trombina. Além disso, parece que o conteúdo lipídico de plaquetas ativadas não esteja contribuindo para este aumento observado, visto que o DENV-2 ou a trombina falharam em induzir a formação de corpúsculos lipídicos nestas células. Por este motivo, esses dados apontam que a interação direta com plaquetas ativadas seja importante para que os monócitos respondam com funções específicas, incluindo a biogênese de corpúsculos lipídicos e a secreção de mediadores inflamatórios. No entanto, estudos adicionais que incluem o bloqueio da ligação entre estas células, como o uso de

anticorpos neutralizantes da P-selectina e fosfatidilserina, são necessários para confirmar esta hipótese.

Os resultados obtidos nesta pesquisa e as hipóteses estão ilustrados nas figuras 5.1 e 5.2. Em resumo, observamos, na primeira parte do estudo (figura 5.1), que o DENV é capaz de promover a biogênese dos corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente tanto da integridade viral, quanto de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, uma vez que a inativação viral por aquecimento e o uso de drogas que inibem as enzimas ácido graxo sintase e acil-CoA sintetase interferem na formação destas organelas induzida pelo DENV. De forma interessante, a inibição destas enzimas também promove um bloqueio na replicação do DENV, sugerindo um papel dos corpúsculos lipídicos neste processo. Além disso, constatamos que o DENV é capaz de modular a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios, de forma independente do MIF secretado durante a infecção. Assim, o esclarecimento desses eventos parece ser crucial para desvendar o papel do DENV sobre diferentes etapas do metabolismo celular e determinante para estabelecer estratégias terapêuticas adequadas para controlar a resposta do hospedeiro frente à infecção.

Na segunda parte deste estudo (figura 5.2), na tentativa de associar a ativação plaquetária com mecanismos inflamatórios na dengue, demonstramos, primeiramente, que plaquetas ativadas com o DENV *in vitro* rapidamente formam agregados com monócitos. Este evento mostrou-se relevante na ativação destas células, já que foi detectado um aumento na expressão de COX-2 bem como na secreção de mediadores inflamatórios, incluindo PGE₂ e CXCL8/IL-8. De forma recíproca, observamos que os monócitos contribuem para uma maior ativação das plaquetas, que então secretam níveis elevados de CCL5/RANTES e CXCL4/PF4. Adicionalmente, plaquetas ativadas com o DENV *in vitro* são capazes de promover a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos, de uma maneira dependente da enzima ácido graxo sintase. Ao utilizarmos o inibidor desta enzima, observamos também uma redução nos níveis de PGE₂, mas não de CXCL8/IL-8, sugerindo um papel destas organelas dinâmicas na produção deste mediador lipídico. O MIF, secretado durante a ativação de plaquetas pelo DENV, também está envolvido na sinalização que culmina na formação de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas. Entretanto, de forma surpreendente, o sobrenadante de plaquetas ativadas com o DENV, que contém MIF funcional, falhou em induzir a biogênese destas inclusões citoplasmáticas em monócitos, sugerindo que a presença das plaquetas, neste modelo, seja necessária. De fato, a interação direta com plaquetas ativadas mostrou-se crucial para que os monócitos respondam funcionalmente, incluindo a secreção de mediadores inflamatórios e o aumento da formação de corpúsculos lipídicos. Este último evento ainda mostrou ser maior nos agregados formados

com plaquetas ativadas com o DENV, corroborando esta hipótese. Assim, esses dados fortemente sugerem que a interação direta com plaquetas ativadas seja crucial para que monócitos respondam com funções específicas e contribuam para a patogênese da dengue. Portanto, o conjunto dos resultados obtidos nos revela que a própria modulação dos corpúsculos lipídicos possa representar um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dengue.

Nossas perspectivas visam caracterizar os efeitos da infecção sobre os mecanismos que regulam a biogênese dos corpúsculos lipídicos, incluindo o estudo da ativação de enzimas envolvidas na síntese e degradação lipídica, e sua função na produção e secreção de mediadores inflamatórios. Além disso, pretendemos investigar quais os receptores estão envolvidos na sinalização que culmina na formação destas organelas em monócitos expostos a plaquetas ativadas, bem como se estes corpúsculos lipídicos atuam como sítios de localização de enzimas envolvidas na síntese de eicosanóides e do seu próprio produto. Por fim, iremos estudar se as plaquetas ativadas com o DENV promovem a infecção de monócitos durante a formação do agregado celular.

