

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Quantificação dos corpúsculos lipídicos, das enzimas formadoras de eicosanoides e de seus produtos na infecção natural pelo *Dengue virus***

**Por**

**Eneida Santos de Oliveira**

**Belo Horizonte**

**2018**

**TESE TCS-IRR**

**E.S. OLIVEIRA**

**2018**

**Eneida Santos de Oliveira**

**Quantificação dos corpúsculos lipídicos, das enzimas formadoras de eicosanoides e de seus produtos na infecção natural pelo *Dengue virus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em ciências da saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientação: Carlos Eduardo Calzavara Silva  
Coorientação: Érica Alessandra Rocha Alves e  
Luciana Lara dos Santos

**Belo Horizonte**

**2018**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

O482q      Oliveira, Eneida Santos de.  
2018

Quantificação dos corpúsculos lipídicos, das enzimas formadoras de eicosanoides e de seus produtos na infecção natural pelo **Dengue virus** / Eneida Santos de Oliveira – Belo Horizonte, 2018.

XV, 93 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 82 – 87

Tese – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós – Graduação do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia celular e molecular.

1. Dengue virus 2. Eicosanoides 3. Gotículas Lipídicas. I. Título II. Silva, Carlos Eduardo Calzavara (orientação). III. Alves, Érica Alessandra Rocha e Santos, Luciana Lara (coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.918

**Aos meus pais,  
Que sempre fizeram dos meus sonhos o sonho deles!**



## **AGRADECIMENTOS**

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, muitas pessoas foram fundamentais e neste momento de conclusão quero agradecer a todos que de alguma forma fizeram parte de mais esta conquista.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Carlos Eduardo Calzavara, pela oportunidade não só do doutorado, mas principalmente pela oportunidade de fazer parte de uma equipe, que me permitiu crescer muito nestes quatro anos. E por me ajudar a descobrir minhas limitações e capacidade. A minha coorientadora Dra. Érica Alves, pela generosidade com que compartilha seus conhecimentos, por sua dedicação e comprometimento. Vocês dois foram essências para conclusão desse trabalho e minha formação.

Ao grupo de imunologia celular e molecular pelas inúmeras discussões sobre, ciência, política, religião e vida que fizeram de mim uma pessoa e profissional melhor. As meninas da vacina pela convivência diária que tornaram os meus dias muito mais felizes. Todos vocês se tornaram amigos que levarei pra sempre em minha vida.

Aos colegas dos grupos Pesquisas Clínicas e Mosquitos Vetores, em especial a Marcele, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte, em especial a Dra. Lais Oliveira de Sousa, por toda ajuda na parte clínica do projeto.

Ao programa de pós-graduação em ciências da saúde, ao Instituto René Rachou e a FIOCRUZ, por toda a estrutura que permitiu o desenvolvimento do doutorado. Aos professores, pelo conhecimento compartilhado. Agradeço também ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico da Rede de Plataformas da FIOCRUZ pelo uso da Plataforma de Citometria de Fluxo.

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

Agradeço de forma especial a minha família. Aos meus pais, Francisco e Nicéa, por serem a minha força, pelo incentivo constante que nunca me deixa desistir. Ao Edmar, pelo carinho, preocupação e por ser sempre presente. Aos meus irmãos, Tiago e Mateus, por sonharem comigo e estarem sempre ao meu lado. As minhas cunhadas, Hialla e Daniela, pelo apoio e carinho. Aos meus sobrinhos Miguel, Giovana e Clara, por serem a minha alegria mesmo nos momentos mais difíceis e sem saber me ensinam tanto sobre amor. A minha avó Lia, meus tios e primos por serem a minha base e dividirem comigo cada pequena conquista.

E a Deus, por colocar todas essas pessoas maravilhosas na minha vida!

## RESUMO

O curso clínico da dengue é influenciado por múltiplos fatores. Nesse contexto, o processo inflamatório e sua regulação desempenham um importante papel no prognóstico da dengue. Os eicosanoides tem considerável influência sobre a regulação de muitos mecanismos inflamatórios envolvidos em várias doenças. No entanto, poucos estudos analisaram o papel dessas moléculas durante a infecção pelo **Dengue virus** (DENV). Para quantificar as moléculas envolvidas nas principais vias produtoras de eicosanoides - a via da ciclooxigenase (COX) e da lipooxigenase (LOX) - durante a dengue, foram coletadas amostras de sangue de participantes com dengue sem sinais de alarme e não infectados. Foram quantificados os níveis plasmáticos de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), bem como os níveis de mRNA de tromboxano A<sub>2</sub> sintase (TXA<sub>2</sub>S), prostaglandina E<sub>2</sub> sintase (PGE<sub>2</sub>S), leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolase (LTA<sub>4</sub>H), ciclooxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LOX) em leucócitos do sangue periférico. Além disso, como os corpúsculos lipídicos são organelas envolvidas na síntese de eicosanoides, medimos seus níveis em leucócitos do sangue periférico e também a porcentagem de monócitos vacuolados na circulação sanguínea de indivíduos infectados por DENV, bem como a carga viral. Dos 40 voluntários incluídos neste estudo, 12 voluntários não infectados foram negativos nos testes RT-qPCR, ELISA NS1 e também ELISA IgM. Os 28 voluntários restantes apresentaram sintomas de dengue e foram positivos em pelo menos um de três testes utilizados (17 foram positivos usando RT-qPCR, 20 foram positivos usando ELISA NS1 e 16 foram positivos em ELISA IgM). Devido à grande variação de dias de sintomas relatados pelos participantes (1-12 dias de sintomas), eles foram divididos em dois grupos de acordo com a presença e ausência de IgM. Nossos resultados mostraram que a infecção pelo DENV aumenta os níveis de TXA<sub>2</sub> em indivíduos IgM positivos. Observamos também que os leucócitos do sangue periférico não são a fonte dos níveis aumentados de TXA<sub>2</sub> na dengue, uma vez que a expressão do mRNA das enzimas COX-2 e TXA<sub>2</sub>S estava diminuída no grupo IgM positivo. Além disso, os níveis de corpúsculo lipídico estavam aumentados em monócitos no grupo IgM negativo, mesma fase onde se observou aumento de vacuolização em monócitos e elevada carga viral. Devido ao conhecido papel vasoconstritor e de agregação plaquetária do TXA<sub>2</sub>, essa molécula parece desempenhar um papel protetor contra o desenvolvimento dos sintomas graves da dengue, enquanto os corpúsculos lipídicos parecem estar envolvidos na replicação viral em monócitos.

**Palavras chave:** Dengue virus, eicosanoides, inflamação, patogenia, TXA<sub>2</sub>, Corpúsculo lipídico

## ABSTRACT

The clinical course of dengue is influenced by multiple factors. In this context, the inflammatory process and its regulation play a major role in dengue prognosis. The eicosanoid molecules have considerable influence upon the regulation of many inflammatory mechanisms involved in the pathogenesis of several diseases. However, few studies have analysed the role of eicosanoids during Dengue virus (DENV) infection. In order to quantify molecules involved in the cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) pathways during dengue, blood samples were collected from patients with mild dengue and plasma levels of thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and also mRNA levels of thromboxane A<sub>2</sub> synthase (TXA<sub>2</sub>S), prostaglandin E<sub>2</sub> synthase (PGE<sub>2</sub>S), leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase (LTA<sub>4</sub>H), cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) were analysed. Moreover, as lipid bodies (LB) are organelles engaged in the synthesis of eicosanoids, we measured their levels in peripheral blood leukocytes and also the percentage of vacuolated monocytes in the blood circulation of DENV-infected individuals, as well as the DENV load. From 40 volunteers enrolled in this study, 12 healthy volunteers were negative in RT-qPCR, ELISA NS1 and also ELISA IgM tests. The remaining 28 volunteers presented dengue symptoms and were positive at least in one of the three tests used (17 were positive using RT-qPCR, 20 were positive using ELISA NS1 and 16 were positive in ELISA IgM). Due to the wide variation of days of symptoms reported by the volunteers (1-12 days of symptoms), they were divided into two groups according to the presence and absence of IgM. Our results showed that DENV infection increases the levels of TXA<sub>2</sub> in IgM-positive individuals. We also observed that peripheral blood leukocytes are not the source of increased levels of TXA<sub>2</sub> in dengue, since mRNA expression of the COX-2 and TXA<sub>2</sub>S enzymes was decreased in the IgM positive group. In addition, lipid bodies levels were increased in monocytes in the negative IgM group, the same phase where increased vacuolization was observed in monocytes and high viral load. Due to the well-established vasoconstrictor and platelet aggregation role of TXA<sub>2</sub>, this seems to play a protective role against the development of severe dengue symptoms. Moreover, LB may be involved in viral replication in monocytes.

**Keywords:** Dengue virus; eicosanoids; TXA<sub>2</sub>, pathogenesis, inflammation; lipid bodies

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Desenho esquemático do dengue virus .....	17
<b>Figura 2-</b> Evolução clínica e imunológica na Dengue .....	18
<b>Figura 3-</b> Imunidade inata na infecção pelo Dengue virus .....	21
<b>Figura 4-</b> Imunidade humoral na infecção pelo Dengue virus .....	24
<b>Figura 5-</b> Imunidade celular na infecção pelo Dengue virus .....	25
<b>Figura 6-</b> Mediadores inflamatórios na dengue grave .....	30
<b>Figura 7-</b> Síntese de eicosanoides .....	31
<b>Figura 8-</b> Estratégia experimental .....	38
<b>Figura 9-</b> Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nos neutrófilos .....	44
<b>Figura 10-</b> Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nos eosinófilos .....	45
<b>Figura 11-</b> Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nas subpopulações de monócitos CD16 <sup>-</sup> e CD16 <sup>+</sup> .....	46
<b>Figura 12-</b> Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nas subpopulações de linfócitos TCD4, TCD8 e B .....	47
<b>Figura 13-</b> Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nas células NK e NKT .....	48
<b>Figura 14-</b> Eritrograma dos participantes com dengue .....	56
<b>Figura 15.</b> Leucograma e plaquetas dos participantes com dengue .....	57
<b>Figura 16.</b> Perfil bioquímico dos participantes com dengue .....	58
<b>Figura 17.</b> Lipidograma dos participantes com dengue .....	59
<b>Figura 18.</b> Perfil de citocinas dos participantes com dengue .....	60
<b>Figura 19.</b> Quantificação dos eicosanoides TXA <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> e LTB <sub>4</sub> no plasma de indivíduos infectados com dengue .....	61
<b>Figura 20.</b> Corpúsculos lipídicos em subpopulações de monócitos de pacientes com dengue .....	62
<b>Figure 21.</b> Corpúsculos lipídicos em diferentes populações de leucócitos de pacientes com dengue .....	64