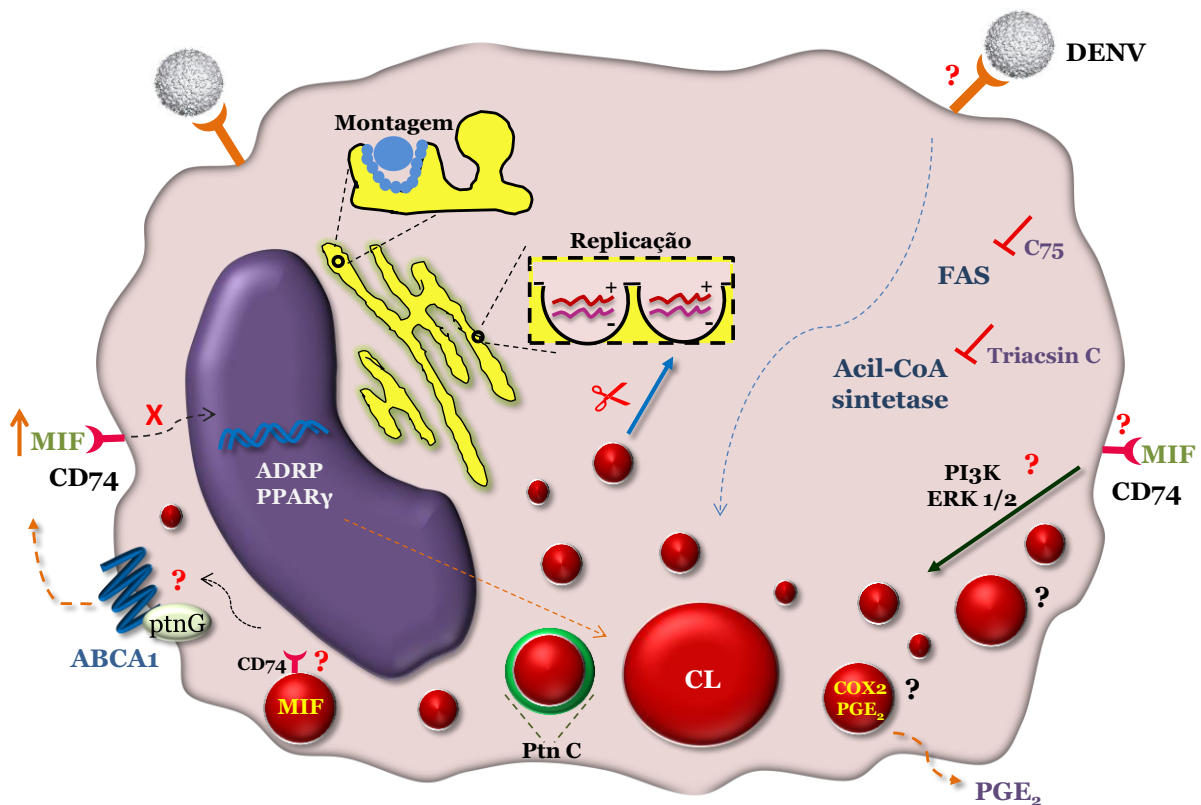


Figura 5.1 Modelo proposto para a biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus dengue. O DENV induz a biogênese dos corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente tanto da integridade viral, quanto das enzimas ácido graxo sintase e acil-CoA sintetase. O uso de drogas inibidoras destas enzimas, além de reduzir a formação destas organelas, também promove um bloqueio na replicação do DENV, sugerindo um papel dos corpúsculos lipídicos neste processo. Além disso, constatamos que o DENV é capaz de modular a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios, de forma independente do MIF secretado durante a infecção. Este mediador inflamatório é capaz de promover a formação de corpúsculos lipídicos, entretanto os mecanismos envolvidos ainda precisam ser estudados. Durante a infecção, o MIF encontra-se estocado nos corpúsculos lipídicos, porém os mecanismos que promovem a sua secreção e/ou suas funções intrácrinas a partir destas organelas ainda precisam ser investigados. A proteína do capsídeo (C) viral encontra-se localizada nos corpúsculos lipídicos e é possível que a redução da formação destas estruturas promova o acúmulo desta proteína viral no citoplasma da célula hospedeira e, portanto, a mesma pode interagir prematuramente com o RNA viral, interferindo na amplificação do genoma. Por outro lado, a redução da formação dos corpúsculos lipídicos também pode afetar a montagem do vírus, já que inicialmente durante a infecção, a proteína C possa estar armazenada nestas organelas para em seguida ser mobilizada à membrana do RE, onde a morfogênese da partícula viral tem início. O DENV é capaz de promover um aumento na geração de PGE₂, entretanto estudos adicionais são necessários para analisar se este mediador lipídico é produzido e secretado a partir dos corpúsculos lipídicos induzidos durante a infecção.

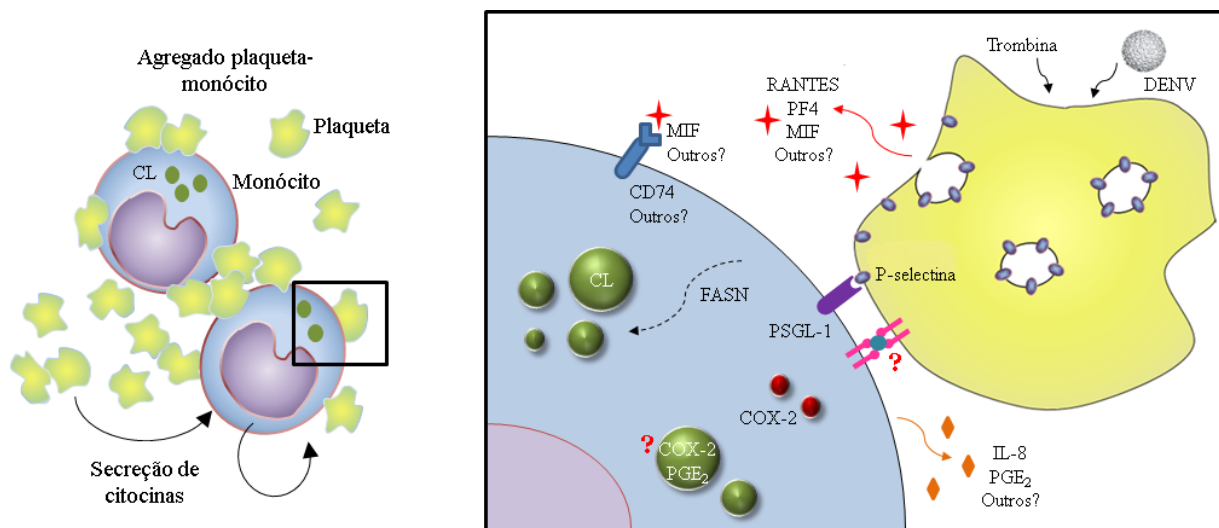


Figura 5.2 Modelo proposto para explicar o papel de plaquetas estimuladas com o DENV sobre a ativação dos monócitos, durante a formação dos agregados plaqueta-monócito. Plaquetas ativadas com o DENV-2 *in vitro* rapidamente formam agregados com monócitos. Os receptores que medeiam esta interação ainda precisam ser investigados. Durante a formação do agregado celular, os monócitos tornam-se ativados e aumentam a expressão de COX-2, bem como secretam mediadores inflamatórios, incluindo PGE₂ e CXCL8/IL-8. De forma recíproca, estas células contribuem para uma maior ativação das plaquetas, que então secretam níveis elevados de CCL5/RANTES e CXCL4/PF4. Plaquetas ativadas com o DENV *in vitro* promovem a biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos, de uma maneira dependente da enzima ácido graxo sintase. Ao utilizarmos o inibidor desta enzima, observamos uma redução nos níveis de PGE₂, mas não de CXCL8/IL-8, sugerindo um papel destas organelas citoplasmáticas na produção deste mediador lipídico. Entretanto, estudos adicionais são necessários para investigar se tanto a COX-2 quanto a PGE₂ estão presentes nos corpúsculos lipídicos. O MIF, secretado durante a ativação plaquetária, também está envolvido na sinalização que culmina na formação destas organelas citoplasmáticas em monócitos expostos a plaquetas ativadas. É possível que outros mediadores inflamatórios, secretados por plaquetas ativadas, estejam envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos, porém estudos são necessários para avaliar esta hipótese. Ainda observamos que a formação destas organelas é maior nos agregados formados com plaquetas ativadas com o DENV. De fato, a interação com plaquetas ativadas mostrou-se crucial para que os monócitos respondam funcionalmente, incluindo tanto a secreção de mediadores inflamatórios, quanto o aumento da formação de corpúsculos lipídicos.

6 Conclusões

- ✓ A infecção pelo vírus dengue promove a biogênese de corpúsculos lipídicos em diferentes tipos celulares *in vitro*, de forma dependente da integridade viral;
- ✓ O vírus dengue é capaz de modular a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios, como PPAR- γ e ADRP, de forma independente do MIF secretado durante a infecção;
- ✓ Drogas que interferem no metabolismo de lipídios foram capazes de reduzir a formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção *in vitro*, bem como afetar a capacidade replicativa do vírus dengue. Estes resultados propõem que enzimas envolvidas na síntese de lipídios participam na gênese dessas organelas induzida durante a infecção e, ainda, que os corpúsculos lipídicos podem ter um papel na replicação viral;
- ✓ A formação de agregados plaqueta-monócito modula respostas de ativação celular, que culmina no aumento da expressão de COX-2, da secreção dos mediadores inflamatórios CXCL8/IL-8 e PGE₂, bem como da biogênese de corpúsculos lipídicos em monócitos. De forma recíproca, estes contribuem para uma maior ativação das plaquetas, que então secretam níveis elevados de CCL5/RANTES e CXCL4/PF4.
- ✓ A enzima ácido graxo sintase está envolvida na sinalização que culmina na formação de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas. Além disso, a inibição desta enzima promove uma redução nos níveis de PGE₂, mas não de CXCL8/IL-8, sugerindo um papel destas inclusões citoplasmáticas na síntese e secreção deste mediador lipídico;
- ✓ O MIF, secretado durante a ativação de plaquetas pelo vírus dengue ou trombina, também participa da sinalização que promove a gênese de corpúsculos lipídicos em monócitos expostos a plaquetas ativadas. No entanto, o sobrenadante contendo MIF funcional não é capaz de levar à formação destas organelas, sugerindo que seja necessário um sinal adicional para que este evento ocorra;
- ✓ A participação de plaquetas ativadas é indispensável para que monócitos respondam funcionalmente, incluindo a secreção de mediadores inflamatórios e o aumento do biogênese de corpúsculos lipídicos. Este último evento, por sua vez, mostrou ser ainda maior nos

agregados formados com plaquetas ativadas, corroborando esta hipótese e mostrando a importância da interação direta entre essas células.