<b>Figura 22.</b> Quantificação dos níveis de mRNA que codificam as enzimas formadoras de eicosanóides COX2, TXA <sub>2</sub> S, PGE <sub>2</sub> S, 5-LOX e LTA <sub>4</sub> H em leucócitos do sangue periférico de pacientes com dengue .....	65
<b>Figura 23.</b> Quantificação plasmática do DENV .....	66
<b>Figura 24.</b> Porcentagem de monócitos vacuolados em participantes infectados por DENV .....	67
<b>Figura 25-</b> Modelo esquemático do papel do CL e TXA <sub>2</sub> no prognóstico da dengue .....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Informação técnica dos exames laboratoriais .....	40
<b>Tabela 2-</b> Anticorpos utilizados para marcação dos leucócitos do sangue periférico para análise por citometria de fluxo .....	43
<b>Tabela 3-</b> Determinação do gene de expressão constitutiva para o grupo de amostras deste trabalho .....	49
<b>Tabela 4-</b> Diagnóstico de dengue de casos atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte .....	53
<b>Tabela 5.</b> Características clínicas de casos de dengue, atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte durante o período de março a maio de 2016 .....	55
<b>Tabela 6:</b> Resumo dos resultados obtidos na primeira etapa do estudo .....	67
<b>Tabela 7:</b> Resumo dos resultados obtidos na segunda etapa do estudo .....	69

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- AA- Ácido araquidônico
- ADE- Potencialização dependente de anticorpo
- Alb- Albumina
- ALT- Alanina aminotransferase
- APC- Células apresentadoras de antígenos
- AST- Aspartato aminotransferase
- BLT- Receptor de leucotrieno B<sub>4</sub>
- C- Proteína do capsídeo
- CC / CXCL- Quimiocinas
- CHIKV- Chikungunya virus
- CL- Corpúsculos lipídicos
- Clu- Fator inibitório do complemento
- COX- Cicloxigenase
- CT- Colesterol total
- DENV- Dengue virus
- E- Proteína do envelope
- ED- Domínio da proteína do envelope
- ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática
- Glob- Globulina
- HDL- Lipoproteínas de alta densidade
- IFN- Interferon
- Ig- Imunoglobulina
- IL- Interleucina
- IMF- Intensidade mediana de fluorescência
- LDL- Lipoproteínas de baixa densidade
- LOX- Lipoxigenase
- LT- Leucotrienos
- LTA<sub>4</sub>- Leucotrieno A<sub>4</sub>
- LTA<sub>4</sub>H- Leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolase
- LTB<sub>4</sub>- Leucotrieno B<sub>4</sub>
- M- Proteína membrana
- MCP- Fator quimioatrativo de monócitos

NK- Célula citotóxica natural  
NKT- Célula citotóxica natural T  
NS- Proteína não estrutural  
OMS- Organização Mundial de Saúde  
PAMPs- Padrões moleculares de patógenos  
PCR- Reação em cadeia de polimerase  
PG- Prostaglandinas  
PGE<sub>2</sub>- Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGE<sub>2</sub>S- Prostaglandina E<sub>2</sub> sintase  
prM- Proteína pr-membrana  
PT- Proteínas totais  
RIG-I- Receptor de ácido retinóico  
TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido  
TF- Fator tecidual  
TG- Triglicérides  
TLR- Receptor do tipo Toll  
TNF- Fator de necrose tecidual  
TP- Receptor de prostanóide  
TX- Tromboxanos  
TXA<sub>2</sub>- Tromboxano A<sub>2</sub>  
TXA<sub>2</sub>S- Tromboxano A<sub>2</sub> sintase  
VLDL- Lipoproteínas de muito baixa densidade  
ZIKV- Zika virus



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Características gerais do Dengue vírus e da dengue.....	16
1.2 Imunidade inata na infecção pelo <b>Dengue vírus</b> .....	20
1.3 Imunidade adaptativa na infecção pelo <b>Dengue vírus</b> .....	22
1.3.1 Imunidade humoral .....	22
1.3.2 Imunidade celular.....	24
1.4 Patogênese da infecção pelo <b>Dengue vírus</b> .....	25
1.5 Inflamação na dengue .....	28
1.6 Eicosanoides .....	30
1.7 Corpúsculos lipídicos na síntese de eicosanoides.....	34
1.7.1 Corpúsculo lipídico como plataforma de montagem para o <b>Dengue vírus</b> .....	34
2 JUSTIFICATIVA .....	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral .....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. Estratégia experimental.....	38
4.2 Considerações éticas .....	38
4.3 Seleção dos participantes .....	39
4.4 Análises hematológicas e bioquímicas .....	40
4.5 Dosagem dos níveis séricos de citocinas .....	41
4.6 Quantificação plasmática de eicosanoides.....	41
4.7 Determinação dos níveis de corpúsculos lipídicos em leucócitos do sangue periférico.41	
4.7.1 Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos em leucócitos .....	44
4.8 Análise da expressão gênica das enzimas formadoras de eicosanoides .....	49
4.9 Quantificação da carga viral do <b>Dengue vírus</b> .....	50
4.10 Análise de monócitos vacuolados.....	50
4.11 Análise estatística .....	51
5 RESULTADOS .....	52
5.1 Diagnóstico de dengue.....	52
5.2 Perfil clínico dos participantes com dengue .....	54
5.3 Perfil laboratorial dos participantes com dengue.....	55

5.4 Lipidograma dos participantes com dengue .....	58
5.5 Perfil de citocinas plasmáticas dos participantes com dengue.....	59
5.6 Influencia da infecção pelo DENV sobre os níveis plasmáticos dos eicosanoides TXA <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> e LTB <sub>4</sub> .....	60
5.7 Influencia da infecção pelo DENV sobre os níveis de corpúsculos lipídicos em leucócitos .....	61
5.8 Influencia da infecção por DENV na expressão gênica das enzimas formadoras de eicosanoides .....	65
5.9 Carga viral dos participantes infectados por DENV .....	66
5.10 Influência da infecção por DENV na vacuolização de monócitos .....	66
5.11 Resumo dos resultados.....	67
6 DISCUSSÃO .....	71
9 CONCLUSÃO.....	80
10 PERSPECTIVAS .....	81
11 REFERÊNCIAS .....	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Características gerais do *Dengue virus* e da dengue

A dengue é um problema global de saúde pública principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que aconteçam 390 milhões de infecções pelo **Dengue virus** (DENV) por ano no mundo, dos quais 96 milhões são infecções sintomáticas, 2 milhões de casos evoluem para casos graves e que ocorram 21.000 mortes em decorrência da dengue por ano (BHATT et al., 2013). Em 2016, foram registrados nas Américas mais de 2,38 milhões de casos de dengue, dos quais o Brasil foi responsável por cerca de 1,5 milhões destes casos (Organização mundial de saúde). Já no ano de 2017, o número de casos de dengue no Brasil foi bem inferior a 2016, tendo sido registrados 252.054 casos prováveis de dengue até a semana epidemiológica 52 (1/1/2017 a 30/12/2017). Neste mesmo período, ocorreram 2.590 casos de dengue com sinais de alarme, 271 casos de dengue grave e 141 óbitos por dengue (Boletim epidemiológico, 2017). Além disso, no ano de 2018, até a semana epidemiológica 17 (31/12/2017 a 28/04/2018), foram registrados 110.291 casos prováveis de dengue, com 1.019 casos de dengue com sinais de alarme e 87 casos graves de dengue, sendo confirmados 41 óbitos (Boletim epidemiológico, 2018).

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo DENV, um vírus que pertence à família *Flaviviridae*, composta por aproximadamente 70 tipos virais e que na sua maioria são transmitidos por artrópodes. Existem quatro sorotipos de DENV, que são geneticamente e antigenicamente distintos, mas que acarretam manifestações clínicas semelhantes (CHAMBERS et al., 1990).

O DENV é um vírus de formato esférico medindo de 50 a 60 nm de diâmetro, é envelopado e contém um capsídeo denso envolvido por uma bicamada lipídica denominada envelope viral. Seus genes são organizados em uma molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva, cujo genoma é composto de 10.862 nucleotídeos que codificam 3400 aminoácidos. A poliproteína gerada pela tradução do RNA viral é clivada por proteases virais e do hospedeiro em dez proteínas, sendo três proteínas estruturais, que são denominadas Capsídeo (C), Envelope (E) e pr-membrana/membrana (pr/M/M) e sete proteínas não estruturais (NS), que são denominadas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5.

As proteínas estruturais participam da montagem e entrada do vírus nas células. A proteína C se liga e estabiliza o RNA viral. A proteína E possui dois sítios de glicosilação e é dividida em três domínios EDI, EDII e EDIII. Durante a montagem viral, 180 cópias da

proteína E se associam a 180 cópias da proteína pr/M no retículo endoplasmático formando 60 pontas triméricas (heterohexaméricas), que dão origem aos vírus imaturos (figura 1A). No Golgi a proteína pr/M é clivada por furinas do hospedeiro na proteína M, a porção pr fica ligada ao vírus imaturo até que seja secretado. Essa clivagem leva ao rearranjo da proteína E em 90 homodímeros. Após a secreção do vírus imaturo pela célula do hospedeiro a porção pr se dissocia deixando o vírus maduro (figura 1B ) (KHETARPAL; KHANNA, 2016; ROBERTS, 2015). Quando o vírus maduro infecta uma nova célula através da endocitose mediada pelo receptor, as moléculas da proteína E mudam para uma conformação trimérica no compartimento ácido do endossomo, formando uma alça de fusão (**Fusion loop**) que projeta-se da superfície do vírus causando a fusão da membrana viral com a membrana do endossomo o que permite a liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (figura 1C) (KHETARPAL; KHANNA, 2016).

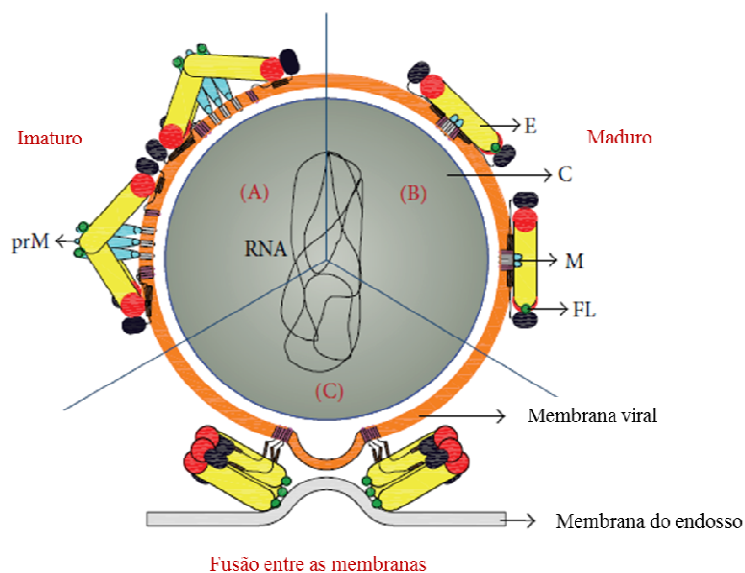


Figura 1- Desenho esquemático do dengue vírus: Em A) vírus imaturo, em B) vírus maduro, e em C) fusão entre a membrana do vírus e a membrana do endossomo Fonte: adaptado (KHETARPAL; KHANNA, 2016).

Por outro lado, as proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação e montagem viral e na interação com o hospedeiro. NS1 participa na replicação do RNA viral e defesa contra o hospedeiro, através da inibição da ativação do complemento. NS2a auxilia na replicação e montagem viral, enquanto que NS2b é cofator para a proteína NS3, uma protease que cliva a poliproteína viral, tem atividade na replicação viral e induz a apoptose de células infectadas. Já a NS4a induz alteração de membrana e autofagia para a replicação viral. A NS4b interage com NS3 na replicação viral e bloqueia interferon (IFN)- $\alpha/\beta$  ajudando o vírus a

escapar do sistema imunológico inato, enquanto que a NS5 é uma RNA polimerase dependente de RNA (KHETARPAL; KHANNA, 2016).

O DENV é transmitido pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes*, cuja espécie mais comum no Brasil é o *Aedes aegypti*. Após a inoculação do vírus no hospedeiro pelo mosquito vetor, o DENV passa por uma fase de incubação que dura normalmente de 4 a 7 dias. Neste período não se tem manifestação clínica, mas ocorre intensa replicação viral. No pico de viremia se inicia a fase febril que persiste até o quinto dia de sintomas. Inicia-se, então, a fase de defervescência ou fase crítica, onde praticamente não se tem mais replicação viral. É nessa fase que pode ocorrer intenso extravasamento vascular e perdura até o sétimo dia de sintoma, quando se inicia a fase de convalescência. A proteína viral NS1 pode ser detectada no sangue desde o primeiro dia da fase febril, já os anticorpos imunoglobulina M e G (IgM e IgG) começam a ser produzidos com dois dias de sintomas, mas a partir do quinto dia de sintoma é que esta produção é intensificada (figura 2) (SIMMONS et al., 2015).

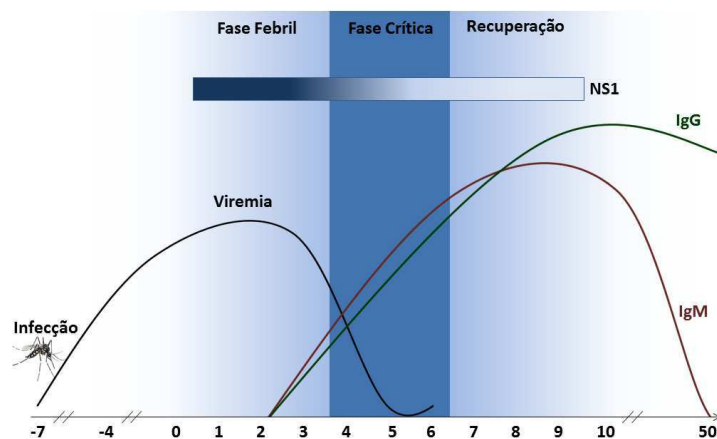


Figura 2- Evolução clínica e imunológica na Dengue. Desenho esquemático mostrando as fases da evolução clínica da dengue, a proteína viral NS1, e a produção de IgM e IgG. Baseada em Simmons et al 2015 e Guzman et al 2016.

O diagnóstico da dengue pode ser realizado por método molecular através da identificação do RNA viral por reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional ou em tempo real. Essas técnicas permitem também a identificação do sorotipo viral, possuem alta sensibilidade e especificidade, porém só podem ser realizadas na fase de viremia da doença. Ou por métodos sorológicos como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e teste imunocromatográfico rápido, que além de serem alternativas mais baratas, podem ser realizadas para detecção de IgM, a partir do quinto dia de sintomas, ou a identificação da proteína NS1, do primeiro ao sétimo dia de sintomas (SIMMONS et al., 2015).

A dengue pode variar de um quadro assintomático a uma febre auto-limitada, ou evoluir para um quadro grave com hemorragia severa e choque podendo acarretar o óbito (LEI et al., 2008; OLAGNIER et al., 2016). É clinicamente classificada como dengue com ou sem sinais de alarme ou dengue grave. Esta classificação foi lançada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2009 com o propósito de melhorar a gestão clínica. A avaliação dos sinais de alarme tem o objetivo de permitir a identificação precoce de pacientes com manifestações graves que necessitam de terapia de suporte (GUZMAN et al., 2016).

Recentemente o Ministério da Saúde Brasileiro passou a adotar os critérios estabelecidos pela OMS para categorizar os indivíduos com dengue. São considerados suspeitos de dengue sem sinal de alarme, aqueles que vivem ou tenham viajado para áreas de transmissão da dengue e que apresente febre, entre 2 a 7 dias, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações clínicas: náusea, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaleia, dor retro-orbital, petéquias ou prova do laço positiva e leucopenia. São considerados suspeitos de dengue com sinais de alarme aqueles que, no período de defervescência apresente os seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdômen, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascites, derrame pleural ou pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural, hepatomegalia maior do que 2 cm e aumento progressivo do hematócrito. Já os suspeitos de dengue grave são aqueles que apresentam um ou mais dos seguintes sinais: a) Choque devido ao extravasamento grave de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior a três segundos, pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente  $\leq 20$  mm Hg, hipotensão arterial em fase tardia, acúmulo de líquidos com insuficiência respiratória, b) Sangramento grave, segundo a avaliação do médico (exemplos: hematêmese, melena, metrorragia volumosa, sangramento do sistema nervoso central), c) Comprometimento grave de órgãos tais como: dano hepático importante (Aspartato aminotransferase - AST ou Alanina aminotransferase - ALT > 1000), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos (MS, 2018).

Não existe, até o momento, nenhum medicamento antiviral disponível para o tratamento da dengue. A abordagem terapêutica geralmente baseia-se no controle dos sintomas. Para os casos de dengue sem sinal de alarme, o tratamento prescrito é repouso, hidratação oral e antipirético ou analgésico não baseado em ácido acetilsalicílico. Já nos casos de dengue com sinal de alarme a conduta terapêutica baseia-se em hospitalização imediata para hidratação por via intravenosa para manter a circulação eficaz durante o extravasamento vascular, além

de transfusão de plaquetas e concentrado de hemácias nos casos mais graves. A evolução clínica do paciente é monitorada através de vários exames como dosagem de plaquetas e leucócitos, avaliação do hematócrito e quantificação das enzimas hepáticas (KHETARPAL; KHANNA, 2016).

## **1.2 Imunidade inata na infecção pelo *Dengue virus***

Pouco se sabe sobre os eventos seguintes à inoculação do DENV na pele, incluindo as respostas imunitárias no local de inoculação e o impacto do sorotipo e genoma viral infectante, ambos os quais poderiam potencialmente determinar o sucesso do hospedeiro na depuração viral. Após a inoculação, o vírus pode entrar em contato com uma ampla gama de células do sistema imunitário, como células dendríticas, macrófagos, células de Langerhans e mastócitos (JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013). Não se sabe ao certo quais células são primeiramente infectadas, mas acredita-se que células dendríticas, macrófagos e células de Langerhans sejam as primeiras a serem infectadas, já que são encontradas na pele e são permissivas à infecção pelo DENV (MILLER et al., 2008; TASSANEETRITHEP et al., 2003; WU et al., 2000).

Durante a infecção primária pelo DENV, os mastócitos residentes na pele são ativados, mesmo sem serem infectados e produzem substâncias que promovem o recrutamento de células citotóxicas naturais NK e NKT, que têm sido implicadas na depuração viral na pele e em linfonodos de drenagem da região de inoculação nos primeiros momentos de infecção em modelo murino (figura 3) (JOHN, ST et al., 2011).

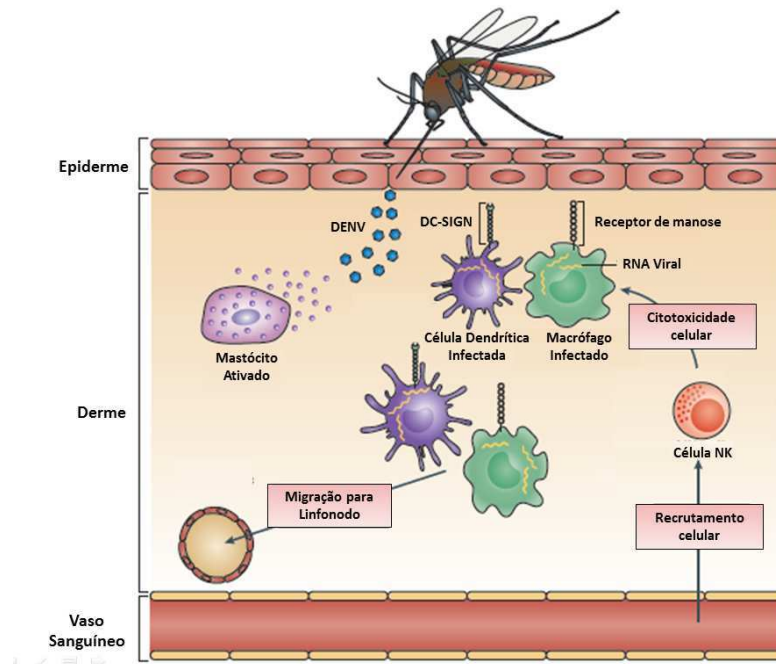


Figura 3- Imunidade inata na infecção pelo Dengue vírus. Desenho esquemático mostrando os primeiros momentos de infecção pelo DENV na pele. Fonte: Adaptado de John et al 2013.

Já nas células do sistema fagocítico-mononuclear (células dendríticas, células de Langerhans e macrófagos) que estão infectadas pelo DENV na pele, as respostas pró-inflamatórias, com a produção de mediadores inflamatórios, são iniciadas pelos receptores intracelulares para reconhecimento de padrões moleculares de patógenos (PAMPs), como o receptor do tipo Toll 3 (TLR3) e de ácido retinóico RIG-I, que levam à produção de citocinas como fator de necrose tecidual (TNF)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , interleucina (IL)-6 e IL-12. As células NK, que ingressam no tecido, quando ativadas também são capazes de secretar IFN- $\gamma$  (LOO et al., 2008; TSAI et al., 2009).

Após a infecção cutânea, células dendríticas e macrófagos infectados entram na circulação linfática e infectam linfonodos regionais e posteriormente outros mais distantes. Além disso, monócitos que são recrutados do sangue periférico por quimiocinas, são posteriormente infectados e se disseminam, causando infecção sistêmica. Acredita-se também que a disseminação sistêmica do DENV pode ocorrer pela inoculação do vírus diretamente nos capilares, o que leva à infecção de células permissivas (principalmente os macrófagos) no baço e a partir do baço acontece a distribuição sistêmica do vírus (SIMMONS et al., 2015). As hemácias também podem exercer um importante papel na disseminação do DENV, uma vez que já foi descrito que essas células podem conter o vírus associado e que mesmo após essa associação o vírus mantém sua capacidade de se replicar em outras células (SUTHERLAND et al., 2016)



Outra citocina produzida de modo inato nas infecções virais é o IFN- $\alpha/\beta$ , que é um potente inibidor da infecção viral por estabelecer um estado não permissivo tanto em células infectadas quanto em não infectadas, o que impede a propagação do vírus. Contudo, o DENV possui mecanismos que bloqueiam a atividade do IFN- $\alpha/\beta$ . O DENV inibe a produção de IFN- $\alpha/\beta$  através do complexo NS3-NS2B, que cliva STING, uma importante molécula na cascata de sinalização para a produção de IFN- $\alpha/\beta$ , o que leva à sua degradação. Além disso, NS4b parece impedir a fosforilação de STAT1 e NS5 tem sido relacionada com a diminuição da expressão de STAT2, moléculas que também são importantes para a sinalização de IFN- $\alpha/\beta$  (DIAMOND; PIERSON, 2015).

Em consequência da infecção sistêmica, a resposta adaptativa é ativada. Contudo, a ativação desta resposta na infecção pelo DENV envolve a participação das células do sistema imunitário inato. Como por exemplo, as células apresentadoras de antígenos (APC) infectadas atuam secretando citocinas como a IL-12 e apresentam antígenos para as células T, o que auxilia no adequado desenvolvimento da resposta celular contra o DENV (OLAGNIER et al., 2016).