7 Referências bibliográficas

- Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, et al. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(6):1732–40.
- Acioli-Santos B, Segat L, Dhaliá R, Brito CAA, Braga-Neto UM, Marques ETA, et al. MBL2 Gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum Immunol.* fevereiro de 2008;69(2):122–8.
- Ackerman WE, Robinson JM, Kniss DA. Despite transcriptional and functional coordination, cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 largely reside in distinct lipid microdomains in WISH epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* novembro de 2005;53(11):1391–401.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol.* outubro de 2009;11(10):1533–49.
- Alagarasu K, Damle IM, Bachal R V, Mulay AP, Shah PS, Dayaraj C. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. *Infect Genet Evol.* julho de 2013a;17:239–42.
- Alagarasu K, Mulay AP, Singh R, Gavade VB, Shah PS, Cecilia D. Association of HLA-DRB1 and TNF genotypes with dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* maio de 2013b;74(5):610–7.
- Almeida PE, Carneiro AB, Silva AR, Bozza PT. PPAR γ Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR Res.* janeiro de 2012;2012:383829.
- Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Töröcsik D, D’Avila H, Dezsö B, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol.* 15 de julho de 2009;183(2):1337–45.
- Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez 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. *Am J Trop Med Hyg.* dezembro de 2006;75(6):1113–7.
- Anders KL, Nguyet NM, Chau NVV, Hung NT, Thuy TT, Lien LB, et al. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* janeiro de 2011;84(1):127–34.
- Appanna R, Ponnampalavanar S, Lum Chai See L, Sekaran SD. Susceptible and Protective HLA Class 1 Alleles against Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Patients in a Malaysian Population. Schneider BS, organizador. *PLoS One.* 28 de setembro de 2010;5(9):e13029.

- Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* março de 2008;4(3):e1000035.
- De Araújo JMG, Schatzmayr HG, de Filippis AMB, dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods.* 2009;155(1):34–8.
- Arend A, Masso R, Masso M, Selstam G. Electron microscope immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in pseudopregnant rat corpus luteum during luteolysis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* outubro de 2004;74(1-4):1–10.
- Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J.* janeiro de 2011;8:161.
- Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KWA, Nestel FP, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood.* 15 de janeiro de 2006;107(2):637–41.
- Assinger A. Platelets and Infection – An Emerging Role of Platelets in Viral Infection. *Front Immunol.* 2014;5(December):10–2.
- De Assis EF, Silva AR, Caiado LFC, Marathe GK, Zimmerman GA, Prescott SM, et al. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol.* 15 de agosto de 2003;171(4):2090–8.
- Assunção-Miranda I, Amaral F a, Bozza F a, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J.* 2010;24(1):218–28.
- 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. *J Infect Dis.* 15 de abril de 2006;193(8):1078–88.
- De Azeredo EL, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM. Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:313842.
- Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SRNI, Torrentes-Carvalho A, Zagne S-MO, et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology.* junho de 2010;130(2):202–16.
- Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw K, Volf I, Schabbauer G, et al. Platelets Mediate Oxidized Low-Density Lipoprotein– Induced Monocyte Extravasation and Foam Cell Formation. 2013;571–80.
- Bailey CC, Zhong G, Huang I-C, Farzan M. IFITM-Family Proteins: The Cell’s First Line of Antiviral Defense. *Annu Rev Virol.* 1 de novembro de 2014;1:261–83.

- Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog.* fevereiro de 2010;6(2):e1000790.
- Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol.* 2002a;109(3):393–400.
- Bandeira-Melo C, Herbst A, Weller PF. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* junho de 2001a;24(6):653–7.
- Bandeira-Melo C, Phoofolo M, Weller PF. Extranuclear Lipid Bodies, Elicited by CCR3-mediated Signaling Pathways, Are the Sites of Chemokine-enhanced Leukotriene C4 Production in Eosinophils and Basophils. *J Biol Chem.* 2001b;276(25):22779–87.
- Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Phoofolo M, Center DM, Cruikshank WW, et al. IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J Immunol.* 1 de maio de 2002b;168(9):4756–63.
- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(4):1200–5.
- Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg.* maio de 1974;23(3):495–506.
- Bartemes KR, McKinney S, Gleich GJ, Kita H. Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG. *J Immunol.* 1999;162(5):2982–9.
- Bartz R, Li W-H, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, et al. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res.* abril de 2007;48(4):837–47.
- Beil WJ, Weller PF, Peppercorn M a, Galli SJ, Dvorak a M. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease. *J Leukoc Biol.* 1995;58(3):284–98.
- Benga WJA, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology.* janeiro de 2010;51(1):43–53.
- Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007;13(5):587–96.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* Nature Publishing Group; 2013;496(7446):504–7.
- Bhoopat L, Bhamarapravati N, Attasiri C, Yoksarn S, Chaiwun B, Khunamornpong S, et al. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with

- dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pac J Allergy Immunol.* dezembro de 1996;14(2):107–13.
- Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneetrithep B, Marovich MA. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* fevereiro de 2011;85(4):1671–83.
- Boonpucknavig S, Boonpucknavig V, Bhamarapavati N, Nimmannitya S. Immunofluorescence study of skin rash in patients with dengue hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med.* agosto de 1979;103(9):463–6.
- Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, et al. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol.* novembro de 2007;9(11):1286–93.
- Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratnier M, Targett-Adams P, Lavergne JP, et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem.* 2006;281(31):22236–47.
- Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol.* 2007;88(8):2204–13.
- Bozza F a, Cruz OG, Zagne SMO, Azeredo EL, Nogueira RMR, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8:86.
- Bozza F a, Gomes RN, Japiass?? AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Levels Correlate With Fatal Outcome in Sepsis. *Shock.* 2004;22(4):309–13.
- Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier R a., Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* Elsevier; 2011;85(5):205–13.
- Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(SUPPL. 1):113–20.
- Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* Elsevier B.V.; 2009;1791(6):540–51.
- Bozza PT, Melo RCN, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 2007;113(1):30–49.
- Bozza PT, Pacheco P, Yu W, Weller PF. NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;67(4):237–44.
- Bozza PT, Payne JL, Goulet JL, Weller PF. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med.* 1996a;183(4):1515–25.

- Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996b;93(20):11091–6.
- Bozza PT, Viola JPB. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids*. 2010;82(4-6):243–50.
- Bozza PT, Yu W, Cassara J, Weller PF. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol*. 1998;64(4):563–9.
- Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak a M, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med*. 1997;186(6):909–20.
- Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res*. 1997;38(11):2249–63.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 5 de novembro de 2004;279(45):46835–42.
- Brass AL, Huang I-C, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*. 24 de dezembro de 2009;139(7):1243–54.
- Brass V, Bieck E, Montserret R, Wölk B, Hellings JA, Blum HE, et al. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8130–9.
- Brown D a. Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol*. 2001;11(11):446–9.
- Bulankina A V, Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, et al. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol*. 18 de maio de 2009;185(4):641–55.
- Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):791–800.
- Camus G, Herker E, Modi AA, Haas JT, Ramage HR, Farese R V, et al. Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J Biol Chem*. 5 de abril de 2013;288(14):9915–23.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. *Rev Microbiol*. 1990;44:649–88.
- Chan KWK, Watanabe S, Kavishna R, Alonso S, Vasudevan SG. Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. Elsevier B.V.; 2015;123:5–14.