### **1.3 Imunidade adaptativa na infecção pelo *Dengue virus***

#### **1.3.1 Imunidade humoral**

Nos pacientes com dengue, ocorre uma resposta humoral intensa, comandada por plasmócitos gerados a partir de células B ativadas. A produção de IgM pode ser detectada no sangue de pacientes no quinto dia de sintoma e tem seu pico por volta do sétimo a oitavo dia de doença e vai decaindo lentamente, sendo que em cerca de dois meses após a infecção não são mais detectadas no sangue. Já as IgG tem seu pico de produção por volta de duas semanas após o início dos sintomas e pode perdurar por toda a vida, gerando imunidade permanente para aquele sorotipo viral (GUZMAN et al., 2016).

No DENV as principais regiões imunogênicas são as proteínas E, pré-M e NS1 (figura 4A). A maior gama de anticorpos produzidos pelas células B é direcionada contra a proteína E, presente na superfície do vírus. Os anticorpos são produzidos contra inúmeros epítomos, presentes nos três domínios da proteína E e apresentam graus variados de reação cruzada entre os quatro sorotipos, devido a grande similaridade (60-70%) apresentada por esta proteína (KHETARPAL; KHANNA, 2016). Devido à conformação dimérica da proteína E no vírus maduro, nem todos os epítomos nos três domínios estão livres para a ligação de anticorpos. O EDIII, que parece ser responsável pela ligação do vírus ao receptor da célula

hospedeira, é o domínio que provoca a produção de anticorpos fortemente neutralizantes e sorotipo específico. Já os anticorpos contra o EDII, domínio que contém a alça de fusão (Fusion loop), não podem se ligar ao vírus maduro no meio extracelular, porém quando o vírus se encontra no endossomo, ocorre uma mudança estrutural devido ao pH, tornando essa região acessível aos anticorpos, a ligação dos anticorpos bloqueia a fusão da membrana viral com a membrana do endossomo (figura 4B). Nos vírus imaturos, a proteína pr/M está exposta e torna-se alvo dos anticorpos, porém no vírus maduro a proteína M está oculta pelos dímeros de proteína E, não estando mais acessível para os anticorpos, no meio extracelular. Por fim, a proteína NS1 é produzida na célula hospedeira, mas não é incorporada ao vírus, pode ser encontrada na superfície das células infectadas ou serem secretadas. Os anticorpos contra NS1 da superfície celular podem promover a lise mediada pelo complemento das células infectadas (HERRERO et al., 2013; ROTHMAN, 2011).

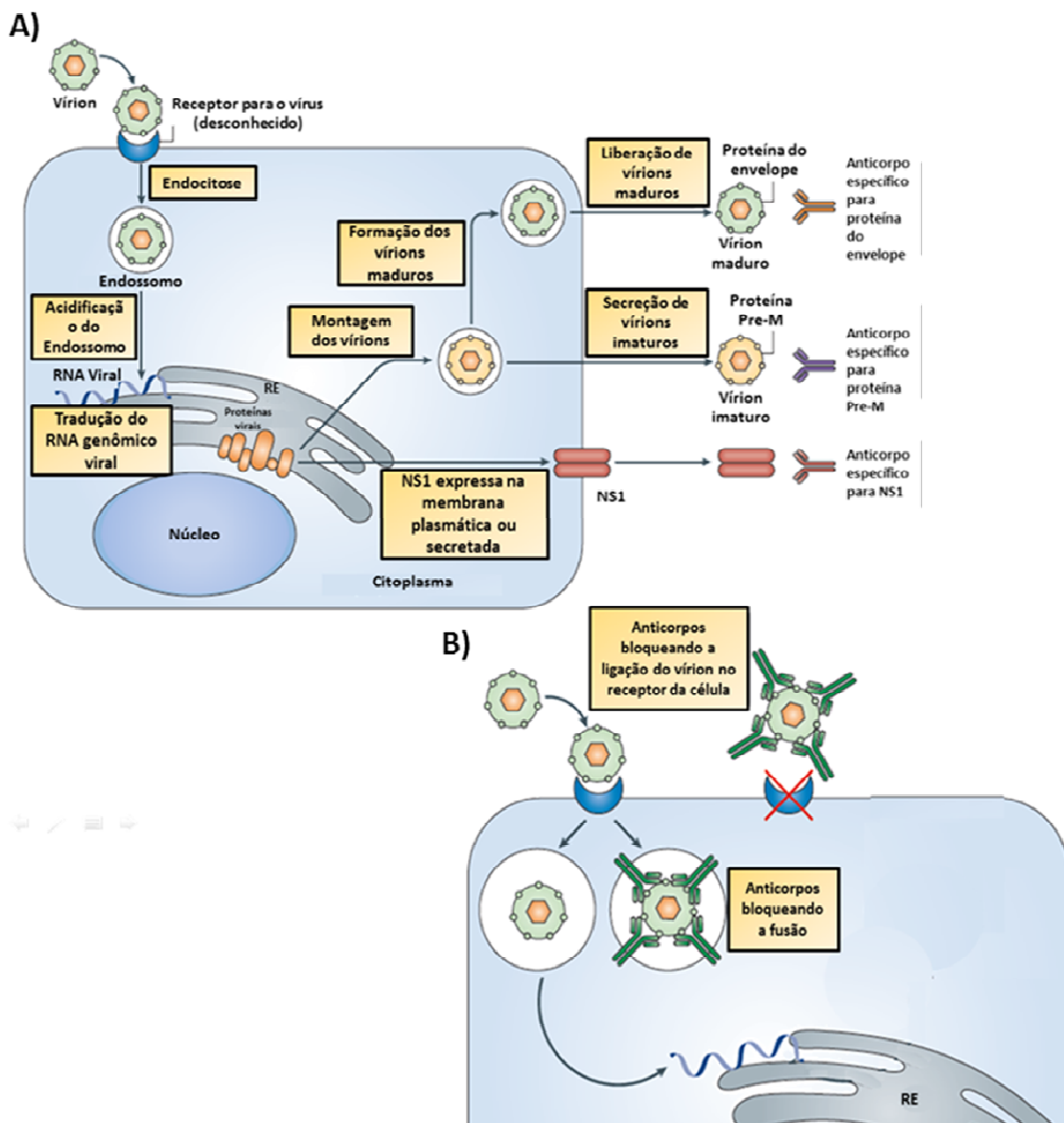


Figura 4- Imunidade humoral na infecção pelo Dengue virus. Desenho esquemático mostrando a resposta humoral. Em (A): Fontes de antígenos no DENV. Em (B): Neutralização viral. Fonte: Adaptado de Rothman et al 2011.

### 1.3.2 Imunidade celular

As células T específicas para o DENV reconhecem as células infectadas com vírus e respondem com diversas funções efetoras como a expansão clonal, a lise da célula alvo e a produção de uma variedade de citocinas. Na dengue, o padrão de produção de citocinas é predominante Th1, com a produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, além da produção de quimiocina como CCL4 (MIP-1 $\beta$ ). (BASHYAM; GREEN; ROTHMAN, 2006; MANGADA; ROTHMAN, 2005).

A resposta celular na dengue é bem menos estudada que a resposta humoral. No entanto, a destruição de células infectadas pelo DENV como macrófagos e monócitos, por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a produção de citocinas antivirais e a ativação de células B e células T CD8<sup>+</sup> efectoras por células T CD4<sup>+</sup>, podem teoricamente restringir a replicação viral e inibir o desenvolvimento da doença (ROTHMAN, 2011).

Vários estudos têm mostrado que a proteína não estrutural NS3 do DENV, possui os principais epítomos reconhecidos tanto por células T CD8<sup>+</sup> quanto T CD4<sup>+</sup>, quando apresentados pelos MHC de classe I e classe II, respectivamente. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> quando ativados na dengue são potentes produtores de citocinas, já os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, apresentam quando ativados intensa atividade citotóxica (figura 5) (ROTHMAN, 2011).

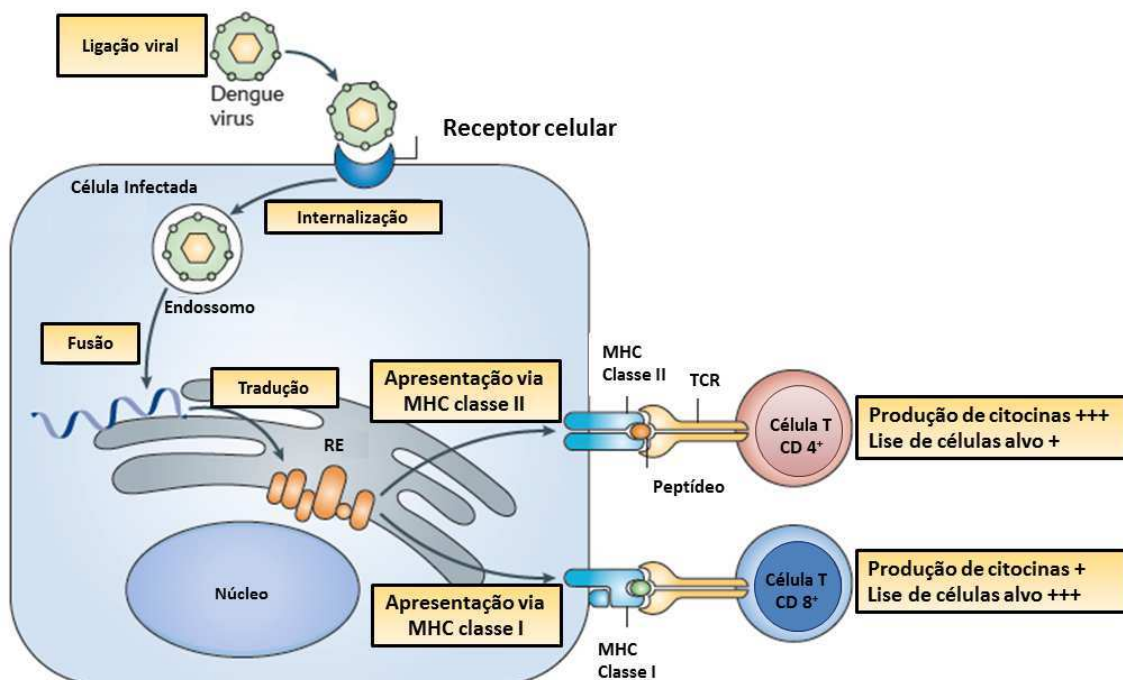


Figura 5- Imunidade celular na infecção pelo Dengue virus. Desenho esquemático mostrando a apresentação de epítomos do DENV para linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Fonte: adaptado de (Rothman et al 2011).