- Chan YK, Huang I-C, Farzan M. IFITM proteins restrict antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *PLoS One*. janeiro de 2012;7(3):e34508.
- Chao D-Y, Lin T-H, Hwang K-P, Huang J-H, Liu C-C, King C-C. 1998 dengue hemorrhagic fever epidemic in Taiwan. *Emerg Infect Dis*. março de 2004;10(3):552–4.
- Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol*. 2007;88(2):365–75.
- Chatel-Chaix L, Bartenschlager R. Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: the enemy inside-caught in the web. *J Virol*. 2014;88(11):5907–11.
- Chatterjee M, Borst O, Walker B, Fotinos A, Vogel S, Seizer P, et al. Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling. *Circ Res*. 7 de novembro de 2014;115(11):939–49.
- Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: Implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47(2):155–66.
- Chen J, Ng MM-L, Chu JJH. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog*. julho de 2015;11(7):e1005053.
- Chen J-S, Greenberg AS, Wang S-M. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem*. janeiro de 2002;86(4):784–91.
- Chen L-C, Lei H-Y, Liu C-C, Shiesh S-C, Chen S-H, Liu H-S, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(1):142–7.
- Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, et al. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(1):43–50.
- Chen R-F, Yang KD, Wang L, Liu J-W, Chiu C-C, Cheng J-T. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. novembro de 2007;101(11):1106–13.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*. agosto de 1997;3(8):866–71.
- Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol*. 1999;73(4):2650–7.
- Chiu H-C, Hannemann H, Heesom KJ, Matthews DA, Davidson AD. High-throughput quantitative proteomic analysis of dengue virus type 2 infected A549 cells. *PLoS One*. janeiro de 2014;9(3):e93305.

- Chuang Y-C, Lei H-Y, Liu H-S, Lin Y-S, Fu T-F, Yeh T-M. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. *Cytokine*. maio de 2011;54(2):222–31.
- Church TS, Willis MS, Priest EL, Lamonte MJ, Earnest CP, Wilkinson WJ, et al. Obesity, macrophage migration inhibitory factor, and weight loss. *Int J Obes (Lond)*. junho de 2005;29(6):675–81.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 2006;80(23):11418–31.
- Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. *J Virol*. 20 de dezembro de 2004;79(2):853–9.
- Conceição TM, El-Bacha T, Villas-Bôas CS a, Coello G, Ramírez J, Montero-Lomeli M, et al. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect*. 2010a;60(1):65–75.
- Conceição TM, Da Poian AT, Sorgine MHF. A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *J Virol Methods*. 2010b;163(1):1–9.
- Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection. *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 2013;182(6):1950–61.
- Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceicao TM, Higa LM, Castanho M a. RB, Da Poian a. T. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;39(2):155–70.
- Cun W, Jiang J, Luo G. The C-terminal alpha-helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus. *J Virol*. novembro de 2010;84(21):11532–41.
- D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(10):1308–15.
- D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol*. 2006;176(5):3087–97.
- Dandona P, Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Tripathy C, Hofmeyer D, et al. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J Clin Endocrinol Metab*. outubro de 2004;89(10):5043–7.
- Daniel J, Maamar H, Deb C, Sirakova TD, Kolattukudy PE. *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog*. junho de 2011;7(6):e1002093.

- Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*. agosto de 2014;462-463:166–74.
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 7 de maio de 2010;328(5979):745–8.
- Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 12 de agosto de 2005;122(3):379–91.
- Diamond MS, Pierson TC. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*. Elsevier; 2015;162(3):488–92.
- Dixon DA, Tolley ND, Bemis-Standoli K, Martinez ML, Weyrich AS, Morrow JD, et al. Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J Clin Invest*. outubro de 2006;116(10):2727–38.
- Douradinha B, McBurney SP, Soares de Melo KM, Smith AP, Krishna NK, Barratt-Boyes SM, et al. C1q binding to dengue virus decreases levels of infection and inflammatory molecules transcription in THP-1 cells. *Virus Res*. 22 de janeiro de 2014;179:231–4.
- Dung NTP, Duyen HT Le, Thuy NT Van, Ngoc T Van, Chau NVV, Hien TT, et al. Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue. *J Immunol*. 15 de junho de 2010;184(12):7281–7.
- Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 5 de julho de 2008;376(2):429–35.
- Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, Shulman ES, MacGlashan DW, Pyne K, et al. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol*. dezembro de 1983;131(6):2965–76.
- Dvorak AM, Morgan ES, Weller PF. Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor to lipid bodies and secretory granules in human mast cells. *Histochem J*. 2001;33(7):397–402.
- Ed Rainger G, Chimen M, Harrison MJ, Yates CM, Harrison P, Watson SP, et al. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*. janeiro de 2015;26(6):507–20.
- Faustino AF, Carvalho FA, Martins IC, Castanho MARB, Mohana-Borges R, Almeida FCL, et al. Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins. *Nanomedicine*. janeiro de 2014;10(1):247–55.
- Faustino AF, Guerra GM, Huber RG, Hollmann A, Domingues MM, Barbosa GM, et al. Understanding dengue virus capsid protein disordered N-Terminus and pep14-23-based inhibition. *ACS Chem Biol*. 20 de fevereiro de 2015a;10(2):517–26.

- Faustino AF, Martins IC, Carvalho FA, Castanho MARB, Maurer-Stroh S, Santos NC. Understanding Dengue Virus Capsid Protein Interaction with Key Biological Targets. *Sci Rep.* janeiro de 2015b;5:10592.
- Feng Y, Dorhoi a., Mollenkopf H-J, Yin H, Dong Z, Mao L, et al. Platelets Direct Monocyte Differentiation Into Epithelioid-Like Multinucleated Giant Foam Cells With Suppressive Capacity Upon Mycobacterial Stimulation. *J Infect Dis.* 2014;210(11):1700–10.
- Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe.* Elsevier Inc.; 2009;5(4):318–28.
- Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens.* outubro de 2004;64(4):469–72.
- Figueiredo MAA, Rodrigues LC, Barreto ML, Lima JWO, Costa MCN, Morato V, et al. Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: results of a case control study. *PLoS Negl Trop Dis.* janeiro de 2010;4(6):e699.
- Filipe A, McLauchlan J. Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche. *Trends Mol Med.* Elsevier Ltd; 2015;21(1):34–42.
- Fink J, Gu F, Vasudevan SG. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol.* 2006;16(4):263–75.
- Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol.* junho de 2006;4(6):445–57.
- Freire JM, Veiga AS, Conceição TM, Kowalczyk W, Mohana-Borges R, Andreu D, et al. Intracellular nucleic acid delivery by the supercharged dengue virus capsid protein. *PLoS One.* janeiro de 2013;8(12):e81450.
- Freire JM, Veiga AS, Rego de Figueiredo I, de la Torre BG, Santos NC, Andreu D, et al. Nucleic acid delivery by cell penetrating peptides derived from dengue virus capsid protein: design and mechanism of action. *FEBS J.* janeiro de 2014;281(1):191–215.
- Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, et al. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2004;1644(1):47–59.
- Fujimoto Y, Onoduka J, Homma KJ, Yamaguchi S, Mori M, Higashi Y, et al. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(11):2174–80.
- García-Mediavilla MV, Pisonero-Vaquero S, Lima-Cabello E, Benedicto I, Majano PL, Jorquera F, et al. Liver X receptor α -mediated regulation of lipogenesis by core and NS5A proteins contributes to HCV-induced liver steatosis and HCV replication. *Lab Invest.* agosto de 2012;92(8):1191–202.

- Ghosh K, Gangodkar S, Jain P, Shetty S, Ramjee S, Poddar P, et al. Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*. junho de 2008;57(3):113–8.
- Gleissner CA. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol*. janeiro de 2012;3:1.
- Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev. Elsevier B.V.*; 2015;29(3):153–62.
- Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai C-J. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de maio de 2007;104(22):9422–7.
- Gould E, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 2008;371(9611):500–9.
- Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(5):429–36.
- Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol*. 1999;59(3):329–34.
- Grief C, Galler R, Côrtes LM, Barth OM. Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation. *Arch Virol*. janeiro de 1997;142(12):2347–57.
- Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol*. 2011;195(7):1071–82.
- Guabiraba R, Marques RE, Besnard A-G, Fagundes CT, Souza DG, Ryffel B, et al. Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLoS One*. janeiro de 2010;5(12):e15680.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998a;11(3):480–96.
- Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1998b;4(3):442–50.
- Guy B, Almond J, Lang J. Dengue vaccine prospects: a step forward. *Lancet (London, England)*. 29 de janeiro de 2011;377(9763):381–2.
- Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453–65.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(6):522–3.
- Guzmán MG, Kourí G. Dengue : an update. 2002;2(January):33–42.
- Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Susana V, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis*. 2002;6(2):118–24.

- Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*. dezembro de 2010;2(12):2649–62.
- Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. setembro de 2013;10(9):553–62.
- Halstead SB. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis*. outubro de 1979;140(4):527–33.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 29 de janeiro de 1988;239(4839):476–81.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370(9599):1644–52.
- Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol*. 2008;53:273–91.
- Halstead SB, Lan NT, Myint TT, Shwe TN, Nisalak A, Kalyanarooj S, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: Research opportunities ignored. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(12):1474–9.
- Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med*. 1977;146(1):201–17.
- Harris AF, Nimmo D, McKemey AR, Kelly N, Scaife S, Donnelly CA, et al. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol*. novembro de 2011;29(11):1034–7.
- Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn RJ, et al. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(40):17345–50.
- Heaton NS, Randall G. Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends Microbiol*. 2011;19(7):368–75.
- Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res*. 1998;294(2):309–21.
- Helbig KJ, Carr JM, Calvert JK, Wati S, Clarke JN, Eyre NS, et al. Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin. *PLoS Negl Trop Dis*. janeiro de 2013;7(4):e2178.
- Helbig KJ, Eyre NS, Yip E, Narayana S, Li K, Fiches G, et al. The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology*. novembro de 2011;54(5):1506–17.
- Henchal E a, Putnak JR. The Dengue Viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(4):376–96.
- Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, et al. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med*. novembro de 2010;16(11):1295–8.

- Herker E, Ott M. Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. *J Biol Chem.* 2012;287(4):2280–7.
- Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, Nelson MA, Herring BL, Hapel AJ, et al. Pharmacology & Therapeutics Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral , vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol Ther. Elsevier B.V.;* 2013;137(2):266–82.
- Hidari KIPJ, Suzuki T. Dengue virus receptor. *Trop Med Health.* 2011;39(4SUPPLEMENT):S37–43.
- Hinson ER, Cresswell P. The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 de dezembro de 2009;106(48):20452–7.
- Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta.* 10 de julho de 2005;1744(3):493–517.
- Hope RG, McLauchlan J. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol.* 2000;81(8):1913–25.
- Hope RG, Murphy DJ, McLauchlan J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem.* 8 de fevereiro de 2002;277(6):4261–70.
- Horstick O, Jaenisch T, Martinez E, Kroeger a., See LLC, Farrar J, et al. Comparing the Usefulness of the 1997 and 2009 WHO Dengue Case Classification: A Systematic Literature Review. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(3):621–34.
- Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood.* 14 de novembro de 2013a;122(20):3405–14.
- 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.* 15 de agosto de 2014;193(4):1864–72.
- Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost.* maio de 2013b;11(5):951–62.
- Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch.* março de 2001;438(2):107–15.
- Iglesias NG, Mondotte JA, Byk LA, De Maio FA, Samsa MM, Alvarez C, et al. Dengue Virus Uses a Non-Canonical Function of the Host GBF1-Arf-COPI System for Capsid Protein Accumulation on Lipid Droplets. *Traffic.* setembro de 2015;16(9):962–77.

- Ikeda D, Sakaue S, Kamigaki M, Ohira H, Itoh N, Ohtsuka Y, et al. Knockdown of macrophage migration inhibitory factor disrupts adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Endocrinology*. dezembro de 2008;149(12):6037–42.
- Iyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med. J.* 1995. p. 218–21.
- Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* setembro de 2006;7(9):631–43.
- Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanaroj S, Pulmanusahakul R, Ubol S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol.* agosto de 2009;53(8):442–50.
- Jeewandara C, Gomes L, Wickramasinghe N, Gutowska-Owsiak D, Waithe D, Paranavitane SA, et al. Platelet activating factor contributes to vascular leak in acute dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis.* fevereiro de 2015;9(2):e0003459.
- Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol.* 2004;149(5):915–27.
- Johnson MM, Vaughn B, Triggiani M, Swan DD, Fonteh AN, Chilton FH. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21(2):253–8.
- Jonnalagadda D, Izu LT, Whiteheart SW. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood.* 20 de dezembro de 2012;120(26):5209–16.
- Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun.* fevereiro de 2000;68(2):702–7.
- Junjhon J, Pennington JG, Edwards TJ, Perera R, Lanman J, Kuhn RJ. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *J Virol.* maio de 2014;88(9):4687–97.
- Kan CFK, Singh AB, Dong B, Shende VR, Liu J. PPAR δ activation induces hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 4 expression in vivo and in vitro. *Biochim Biophys Acta.* maio de 2015;1851(5):577–87.
- Kaplanski G, Porat R, Aiura K, Erban JK, Gelfand JA, Dinarello CA. Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin-8 in vitro via an interleukin-1-mediated event. *Blood.* 15 de maio de 1993;81(10):2492–5.
- Karshovska E, Weber C, von Hundelshausen P. Platelet chemokines in health and disease. *Thromb Haemost.* novembro de 2013;110(5):894–902.
- Khakpoor A, Panyasrivanit M, Wikan N, Smith DR. A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *J Gen Virol.* maio de 2009;90(Pt 5):1093–103.

- Kim KH, Hong SP, Kim K, Park MJ, Kim KJ, Cheong J. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 20 de abril de 2007;355(4):883–8.
- Kliks SC, Nisalak a, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40(4):444–51.
- Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ.* 1989;67(4):375–80.
- Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg.* dezembro de 2001;65(6):840–7.
- Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg.* abril de 2002;66(4):435–41.
- Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, Agaisse H, Murray JL, Hodge TW, et al. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J Virol.* maio de 2007;81(9):4881–5.
- Kumar Y, Liang C, Bo Z, Rajapakse JC, Ooi EE, Tannenbaum SR. Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF. *PLoS Negl Trop Dis.* janeiro de 2012;6(11):e1887.
- Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:71–92.
- LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruíz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, et al. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* novembro de 2002;63(11):1039–44.
- Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, et al. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell.* 20 de outubro de 1989;59(2):305–12.
- Lee Y-R, Lei H-Y, Liu M-T, Wang J-R, Chen S-H, Jiang-Shieh Y-F, et al. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology.* 10 de maio de 2008;374(2):240–8.
- Lee Y-R, Liu M-T, Lei H-Y, Liu C-C, Wu J-M, Tung Y-C, 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. *J Gen Virol.* dezembro de 2006;87(Pt 12):3623–30.
- Leitmeyer KC, de Chacon, Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Vaughn DW, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999;73(6):4738–47.

- Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*. 2003;197(11):1467–76.
- Libraty DH, Acosta LP, Tallo V, Segubre-Mercado E, Bautista A, Potts JA, et al. A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PLoS Med*. outubro de 2009;6(10):e1000171.
- Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002;186(8):1165–8.
- Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DT, Cruikshank WW, et al. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol*. 1 de abril de 1996;156(7):2566–70.
- Lima-Cabello E, García-Mediavilla MV, Miquilena-Colina ME, Vargas-Castrillón J, Lozano-Rodríguez T, Fernández-Bermejo M, et al. Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *Clin Sci (Lond)*. março de 2011;120(6):239–50.
- Lin C-C, Tsai P, Sun H-Y, Hsu M-C, Lee J-C, Wu I-C, et al. Apolipoprotein J, a glucose-upregulated molecular chaperone, stabilizes core and NS5A to promote infectious hepatitis C virus virion production. *J Hepatol*. novembro de 2014;61(5):984–93.
- Lin C-F, Chiu S-C, Hsiao Y-L, Wan S-W, Lei H-Y, Shiau A-L, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol*. 2005;174(1):395–403.
- Lin C-F, Lei H-Y, Shiau A-L, Liu C-C, Liu H-S, Yeh T-M, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol*. 14 de janeiro de 2003;69(1):82–90.
- Lin C-F, Lei H-Y, Shiau A-L, Liu H-S, Yeh T-M, Chen S-H, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol*. 15 de julho de 2002;169(2):657–64.
- Lin C-F, Wan S-W, Cheng H-J, Lei H-Y, Lin Y-S. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol*. janeiro de 2006;19(2):127–32.
- Lin YS, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. *Curr Pharm Des*. janeiro de 2004;10(2):213–21.
- Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. *Fields Virol*. 2007;1101–51.
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RGW. Chinese Hamster Ovary K2 Cell Lipid Droplets Appear to be Metabolic Organelles Involved in Membrane Traffic. *J Biol Chem*. 2004a;279(5):3787–92.

- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RGW. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* 30 de janeiro de 2004b;279(5):3787–92.
- Loke H, Bethell D, Phuong CXT, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* julho de 2002;67(1):102–6.
- 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? *J Infect Dis.* 1 de dezembro de 2001;184(11):1369–73.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel a R. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(1):51–8.
- Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel a. R. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie.* 2005;87(1 SPEC. ISS.):45–9.
- Lyn RK, Kennedy DC, Stolow A, Ridsdale A, Pezacki JP. Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein. *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier Inc.; 2010;399(4):518–24.
- MACKENZIE JM, JONES MK, YOUNG PR. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. *Virology.* 1 de junho de 1996;220(1):232–40.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004;10(12 Suppl):S98–109.
- Malavige GN, Huang L-C, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. *PLoS One.* janeiro de 2012;7(11):e50387.
- Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis.* 2002;185(12):1697–703.
- Martin S, Driessen K, Nixon SJ, Zerial M, Parton RG. Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J Biol Chem.* 23 de dezembro de 2005;280(51):42325–35.
- Martins IC, Gomes-Neto F, Faustino AF, Carvalho FA, Carneiro FA, Bozza PT, et al. The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *Biochem J.* 15 de junho de 2012;444(3):405–15.
- Mathew A, Kurane I, Green S, Stephens HA, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. *J Virol.* maio de 1998;72(5):3999–4004.

- Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Ávila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, et al. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(4):2203–10.
- Mazzon M, Mercer J. Lipid Interactions During Virus Entry and Infection. *Cell Microbiol.* 2014;16(September):n/a – n/a.
- McBride WJ., Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect.* 2000;2(9):1041–50.
- McLauchlan J. Hepatitis C virus: viral proteins on the move. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 5):986–90.
- Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe.* 18 de outubro de 2012;12(4):544–57.
- Melo MN, Sousa FJR, Carneiro F a., Castanho M a RB, Valente AP, Almeida FCL, et al. Interaction of the Dengue Virus Fusion Peptide with Membranes Assessed by NMR: The Essential Role of the Envelope Protein Trp101 for Membrane Fusion. *J Mol Biol.* Elsevier Ltd; 2009;392(3):736–46.
- Melo RCN, Ávila HD, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: Putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 2003;35(1):59–67.
- Meltzer E, Schwartz E. A travel medicine view of dengue and dengue hemorrhagic fever. *Travel Med Infect Dis.* setembro de 2009;7(5):278–83.
- Mesquita M, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Abrantes JL, Costa E, Temerozo JR, et al. HIV-1 and its gp120 inhibits the influenza A(H1N1)pdm09 life cycle in an IFITM3-dependent fashion. *PLoS One.* janeiro de 2014;9(6):e101056.
- Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, De Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(7):800–9.
- Messina JP, Brady OJ, Pigott DM, Golding N, Kraemer MUG, Scott TW, et al. The many projected futures of dengue. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2015;13(4):230–9.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira A V, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.* janeiro de 1997;16(4):204–8.
- Miller JL, deWet BJM, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek R a, Rudd PM, et al. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):11.
- Miura S, Gan JW, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, et al. Functional conservation for lipid storage droplet association among perilipin, ADRP, and TIP47

- (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem*. 2002;277(35):32253–7.
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007;9(9):1089–97.
- Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. janeiro de 2013;107(1):51–8.
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*. 2003;9(7):921–7.
- Monteiro SP, Brasil PEAA do, Cabello GMK, Souza RV de, Brasil P, Georg I, et al. HLA-A*01 allele: a risk factor for dengue haemorrhagic fever in Brazil's population. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. março de 2012;107(2):224–30.
- Moon HY, Song P, Choi CS, Ryu SH, Suh P-G. Involvement of exercise-induced macrophage migration inhibitory factor in the prevention of fatty liver disease. *J Endocrinol*. setembro de 2013;218(3):339–48.
- Moradpour D, Englert C, Wakita T, Wands JR. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*. 1996;222(1):51–63.
- Moreira LS, Piva B, Gentile LB, Mesquita-Santos FP, D'Avila H, Maya-Monteiro CM, et al. Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. Elsevier B.V.; 2009;1791(3):156–65.
- Mourão MPG, Lacerda MVG, Macedo VO, Santos JB. Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets*. dezembro de 2007;18(8):605–12.
- MS/SVS. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 53 de 2014 [Internet]. 2014 [citado 4 de outubro de 2015]. Recuperado de: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at---SE-53.pdf>
- MS/SVS. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 34, 2015 [Internet]. 2015 [citado 4 de outubro de 2015]. Recuperado de: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/01/2015-030-bol--2-.pdf>
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13–22.
- Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 2001;40(5):325–438.
- Murphy DJ. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*. 2012;249(3):541–85.

- Murphy S, Martin S, Parton RG. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta*. junho de 2009;1791(6):441–7.
- Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India*. 2015;71(1):67–70.
- Nascimento EJM, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LHV, Braga-Neto U, et al. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PLoS One*. janeiro de 2009;4(8):e6782.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier J-L, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*. 2003;4(7):723–8.
- Negro F. Facts and fictions of HCV and comorbidities: Steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J Hepatol*. European Association for the Study of the Liver; 2014;61(1):S69–78.
- Negro F, Sanyal AJ. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: Clinical and pathogenic data. *Liver Int*. 2009;29(SUPPL. 2):26–37.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood*. 23 de fevereiro de 2012;119(8):e45–56.
- Nishioka K. Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. *Allerg Immunol (Leipz)*. janeiro de 1974;20-21(4):385–92.
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, de Filippis AMB, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*. setembro de 2005;11(9):1376–81.
- Noisakran S, Gibbons R V, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. março de 2009;40(2):253–62.
- Normile D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. *Science* (80-). 2013;342(October):2013.
- Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao H-M, Duncan A, Villinger F, Ansari AA, et al. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*. 4 de março de 2010;115(9):1823–34.
- Ooi E-E, Gubler DJ. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. *Cad Saude Publica*. janeiro de 2009;25 Suppl 1:S115–24.