#### 1.4 Patogênese da infecção pelo *Dengue virus*

Não é totalmente compreendido porque alguns indivíduos resolvem a infecção pelo DENV rapidamente e sem complicações, enquanto outros apresentam extravasamento vascular potencialmente fatal ou hemorragia grave. Ao longo dos anos, diversas teorias têm sido propostas para tentar explicar as diferenças na evolução clínica da dengue. Atualmente, a mais aceita é a teoria da multicausalidade que se baseia em uma combinação de fatores do

hospedeiro, virais e imunológicos para explicar as diferenças na patogênese da infecção pelo DENV (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Características individuais como sexo, idade, tamanho corporal, estado nutricional entre outros já foram discutidos em relação à evolução clínica da dengue. Além disso, fatores genéticos tem conseguido destaque na tentativa de compreender a patogênese da dengue (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Mais de 2000 genes, principalmente relacionados à resposta imune inata e a apoptose, foram testados na fase aguda de pacientes com diferentes manifestações clínicas de dengue e estavam diferencialmente expressos em cada grupo (NASCIMENTO et al., 2009). Genes pró-apoptóticos como MAGED1 e PRDX4 estavam mais expressos em pacientes com dengue grave, em contraste os CFD, FCGR3B e PSMB9 se mostraram menos expressos em pacientes que evoluíram para quadros mais graves de dengue (DA SILVA et al., 2013). Outro exemplo da importância de fatores genéticos na patogênese da dengue é a deficiência na enzima glicose-6- fosfato desidrogenase, causada por alteração genética, que leva ao maior estresse oxidativo na célula que é conhecido por aumentar os níveis de receptores virais nas células alvo e aumentar a produção de partículas virais. Este aumento de carga viral tem sido relacionado a casos mais graves de dengue (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Com relação aos fatores virais, foi visto que alterações genéticas no DENV podem afetar a capacidade de transmissão do vírus em mosquitos e/ou a evolução clínica da doença em seres humanos infectados (GUZMAN et al., 2016). Por exemplo, alguns estudos demonstraram que DENV-2 amostra asiática gera títulos virais mais elevados nas células dendríticas humanas, infecta mosquitos de forma mais eficiente e é transmitido a uma taxa maior do que o DENV-2 amostra americana (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; COLOGNA; RICO-HESSE, 2003).

Os fatores imunológicos certamente tem um importante papel na patogênese da dengue e várias teorias a cerca da resposta imunológica têm sido propostas para explicar o intenso extravasamento vascular e sangramento vistos nos quadros graves da doença. Muitas dessas teorias postulam que a produção exacerbada de mediadores inflamatórios é a chave para o entendimento da patogênese da dengue (MALAVIGE; OGG, 2017).

O fenômeno de potencialização dependente de anticorpos (ADE - do inglês **Antibody dependent enhancement**) é uma das principais teorias que tenta explicar o agravamento do quadro de dengue em infecções secundárias por um sorotipo de DENV diferente da primeira infecção (HALSTEAD, 2016). Essa teoria postula que os anticorpos neutralizantes

produzidos na primeira infecção contra a proteína E são incapazes de neutralizar um vírus heterosorotípico, seja por baixa avidéz de ligação ou quantidade insuficiente de anticorpos. Essa incapacidade acontece principalmente devido a diferenças de similaridade entre a proteína E nos quatro sorotipos, que varia de 30-35% da sequência de aminoácidos, resultando na opsonização dos vírus e direcionamento, via receptor Fc, para os monócitos e macrófagos, que são as principais células para replicação viral *in vivo*, aumentando assim o número de partículas infectivas (ROBERTS, 2015). Outra hipótese também discutida é que essa potencialização também pode ser mediada por anticorpos contra a proteína pr/M. Neste caso acredita-se que os anticorpos anti-pr/M se ligam aos vírus imaturos sem neutralizá-los e favorecem sua captação por monócitos e macrófagos. Quando internalizados pelos fagócitos, a furina age quebrando a ligação entre pr e M e gera vírus maduros e capazes de infectar outras células, favorecendo assim a disseminação viral (ROTHMAN, 2011).

Além disso, acredita-se que nas infecções heterosorotípicas, as células T CD8 de memória respondem de modo ineficiente às diferenças nas sequências dos peptídeos entre os diferentes sorotipos de DENV. Essa resposta inadequada não acarreta um adequado controle dos focos de infecção viral, já que a capacidade citotóxica está reduzida. Por outro lado, a expansão clonal é seguida do aumento da produção de citocinas como IL-2 e TNF- $\alpha$ , aumentando a permeabilidade vascular. Essa alteração na resposta imune de células T CD8<sup>+</sup> de memória da infecção anterior é referida como pecado antigênico original (do inglês 'original antigenic sin') (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Outro aspecto que também foi relatado é que a ativação do sistema de complemento pelo complexo vírus-anticorpo, bem como por várias citocinas parece exercer um importante papel na patogênese da dengue por meio da liberação de C3a e C5a, que são potentes anafilatoxinas que tem efeitos diretos sobre a permeabilidade vascular (NIELSEN, 2009). Além disso, os efeitos sinérgicos das citocinas IFN- $\gamma$ , do TNF- $\alpha$  e das proteínas ativas do complemento desencadeiam o extravasamento de plasma, principalmente, na infecção secundária pelo vírus da dengue (LEI et al., 2001).

Apesar da maioria das teorias, relacionadas à resposta imunológica na patogênese da dengue, se referir a uma segunda infecção heterosorotípica como a principal causa de agravamento da dengue, acontecem casos de dengue grave na primeira infecção e mesmo a teoria da multicausalidade não é capaz de explicar completamente a patogênese da dengue (LEI et al., 2001). As diversas teorias imunológicas para explicar a patogênese da dengue têm em comum a produção exacerbada de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas,

proteínas do complemento, anticorpos solúveis entre outros. Esses mediadores estão relacionados com o extravasamento vascular e o sangramento visto nos quadros graves de dengue (JOHN; LIN; PERNG, 2015; MALAVIGE; OGG, 2017).

### **1.5 Inflamação na dengue**

A resposta inflamatória é essencial para uma rápida depuração viral, o que na maioria dos casos de dengue é suficiente para impedir a progressão da doença. Porém, como mencionado no tópico anterior, várias teorias envolvendo fatores imunológicos para o agravamento da dengue sugerem que os quadros graves da doença estejam relacionados ao aumento da carga viral que desencadeia a ativação descontrolada de células do sistema imune com aumento da produção de mediadores inflamatórios e consequente disfunção das células endoteliais. A produção exacerbada desses mediadores correlaciona-se positivamente com a disfunção hepática, trombocitopenia, extravasamento vascular e choque hemorrágico visto nos quadros graves de dengue (COSTA et al., 2013).

A resposta inflamatória se inicia com a infecção de células dendríticas que leva a ativação da resposta imunológica em diferentes células do hospedeiro, como, por exemplo, monócitos e macrófagos. Essas células apresentam os antígenos para as células T que respondem produzindo grande quantidade de citocinas e quimiocinas. Como mencionado anteriormente o fenômeno ADE parece ser um importante gatilho para a produção exacerbada dessas moléculas, por meio do aumento da viremia (HERRERO et al., 2013).

Citocinas como TNF- $\alpha$  tem sido constantemente associada à gravidade da dengue, tendo sido amplamente estudada tanto em humanos quanto em modelos animais no decorrer da doença (SRIKIATKHACHORN; MATHEW; ROTHMAN, 2017). Nível elevado dessa molécula tem sido observado em pacientes que evoluíram com dengue grave quando comparados àqueles que não apresentaram sinais de alarme (AZEREDO et al., 2006; BRAGA et al., 2001). Já em camundongos AG129, que desenvolvem intenso extravasamento vascular após infecção por DENV, foi observado altos níveis de TNF- $\alpha$  e o tratamento desses camundongos com anti-TNF- $\alpha$  resultou com a diminuição do extravasamento vascular, apoiando o papel do TNF- $\alpha$  na permeabilidade vascular (SHRESTA et al., 2006). Além disso, o TNF- $\alpha$  é um importante indutor da expressão de fator tecidual (TF) que pode iniciar a cascata de coagulação. Portanto, o TNF- $\alpha$  pode desempenhar um papel importante nos dois principais processos patológicos da dengue grave: extravasamento vascular e sangramento (SRIKIATKHACHORN; MATHEW; ROTHMAN, 2017).



Semelhante ao TNF- $\alpha$ , altos níveis da quimiocina MCP-1, também foram observados em pacientes com dengue grave. Quando células endoteliais foram expostas a monócitos infectados com DENV, contendo MCP-1 a permeabilidade vascular foi maior e a utilização de anticorpos anti-MCP-1, diminuiu em 70% o extravasamento vascular, indicando que essa quimiocina tem um papel no extravasamento vascular (LEE et al., 2006).

Diversas outras citocinas e quimiocinas têm sido relacionadas com o agravamento da dengue, como por exemplo, IL-6, CXCL10, CXCL11 e RANTES, que são secretadas por células endoteliais e podem aumentar a permeabilidade vascular e ter propriedades quimioatrativas que podem contribuir para inflamação e vazamento de plasma *in vivo* (KELLEY; KAUFUSI; NERURKAR, 2012). Já a IL-8, IL-10, CCL-2, CCL-3, CXCL-8 e IFN- $\gamma$ , são outras citocinas e quimiocinas cuja produção ampliada tem sido relacionada à lesão ao endotélio vascular, aumentando a permeabilidade vascular e as manifestações hemorrágicas (COSTA et al., 2013).

Por outro lado, as células B ativadas após a infecção por DENV geram uma ampla gama de anticorpos, que além de agirem contra o vírus podem afetar células endoteliais, plaquetas e ativar o sistema complemento, favorecendo o extravasamento vascular e sangramento (HERRERO et al., 2013).

Os anticorpos anti-NS1, mostraram reagir de forma cruzada contra as células endoteliais induzindo a ativação de células inflamatórias que causam dano tecidual (LIN et al., 2005). O reconhecimento parece ocorrer entre anti-NS1 e um antígeno nas células endoteliais rico em lisina humana (LYRIC). Esse reconhecimento parece ser o responsável pelo dano tecidual e consequente extravasamento vascular (LIU et al., 2011).

Além disso, a interação entre NS1 e anticorpos produzidos pelo hospedeiro ativam o complexo do complemento SC5b-9, que acredita-se que contribua para o extravasamento vascular (AVIRUTNAN et al., 2006). NS1 solúvel também é capaz de ativar o sistema de complemento, por interagir com o fator inibitório do complemento (Clu). Essa molécula inibe a etapa final da cascata do complemento e a interação com a proteína NS1 diminui a disponibilidade de Clu, favorecendo a ativação do complemento (KUROSU et al., 2007). Como mencionado anteriormente algumas proteínas do complemento são potentes anafilatoxinas que aumentam a permeabilidade vascular (NIELSEN, 2009).

Anticorpos anti-plaquetários também tem sido relacionados com o agravamento da dengue por causar trombocitopenia. O tratamento de plaquetas humanas com soro de pacientes com dengue mostrou reação cruzada entre IgM e as plaquetas. Além disso, foi



observado um maior nível de anti-IgM plaquetário no plasma de pacientes com dengue grave quando comparado àqueles pacientes que não apresentaram sinal de alarme (LIN et al., 2001).

A figura 6 mostra a produção de mediadores inflamatórios após a infecção por DENV e o papel desses mediadores no agravamento da doença.