- Osorio JE, Brewoo JN, Silengo SJ, Arguello J, Moldovan IR, Tary-Lehmann M, et al. Efficacy of a tetravalent chimeric dengue vaccine (DENVax) in *Cynomolgus* macaques. *Am J Trop Med Hyg.* junho de 2011;84(6):978–87.
- Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci.* 15 de junho de 2005;118(Pt 12):2601–11.
- Pacheco P, Bozza F a, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 2002;169(11):6498–506.
- Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol.* 15 de dezembro de 2007;179(12):8500–8.
- PAHO. Dengue: Annual Cases Reported of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country [Internet]. 2010 [citado 4 de outubro de 2015]. Recuperado de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734&lang=en
- Pan American Health Organization, World Health Organization. State of the Art in the Prevention and Control of Dengue in the Americas. *Meet Rep State Art Prev Control Dengue Am.* 2014;53.
- Pandey N, Jain A, Garg RK, Kumar R, Agrawal OP, Lakshmana Rao P V. Serum levels of IL-8, IFN γ , IL-10, and TGF β and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection. *Arch Virol.* junho de 2015;160(6):1463–75.
- Pang J, Salim A, Lee VJ, Hibberd ML, Chia KS, Leo YS, et al. Diabetes with Hypertension as Risk Factors for Adult Dengue Hemorrhagic Fever in a Predominantly Dengue Serotype 2 Epidemic: A Case Control Study. Halstead SB, organizador. *PLoS Negl Trop Dis.* 1 de maio de 2012;6(5):e1641.
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol.* 2007;85(1):43–5.
- Pengsaa K, Luxemburger C, Sabchareon A, Limkittikul K, Yoksan S, Chambonneau L, et al. Dengue virus infections in the first 2 years of life and the kinetics of transplacentally transferred dengue neutralizing antibodies in thai children. *J Infect Dis.* 2006;194(11):1570–6.
- Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, et al. Tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* novembro de 2010;71(11):1135–40.
- Pierson TC, Diamond MS. Flaviviruses. *Fields Virol.* 6th ed 2013. p. 747–94.

- Ploen D, Hafirassou ML, Himmelsbach K, Sauter D, Biniossek ML, Weiss TS, et al. TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus. *J Hepatol.* junho de 2013a;58(6):1081–8.
- Ploen D, Hafirassou ML, Himmelsbach K, Schille SA, Biniossek ML, Baumert TF, et al. TIP47 is associated with the hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of viral particles. *Eur J Cell Biol.* dezembro de 2013b;92(12):374–82.
- Polizel JR, Bueno D, Visentainer JEL, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, et al. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* outubro de 2004;99(6):559–62.
- Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson a. D, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: Comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):427–34.
- Puerta-Guardo H, Raya-Sandino A, González-Mariscal L, Rosales VH, Ayala-Dávila J, Chávez-Mungía B, et al. The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability. *J Virol.* julho de 2013;87(13):7486–501.
- Qian K, Xie F, Gibson AW, Edberg JC, Kimberly RP, Wu J. Functional expression of IgA receptor Fc α RI on human platelets. *J Leukoc Biol.* dezembro de 2008;84(6):1492–500.
- Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi E a, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 1998;56(May):280–5.
- Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LCS, et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One.* janeiro de 2012;7(12):e52215.
- Regis EG, Barreto-de-Souza V, Morgado MG, Bozza MT, Leng L, Bucala R, et al. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the plasma of HIV-1-infected patients and in HIV-1-infected cell cultures: a relevant role on viral replication. *Virology.* 30 de março de 2010;399(1):31–8.
- Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* abril de 2005;79(8):4557–67.
- Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res.* outubro de 2007;31(10):1339–41.
- Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis.* 1 de junho de 2007;44(11):1462–6.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas R a, Tovar D, Nisalak a, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230(2):244–51.

- Rigau-Pérez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(May):297–302.
- Robenek H, Buers I, Hofnagel O, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ. Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* Elsevier B.V.; 2009;1791(6):408–18.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus? *Trends Microbiol.* maio de 2011;19(5):248–54.
- Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman G a. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ Res.* 2013;112(11):1506–19.
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* agosto de 2011;11(8):532–43.
- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet.* 3 de novembro de 2012;380(9853):1559–67.
- Sachais BS, Turrentine T, Dawicki McKenna JM, Rux AH, Rader D, Kowalska MA. Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE^{-/-} mice. *Thromb Haemost.* novembro de 2007;98(5):1108–13.
- Saka HA, Valdivia R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28(1):411–37.
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* maio de 2005;37(5):507–13.
- Salloum S, Wang H, Ferguson C, Parton RG, Tai AW. Rab18 binds to hepatitis C virus NS5A and promotes interaction between sites of viral replication and lipid droplets. *PLoS Pathog.* janeiro de 2013;9(8):e1003513.
- Samsa MM, Mondotte J a., Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 2009a;5(10).
- Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* outubro de 2009b;5(10):e1000632.
- Sa-Ngasang A, Ohashi J, Naka I, Anantapreecha S, Sawanpanyalert P, Patarapotikul J. Association of IL1B -31C/T and IL1RA Variable Number of an 86-bp Tandem Repeat With Dengue Shock Syndrome in Thailand. *J Infect Dis.* 19 de janeiro de 2014;210(1):138–45.
- Sangiambut S, Keelapang P, Aaskov J, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, et al. Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *J Gen Virol.* 2008;89(5):1254–64.

- Van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts B-L, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, et al. Characterization of the Early Events in Dengue Virus Cell Entry by Biochemical Assays and Single-Virus Tracking. *J Virol*. 29 de agosto de 2007;81(21):12019–28.
- Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeiffer U, Knarren S, Roller M, et al. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 27 de janeiro de 2004;109(3):380–5.
- Schwartz V, Lue H, Kraemer S, Korbiel J, Krohn R, Ohl K, et al. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett*. 3 de setembro de 2009;583(17):2749–57.
- Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. abril de 2011;11(4):264–74.
- Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100(7):608–14.
- SES/SINAN. Casos confirmados de FHD, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013 [Internet]. Portal da saúde. 2014a [citado 4 de outubro de 2015]. Recuperado de: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Graves-at---2014.pdf>
- SES/SINAN. Óbitos por Febre Hemorrágica da Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013 [Internet]. Portal da saúde. 2014b [citado 4 de outubro de 2015]. Recuperado de: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/--bitos-at---2014.pdf>
- Shi H, Luo J, Zhu J, Li J, Sun Y, Lin X, et al. PPAR γ Regulates Genes Involved in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Mammary Gland Epithelial Cells of Dairy Goats. *PPAR Res*. janeiro de 2013;2013:310948.
- Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MMC. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology*. 2002;292(2):198–210.
- Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, et al. CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex. *Immunity*. 2006;25(4):595–606.
- Sierra B, Alegre R, Pérez AB, García G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: Advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol*. 2007a;68(6):531–40.
- Sierra B, Perez AB, Vogt K, Garcia G, Schmolke K, Aguirre E, et al. MCP-1 and MIP-1 α expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine*. dezembro de 2010;52(3):175–83.
- Sierra BDLC, Kourí G, Guzmán MG. Race: A risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol*. 2007b;152(3):533–42.

- Silva AR, de Assis EF, Caiado LFC, Marathe GK, Bozza MT, McIntyre TM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol.* 2002;168(8):4112–20.
- Silva AR, Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Maya-Monteiro CM, D'Alegria B, Magalhães KG, et al. Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. *Biochim Biophys Acta.* novembro de 2009;1791(11):1066–75.
- Simmons CP, Chau TNB, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Thien NT, et al. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. *J Infect Dis.* 2007;196(3):416–24.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 30 de abril de 2009;458(7242):1131–5.
- Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral F a, Souza RS, Souza AL, et al. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(33):14138–43.
- Srichaikul T, Nimmannitya S, Sripaisarn T, Kamolsilpa M, Pulgate C. Platelet function during the acute phase of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* março de 1989;20(1):19–25.
- Stapleton JT, Fong S, Muerhoff a. S, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: A review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol.* 2011;92(2):233–46.
- Strüßmann T, Tillmann S, Wirtz T, Bucala R, von Hundelshausen P, Bernhagen J. Platelets are a previously unrecognized source of MIF. *Thromb Haemost.* novembro de 2013;110(5):1004–13.
- Su SB, Mukaida N, Matsushima K. Rapid secretion of intracellularly pre-stored interleukin-8 from rabbit platelets upon activation. *J Leukoc Biol.* março de 1996;59(3):420–6.
- Suksanpaisan L, Susantad T, Smith DR. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci.* 2009;16(strain 16007):17.
- Sun W, Cunningham D, Wasserman SS, Perry J, Putnak JR, Eckels KH, et al. Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve adults. *Hum Vaccin.* janeiro de 2009;5(1):33–40.
- Sun W, Eckels KH, Putnak JR, Lyons AG, Thomas SJ, Vaughn DW, et al. Experimental dengue virus challenge of human subjects previously vaccinated with live attenuated tetravalent dengue vaccines. *J Infect Dis.* 1 de março de 2013;207(5):700–8.
- Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(1):33–40.