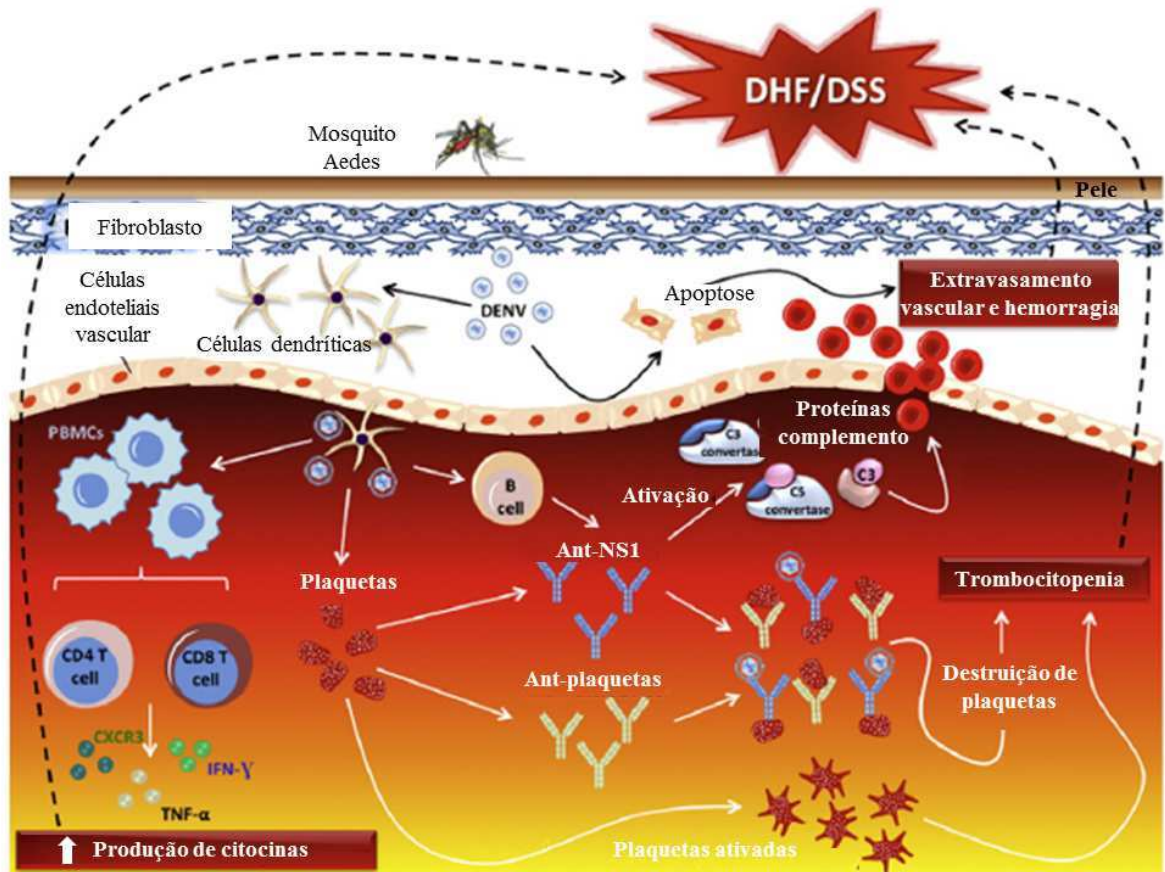


Figura 6- Mediadores inflamatórios na dengue grave Produção de mediadores inflamatórios por células do sistema imunológico e a ação desses mediadores no extravasamento vascular, trombocitopenia e hemorragia visto na dengue grave. Fonte: adaptado de (Herrero et al 2013).

Apesar do indiscutível papel dos mediadores inflamatórios na exacerbação da inflamação na patogênese da dengue, os eicosanoides, que são potentes moléculas bioativas com importante atividade na homeostase vascular e na agregação plaquetária são pouco estudados na dengue.

## 1.6 Eicosanoides

Os eicosanoides são lipídios bioativos derivados do ácido araquidônico que regulam um conjunto diverso de mecanismos homeostáticos e inflamatórios envolvidos em numerosas doenças (DENNIS; NORRIS, 2015). Em células de mamíferos, a biossíntese dos eicosanoides é iniciada principalmente pela ativação da fosfolipase A2 e a liberação do ácido araquidônico

(AA) a partir dos fosfolipídeos de membrana. O ácido araquidônico é, então, subsequentemente transformado pelas vias da cicloxigenase (COX) e da lipoxigenase (LOX) em prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que são coletivamente conhecidos como eicosanoides (figura 7) (NICOLAOU, 2013).

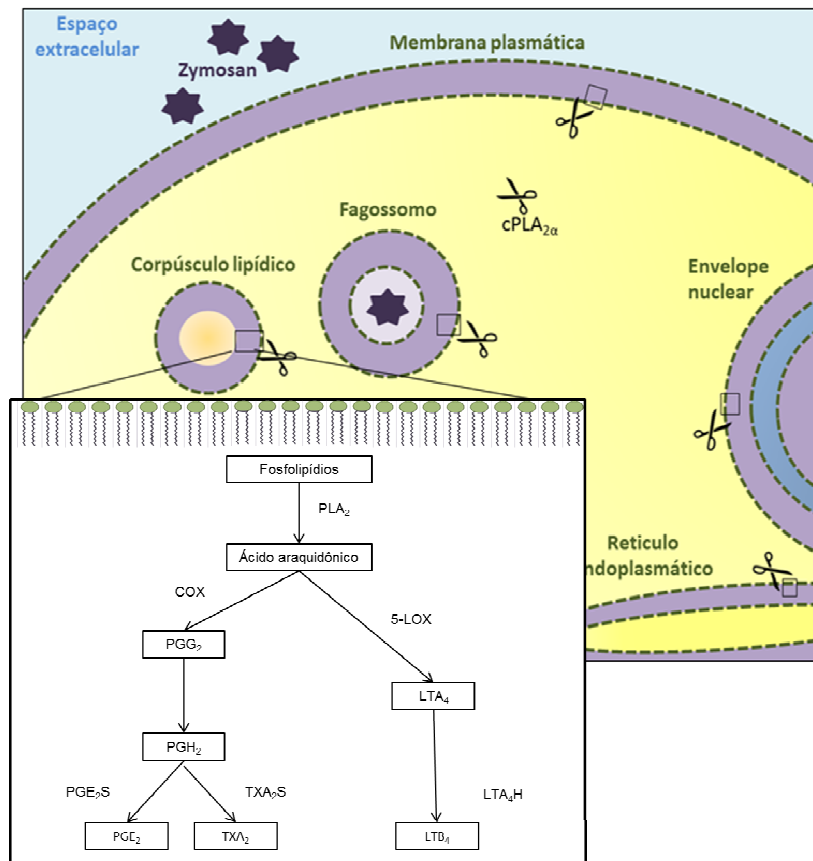


Figura 7- Síntese de eicosanoides. Desenho esquemático das principais vias de síntese de eicosanoides e os locais onde ocorrem nas células. Fonte: Adaptado de Bozza et al 2011.

Destas enzimas, as mais importantes fisiologicamente são as cicloxigenases (COX), que iniciam a síntese das prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX). Duas isoformas de COX são conhecidas: a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é constitutiva, enquanto que estímulos inflamatórios e fatores de crescimento induzem expressão de COX-2. Na via da LOX, a 5-lipoxigenase (5-LOX) é a enzima chave responsável pela formação dos leucotrienos (LTs) e de outros eicosanoides oxigenados na posição 5 (NICOLAOU, 2013). As enzimas COXs geram PGG<sub>2</sub> pela oxidação do AA, um metabólito instável que é rapidamente reduzido a PGH<sub>2</sub>, que é então convertido ao prostanóide maduro pela ação de enzimas específicas (BOZZA et al., 2011; HOGGATT; PELUS, 2010). A prostaglandina E<sub>2</sub> sintase (PGE<sub>2</sub>S) é a enzima responsável pela conversão de PGH<sub>2</sub> em prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), enquanto que a tromboxano A<sub>2</sub> sintase (TXA<sub>2</sub>S) converte PGH<sub>2</sub> para tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (RICCIOTTI;

FITZGERALD, 2011). Já a 5-LOX é a enzima responsável pela oxidação de AA em leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) um intermediário instável que é rapidamente convertido á leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) pela leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolase (LTA<sub>4</sub>H) (HOGGATT; PELUS, 2010).

Em condições fisiológicas, a PGE<sub>2</sub> é um importante mediador de muitas funções biológicas, tais como regulação da resposta imune, pressão sanguínea, integridade gastrointestinal e fertilidade. Na inflamação, a PGE<sub>2</sub> está envolvida nos processos que geram os sinais clássicos de inflamação: rubor, edema e dor. O rubor e edema resultam do fluxo sanguíneo aumentado para os tecidos inflamados como uma consequência da dilatação arterial e permeabilidade vascular aumentada. Já a dor resulta da ação da PGE<sub>2</sub> sobre os neurônios sensoriais periféricos e nos sítios centrais localizados na medula espinhal e cérebro (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

A PGE<sub>2</sub>, por meio da ligação a diferentes receptores, também pode regular a função de diversas células do sistema imunitário, incluindo macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B, levando tanto a efeitos pró- quanto anti-inflamatórios. Como um mediador pró-inflamatório, a PGE<sub>2</sub> contribui para a regulação da expressão do perfil de citocinas em células dendríticas e foi relatada como capaz de induzir a diferenciação de linfócitos T para uma resposta Th1, Th2 ou Th17. Além disso, foi observado que a PGE<sub>2</sub> induz a migração de células dendríticas para os linfonodos, além de estimular a expressão de moléculas da superfamília do TNF na membrana dessas células resultando em ativação aumentada de linfócitos T. Em contraste, também foi demonstrado que PGE<sub>2</sub> suprime diferenciação Th1, funções de linfócitos B e reações alérgicas, além de neutrófilos, monócitos e células NK (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

O TXA<sub>2</sub> é produzido principalmente nas plaquetas pela ação de COX-1, mas também é produzida em macrófagos por COX-2 (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). A atividade do TXA<sub>2</sub> é mediada principalmente através do receptor de prostanóide (TP - do inglês **prostanoid receptor**), que é um receptor acoplado à proteína G. A ativação do receptor TP acarreta diversas respostas fisiológicas e fisiopatológicas, incluindo adesão e agregação plaquetária, contração e proliferação de células musculares lisas, o que favorece a vasoconstrição, ativação da resposta inflamatória de células endoteliais e diminuição da ativação de células T (DENNIS; NORRIS, 2015).

Similarmente, distintos mediadores lipídicos podem ser gerados pelo metabolismo do ácido araquidônico pela 5-LOX, dentre os quais se encontram os leucotrienos, que são moléculas produzidas predominantemente por células inflamatórias, tais como leucócitos

polimorfonucleares, macrófagos ativados e mastócitos. Um dos leucotrienos gerados a partir da via da 5-LOX é o LTB<sub>4</sub>, que ativa as células inflamatórias pela ligação a dois receptores de superfície celular que são conhecidos como receptor de leucotrieno B<sub>4</sub> (BLT1 e BLT2). O BLT1 é expresso apenas em células inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos e eosinófilos e apresenta uma alta afinidade apenas para o LTB<sub>4</sub>. Diferentemente, o BLT2 é um receptor de baixa afinidade que é expresso ubiquamente (HEDI; NORBERT, 2004). Dentre outras funções, o LTB<sub>4</sub> estimula o recrutamento de células inflamatórias, incluindo os neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, mastócitos, células dendríticas e linfócitos T efetores para os tecidos inflamados em várias doenças (OHNISHI; MIYAHARA; GELFAND, 2008). Além disso, também já foi observado que o LTB<sub>4</sub> estimula monócitos a produzirem citocinas pró-inflamatórias, aumenta a citotoxicidade das células NK e aumenta a diferenciação dos linfócitos B em células produtoras de IgE (HEDI; NORBERT, 2004).

As funções desempenhadas pelos eicosanoides já foram investigadas em diversas doenças infecciosas (AGARD; ASAKRAH; MORICI, 2013; MCCARTHY; WEINBERG, 2012; PRATT; BROWN, 2014; SEREZANI et al., 2006) e inflamatórias (LIU; YOKOMIZO, 2015; NICOLAOU, 2013). Porém, o papel das enzimas formadoras dos eicosanoides, bem como de seus produtos na dengue ainda é pouco estudado.

Preeyasombat et al. (1999) relataram que os níveis de TXA<sub>2</sub>, eram mais baixos no plasma de pacientes com síndrome do choque da dengue, quando comparados aos níveis plasmáticos desse eicosanoides em pacientes com dengue grave (PREEYASOMBAT et al., 1999). Em outro estudo, Loke et al. (2013) demonstraram que os níveis de LTB<sub>4</sub>, um produto da via LOX, foram maiores no plasma de pacientes durante os estágios febril e defervescente da dengue. Esses autores também observaram níveis aumentados de LTB<sub>4</sub> no sobrenadante da cultura de neutrófilos, o que eles atribuíram ao aumento da expressão de 5-LOX nessas células após a estimulação *in vitro* pelo DENV (LOKE et al., 2013). Mais recentemente, níveis aumentados de PGE<sub>2</sub>, foram detectados em soros de pacientes com dengue grave. Além disso, a expressão gênica elevada de COX-2 em células sanguíneas de pacientes com dengue também foi observada nesses mesmos pacientes (LIN et al., 2017). No entanto, até o momento, não há estudo comparando simultaneamente as vias da COX e LOX e seus produtos durante o curso natural da dengue.

## 1.7 Corpúsculos lipídicos na síntese de eicosanoides

A biossíntese dos eicosanoides pode ocorrer em três compartimentos celulares: 1) corpúsculos lipídicos (CL), 2) membrana nuclear e 3) fagossomas (figura 7) (BOZZA et al., 2011). O tamanho, regulação, composição e conseqüentemente, a função de CL pode variar consideravelmente entre os diferentes tipos celulares. Os leucócitos têm poucos CL, mas podem ser estimulados a formar rapidamente novos CL, em resposta a inflamação (MELO et al., 2011). Nestas células, os CL contêm lipídios araquidônílicos, que servem como precursores para a síntese de eicosanoides, e ainda todas as enzimas necessárias para esta síntese, incluindo COX, PGE<sub>2</sub>S, TXA<sub>2</sub>S, 5- e 15-lipooxigenases (5- e 15-LOX) e LTA<sub>4</sub>H. Tanto a formação dos CL quanto a compartimentalização das enzimas dentro dos CL são eventos celulares altamente regulados. Acúmulo de CL em leucócitos já foi observado em diversas doenças inflamatórias e infecciosas, incluindo em macrófagos de lesões ateroscleróticas, leucócitos de articulações de pacientes com artrite, lavado bronco-alveolar de pacientes com síndrome da angústia respiratória, eosinófilos na inflamação alérgica e leucócitos peritoneais e sanguíneos na sepse bacteriana (BOZZA et al., 2011).

Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas ricas em lipídeos, que estão presentes em praticamente todos os organismos, incluindo plantas, leveduras, procariotos e células de animais. Diferente das organelas e vesículas membranosas que possuem um conteúdo aquoso rodeado por uma membrana composta por uma bicamada lipídica, são estruturas compostas por um cerne de lipídios neutros (triacilglicerol, diacilglicerol e éster de colesterol), circundado por uma monocamada de fosfolipídios contendo proteínas associadas (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007).

São organelas celulares que foram anteriormente relacionadas ao acúmulo de lipídios, mas que atualmente são reconhecidas como estruturas dinâmicas envolvidas em uma variedade de funções celulares, tais como metabolismo dos lipídios, sinalização celular e inflamação. Além disso, essa organela já foi relacionada como plataforma de montagem para diferentes vírus. (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007; HERKER; OTT, 2012; MELO et al., 2011).

### 1.7.1 Corpúsculo lipídico como plataforma de montagem para o *Dengue virus*

Os CL atuam como plataforma de montagem viral, para diferentes vírus como o vírus da hepatite C, Rotavírus, DENV entre outros (CARVALHO et al., 2012; HERKER; OTT, 2012). Samsa e colaboradores propuseram que os CL sequestram as proteínas do capsídeo do

DENV e participam do processo de empacotamento do genoma (SAMSA et al., 2009). Posteriormente, Carvalho e colaboradores confirmaram a interação entre a proteína do capsídeo viral e proteínas do CL principalmente a perilipin 3 (TIP47) (CARVALHO et al., 2012). O aumento de CL já foi observado em leucócitos durante a infecção natural por DENV (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2010). Porém, esse aumento de CL não foi correlacionado *in vivo* com a replicação viral, nem com a síntese de eicosanoides.

## 2 JUSTIFICATIVA

A dengue é um grave problema de saúde pública, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. A doença é causada pelo DENV, vírus capaz de gerar um amplo espectro de sintomas, que pode resultar em óbito. Não se sabe ao certo o porquê de algumas pessoas resolverem facilmente a infecção por DENV, enquanto outras evoluem para os casos mais graves da doença com intenso extravasamento vascular e sangramento. Muitas teorias foram postuladas para tentar explicar as diferenças na evolução clínica da dengue, a mais aceita atualmente é a teoria da multicausalidade que envolvem fatores do hospedeiro, virais e imunológicos, porém mesmo essa teoria não é capaz de explicar completamente este fenômeno. Muitas das teorias envolvendo fatores imunológicos têm a produção exacerbada de mediadores inflamatórios como, citocinas, proteínas do complemento e anticorpos solúveis como o ponto chave para o dano vascular visto na dengue grave. Os eicosanoides, importantes mediadores inflamatórios envolvidos em processos homeostáticos e inflamatórios, são pouco estudados na dengue. Moléculas como TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> atuam na prevenção ou favorecimento do extravasamento vascular e sangramento, portanto apresenta possível relação com o desenvolvimento do quadro grave de dengue, o que faz necessário a quantificação dessas moléculas na infecção natural pelo DENV. Os corpúsculos lipídicos nos leucócitos do sangue periférico são importantes fontes de eicosanoides em diferentes doenças, podendo ser também fonte dessas moléculas na dengue. Além disso, os corpúsculos lipídicos já foram descritos como plataforma de montagem para o DENV *in vitro*, o que torna o conhecimento a cerca dessa molécula na infecção natural por DENV ainda mais significativo. O maior conhecimento sobre eicosanoides e corpúsculos lipídicos pode favorecer o desenvolvimento de fármacos que evitem o agravamento da doença.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os níveis dos corpúsculos lipídicos e das enzimas formadoras de eicosanoides em leucócitos do sangue periférico e de eicosanoides no plasma durante a infecção natural pelo Dengue virus.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Quantificar os níveis plasmáticos das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, IL-12p70, IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  nos indivíduos com dengue;
- b) Mensurar os níveis de PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> no plasma dos indivíduos com dengue;
- c) Quantificar os níveis de corpúsculos lipídicos nas diferentes populações de leucócitos do sangue periférico dos indivíduos com dengue; e
- d) Quantificar os níveis de mRNA das enzimas formadoras de eicosanoides (COX-2, TXA<sub>2</sub>S, PGE<sub>2</sub>S, 5-LOX e LTA<sub>4</sub>H), nos leucócitos do sangue periférico dos indivíduos com dengue.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Estratégia experimental

O trabalho foi desenvolvido em duas etapas principais, sendo a **primeira etapa** o recrutamento dos participantes, coleta e caracterização de amostras biológicas. Já a **segunda etapa** consistiu em avaliar a presença de eicosanoides no plasma dos participantes e determinar se os CL presentes nos leucócitos são fonte de eicosanoides na dengue. A figura 8 demonstra o esquema metodológico empregado nesse trabalho.

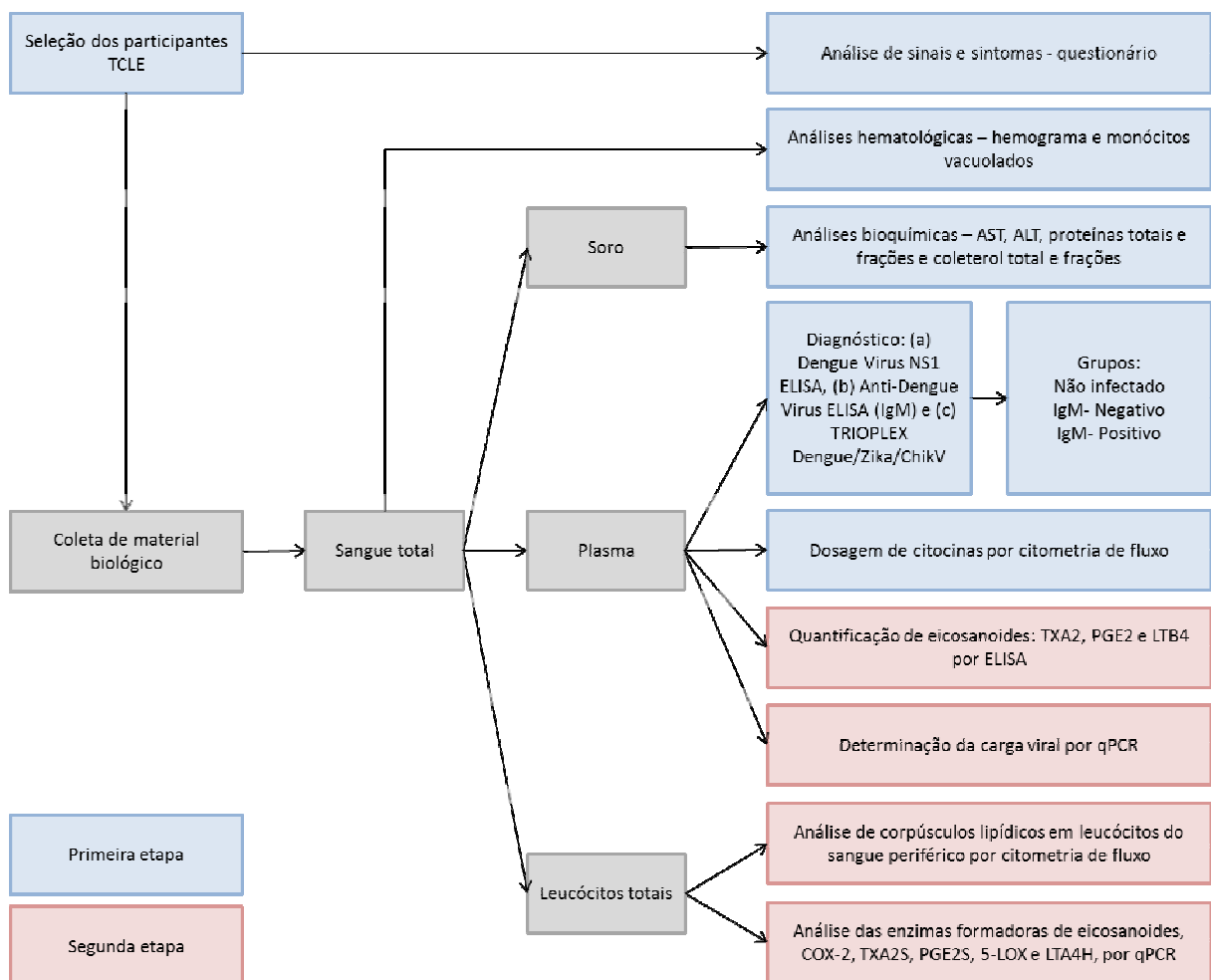


Figura 8- Estratégia experimental. Esquema metodológico empregado no desenvolvimento do trabalho

### 4.2 Considerações éticas

As normas éticas para a pesquisa científica em seres humanos estabelecidas pela Declaração de Helsinki (AMM, 2013) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, resolução 466/12

(MS, 2012) foram rigorosamente observadas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de  tica em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Instituto René Rachou CAAE: 55135116.0.0000.5091 (Anexo 1).