- Szatmari I, Pap A, Rühl R, Ma J-X, Illarionov PA, Besra GS, et al. PPAR γ controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med*. 2 de outubro de 2006;203(10):2351–62.
- Tang W-C, Lin R-J, Liao C-L, Lin Y-L. Rab18 facilitates dengue virus infection by targeting fatty acid synthase to sites of viral replication. *J Virol*. junho de 2014;88(12):6793–804.
- Targett-Adams P, Boulant S, McLauchlan J. Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2008a;82(5):2182–95.
- Targett-Adams P, Hope G, Boulant S, McLauchlan J. Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem*. 2008b;283(24):16850–9.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;197(7):823–9.
- Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem*. 2002;277(46):44507–12.
- Teixeira MG, Costa MDCN, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S7–18.
- Teixeira MG, Siqueira, JB, Ferreira GLC, Bricks L, Joint G. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(12):e2520.
- Thai KTD, Nishiura H, Hoang PL, Tran NTT, Phan GT, Le HQ, et al. Age-specificity of clinical dengue during primary and secondary infections. *PLoS Negl Trop Dis*. junho de 2011;5(6):e1180.
- Tsai J-J, Jen Y-H, Chang J-S, Hsiao H-M, Noisakran S, Perng GC. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun*. janeiro de 2011;3(5):530–40.
- Umlauf E, Csaszar E, Moertelmaier M, Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem*. 2004a;279(22):23699–709.
- Umlauf E, Csaszar E, Moertelmaier M, Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem*. 28 de maio de 2004b;279(22):23699–709.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000;181(1):2–9.
- Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Endy TP, et al. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis*. 15 de maio de 2009;199(10):1442–8.

- Vieira-De-Abreu A, Assis EF, Gomes GS, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, Bandeira-Melo C, et al. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(3):254–61.
- Vieira-de-Abreu A, Calheiros AS, Mesquita-Santos FP, Magalhães ES, Mourão-Sá D, Castro-Faria-Neto HC, et al. Cross-talk between macrophage migration inhibitory factor and eotaxin in allergic eosinophil activation forms leukotriene C₄-synthesizing lipid bodies. *Am J Respir Cell Mol Biol.* abril de 2011;44(4):509–16.
- Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol.* janeiro de 2012;34(1):5–30.
- Vogt DA, Camus G, Herker E, Webster BR, Tsou C-L, Greene WC, et al. Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog.* janeiro de 2013;9(4):e1003302.
- Vu TTH, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, et al. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS Negl Trop Dis.* janeiro de 2010;4(7):e757.
- Walther TC, Farese R V. Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annu Rev Biochem.* 2012;81(1):687–714.
- Wan H-C, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* janeiro de 2007;21(1):167–78.
- Wang S-H, Syu W-J, Huang K-J, Lei H-Y, Yao C-W, King C-C, et al. Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 12):3093–102.
- Wang W-K, Chao D-Y, Kao C-L, Wu H-C, Liu Y-C, Li C-M, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology.* 2003;305(2):330–8.
- Wang W-K, Chen H-L, Yang C-F, Hsieh S-C, Juan C-C, Chang S-M, et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis.* 15 de outubro de 2006;43(8):1023–30.
- Waris G, Felmlee DJ, Negro F, Siddiqui A. Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *J Virol.* agosto de 2007;81(15):8122–30.
- Watanaveeradej V, Endy TP, Samakoses R, Kerdpanich A, Simasathien S, Polprasert N, et al. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(2):123–8.
- Van de Weg CAM, Pannuti CS, de Araújo ESA, van den Ham H-J, Andeweg AC, Boas LS V, et al. Microbial translocation is associated with extensive immune activation in dengue virus infected patients with severe disease. *PLoS Negl Trop Dis.* janeiro de 2013;7(5):e2236.

- Weller PE, Ryeom W, Pieard ST, Aekerman SJ, Dvorak M. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 1991;113(1):137–46.
- Weller PF, Ackerman SJ, Nicholson-Weller a, Dvorak a M. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol.* 1989;135(5):947–59.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe.* Elsevier Ltd; 2009;5(4):365–75.
- Weyrich AS, Denis MM, Kuhlmann-Eyre JR, Spencer ED, Dixon DA, Marathe GK, et al. Dipyridamole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates. *Circulation.* 8 de fevereiro de 2005;111(5):633–42.
- Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest.* 15 de março de 1996;97(6):1525–34.
- Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost.* setembro de 2003;1(9):1897–905.
- Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost.* fevereiro de 2009;7(2):241–6.
- WHO. WHO | Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva : World Health Organization. World Health Organization; 1997;
- Who. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis.* 2009;147.
- WHO. WHO | Dengue and severe dengue [Internet]. World Health Organization; 2015 [citado 4 de outubro de 2015]. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. *Med Clin North Am.* 2008;92(6):1377–90.
- Wirtz TH, Tillmann S, Strüßmann T, Kraemer S, Heemskerk JWM, Grottko O, et al. Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis.* março de 2015;239(1):1–10.
- Wise de Valdez MR, Nimmo D, Betz J, Gong H-F, James AA, Alphey L, et al. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 de março de 2011;108(12):4772–5.
- Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 2006;580(23):5484–91.
- Wooten RE, Willingham MC, Daniel LW, Leslie CC, Rogers LC, Sergeant S, et al. Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2?? fluorescent proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2008;1783(8):1544–50.

- Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, de Souza Santos R, Gonçalves Cruz O, et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case-control, functional and meta-analysis study. *Infect Genet Evol.* dezembro de 2013;20:197–205.
- Yacoub S, Mongkolsapaya J, Screaton G. The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(3):284–9.
- Yang KD, Lee CS, Shaio MF. A higher production of platelet activating factor in ex vivo heterologously secondary dengue-2 virus infections. *Acta Microbiol Immunol Hung.* janeiro de 1995;42(4):403–7.
- Yang W, Hood BL, Chadwick SL, Liu S, Watkins SC, Luo G, et al. Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology.* novembro de 2008;48(5):1396–403.
- Yeh T-M, Liu S-H, Lin K-C, Kuo C, Kuo S-Y, Huang T-Y, et al. Dengue Virus Enhances Thrombomodulin and ICAM-1 Expression through the Macrophage Migration Inhibitory Factor Induction of the MAPK and PI3K Signaling Pathways. Zissel G, organizador. *PLoS One.* 28 de janeiro de 2013;8(1):e55018.
- Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* março de 2000;38(3):1053–7.
- Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak a M, et al. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 1998;152(3):759–69.
- Yu W, Cassara J, Weller PF. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood.* 2000;95(3):1078–85.
- 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.* 18 de fevereiro de 2010;7(2):128–39.
- Zhu X, He Z, Yuan J, Wen W, Huang X, Hu Y, et al. IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cell Microbiol.* janeiro de 2015;17(1):105–18.
- Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr.* 2000;1469(2):101–20.