### **4.3 Sele o dos participantes**

Os participantes foram recrutados na Santa Casa de Misericórdia (SCM) de Santo Antônio do Monte - MG. A médica Lais Oliveira Brasil de Sousa, colaboradora do projeto, apresentou o estudo aos seus pacientes com sinais e sintomas clínicos de dengue e os convidou a participar do estudo. Para aqueles que concordaram em participar, foi explicado os objetivos da pesquisa e os procedimentos a serem realizados. Todos os participantes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Após a assinatura do TCLE, a médica preencheu um questionário contendo todas as informa es clínicas dos participantes (Apêndice 2). Além dos participantes com sintomas de dengue, a médica também recrutou voluntários que não apresentaram nenhum sinal ou sintoma relacionado à dengue e também leram e assinaram o TCLE. Foram excluídos do estudo menores de 18 anos. A Dra. Lais Sousa avaliou o quadro clínico de cada um dos participantes com dengue através da análise dos sinais e sintomas e por meio de exames laboratoriais.

A médica indicou a participa o no estudo de 28 indivíduos com sinais e sintomas de dengue, cuja infec o foi confirmada pela positividade em pelo menos um dos seguintes testes: (a) Dengue Virus NS1 ELISA (Euroimmun, Luebeck, Germany); (b) Anti-Dengue Virus ELISA (IgM) (Euroimmun); e (c) TRIOPLEX Dengue/Zika/ChikV kit (Eco Diagnóstica, Minas Gerais, Brazil). Indicou também   participa o de 12 voluntários não infectados e a possibilidade de infec o assintomática pelo DENV foi descartada pela aplica o dos mesmos testes.

Todos os 40 voluntários foram encaminhados para coleta de sangue que foi realizada pelo Laboratório Santo Antônio, sediado na Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte. Foi coletado de cada voluntário 20 mL de sangue total, divididos em 1 tubo seco de 4 mL BD Vacutainer (BD Biosciences, California, USA) para obten o de soro e realiza o das análises bioquímicas e 4 tubos com EDTA de 4mL BD Vacutainer (BD Biosciences), sendo 1 tubo para as análises hematológicas e 3 tubos encaminhados para o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto René Rachou, onde as demais análises foram realizadas.

#### 4.4 Análises hematológicas e bioquímicas

Para todos os participantes do estudo, foi realizado o hemograma com contagem de plaquetas e foram mensurados também os níveis séricos das enzimas AST e ALT, assim como das proteínas totais e frações, além da dosagem de triglicérides, colesterol total, bem como do colesterol ligado às lipoproteínas de alta (HDL), baixa (LDL) e muito baixa (VLDL) densidade. Todos os exames foram realizados com amostras coletadas após jejum de 8 a 12 horas e seguiram rigorosamente as normas de controle de qualidade do laboratório. A tabela 1 mostra o método empregado para análise de cada um dos exames mencionados anteriormente além dos valores de referência para adultos e equipamento utilizado.

**Tabela 1** – Informação técnica dos exames laboratoriais

	Equipamento	Exame	Valores de referência	Método
Análise hematológica (mm <sup>3</sup> )	ABX Micros 60 (Horiba, Quioto, Japão)	Hematócrito (%)	F: 35 a 47 M: 40 a 54	Impedância
		Hemácias	F: 4 a 5,6 M: 4,5 a 6,5	Impedância
		Hemoglobina (g/dL)	F: 12 a 16,5 M: 13,5 a 18	Impedância
		Global de leucócitos	4.000 a 11.000	Impedância
		Segmentados	2.200 a 7.150	Impedância
		Monócitos	160 a 880	Impedância
		Linfócitos	800 a 3.300	Impedância
		Plaquetas	150.000 a 450.000	Impedância
Análise bioquímica	Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Suíça)	AST	5 a 38 U/mL	Cinético – UV
		ALT	10 a 40 U/mL	Cinético – UV
		Proteínas totais (PT)	6,0 a 8,0 g/dL	Colorimétrico – Biureto
		Albumina (Alb)	3,5 a 5,5 g/dL	Colorimétrico - Verde de Bromocresol.
		Globulina (Glob)		Globulina = PT - Alb
		Triglicérides (TG)	10 a 190 mg/dL	Enzimático-Colorimétrico
		Colesterol total (CT)	Até 239 mg/dL	Enzimático - Colorimétrico
		HDL	H > 55 mg/dL M > 65 mg/dL	Enzimático-Colorimétrico (Precipitação Seletiva).
		LDL	Até 160 mg/dL	LDL = CT - (HDL + VLDL)
		VLDL		VLDL = Triglicérides / 5

#### **4.5 Dosagem dos níveis séricos de citocinas**

Para determinar os níveis plasmáticos das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 foi utilizado o kit BD Citometria Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine (Número de catálogo 551809, BD Biosciences) e para determinar os níveis das citocinas IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  foi utilizado o kit BD Citometria Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (Número de catálogo 551811, BD Biosciences), de acordo com o protocolo do fabricante. Um total de 2.100 eventos (350/Bead) foi adquirido no citômetro de fluxo FACS Verse (BD Biosciences, San Jose, California, USA) e os dados foram analisados utilizando o software FCAP Array™ V3.0 (BD Biosciences).

#### **4.6 Quantificação plasmática de eicosanoides**

O plasma obtido a partir de 12 mL de sangue total coletado em EDTA foi estocado a -70°C até o momento da análise. Do volume de plasma obtido, 250  $\mu$ L foram utilizados para quantificar os níveis dos eicosanoides. Os níveis de TXA<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> foram quantificados indiretamente através de seus metabólitos estáveis utilizando Thromboxane B<sub>2</sub> ELISA Kit (Número de catálogo ab133022, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) e Prostaglandin E Metabolite ELISA Kit (Número de catálogo 514531, Cayman Chemical). Já LTB<sub>4</sub> foi quantificado utilizando Leukotriene B<sub>4</sub> ELISA Kit (Número de catálogo 520111, Cayman Chemical). Todas as reações foram realizadas de acordo com as orientações do fabricante.

#### **4.7 Determinação dos níveis de corpúsculos lipídicos em leucócitos do sangue periférico**

Cerca de 12 mL de sangue coletado em EDTA foram transferidos para um tubo de 50 mL tipo Falcon e centrifugados a 350 x g, a 18°C por 10 min. Após a centrifugação, o plasma foi retirado e armazenado a -70°C e o concentrado de células sanguíneas foi ressuscitado com PBS 0,15 M no mesmo volume de plasma retirado. Foi realizada nova centrifugação a 350 x g, a 18°C por 10 min e o sobrenadante foi retirado e descartado. A seguir, o concentrado de células foi homogeneizado e o número total de leucócitos contido na suspensão de células sanguíneas foi determinado por meio de contagem em câmara de Neubauer, após diluição de uma alíquota do concentrado de células em líquido de Turk (diluição 1:20). Posteriormente, 5 x 10<sup>5</sup> leucócitos em um volume final de 100 $\mu$ L foram adicionados a tubos de citometria de polipropileno (BD Biosciences) contendo as combinações de anticorpos descritos na tabela 2, que foram diluídos em um volume final de 20 $\mu$ L de BSA 1% em PBS 0,15 M. Após 20 min de incubação, à temperatura ambiente e protegida da luz, as células foram ressuscitadas em PBS 0,15M e centrifugadas a 350 x g, a 18°C por 7 min. Então, o sobrenadante foi descartado

e realizada a marcação dos CL pela adição da sonda fluorescente BODIPY 493/503 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluída em PBS 0,15 M, na concentração de 5 $\mu$ M. As células foram incubadas por 20 min e a seguir foi realizada a lise das hemácias por meio da incubação por 15min em solução de lise contendo formaldeído 5,4%, dietilenoglicol 3% e citrato de sódio 0,28% em água destilada. Após a lise, foi adicionado PBS 0,15 M e as células foram centrifugadas a 350 x g, a 18°C por 10min. Esse procedimento foi repetido novamente e ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em PBS 0,15 M e mantidas em geladeira até a leitura.

**Tabela 2** - Anticorpos utilizados para marcação dos leucócitos do sangue periférico para análise por citometria de fluxo

Anticorpo	Fluorescência	Número de catálogo	Título	Concentração (mg/mL)	Função e célula em que está expressa
Anti-CD16	AF700	557920	1:100	0,002 (mg/mL)	Receptores que se ligam a porção Fc de IgG. Células NK, neutrófilos e monócitos.
Anti-CD56	PeCy5	555517	1:25	*	Glicoproteína de ligação homofílica. Células NK.
Anti-CD3	PE	555333	1:50	*	Co-receptores de células T que juntamente com as cadeias $\zeta$ e o TCR formam o complexo TCR. Linfócitos T.
Anti-CD19	APC	555415	1:25	*	Co-receptor de células B para antígenos. Linfócito B.
Anti-CD14	PerCP	340585	1:50	0,5 $\mu$ g/mL	Co-receptor para ligação de PAMPs como LPS. Monócitos.
Anti-CD45	V450	560367	1:100	*	Auxiliar na ativação de leucócitos. Leucócitos em geral.
Anti-CD4	APC	555349	1:25	*	Co-receptor de linfócitos T CD4 que juntamente com o TCR se liga ao MHC II. Linfócitos T CD4 e monócitos.
Anti-CD8	PerCP	347314	1:25	0,25 $\mu$ g/mL	Co-receptor de linfócitos T CD8 T que juntamente com o TCR se liga ao MHC I. Linfócitos T CD8 e células NK.

Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences, San Jose, California, USA.

\* A concentração do anticorpo não é apresentada pelo fabricante, apenas volume total e o número de reações.

Um total de 200.000 eventos foi adquirido no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences). A compensação foi realizada com micropartículas de poliestireno conjugadas com anticorpos anti-cadeia Kappa de camundongo (BD Compbeads anti-mouse, número do catálogo 552843, BD Biosciences). Segundo instruções do fabricante, foi preparado um tubo

para cada fluorescência utilizada no experimento e um controle negativo. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo 10.1 (FlowJo, Ashland, Oregon, USA).

#### 4.7.1 Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos em leucócitos

As figuras de 9 a 13 ilustram a sequência de passos para a análise dos níveis de CL nas diferentes populações de leucócitos do sangue periférico. Amostra de um participante do grupo dengue IgM negativo foi utilizada para demonstrar a estratégia de análise.

Para determinar a intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503 em neutrófilos do sangue periférico, primeiramente foram obtidos os leucócitos, por meio das células que expressavam o marcador CD45 (figura 9A). Em seguida a população de neutrófilos foi definida por granulocidade de intermediária a alta e que expressavam CD16 (figura 9B). Posteriormente, as células simples foram selecionadas utilizando FSC-H por FSC-A (figura 9C). Por fim, IMF da sonda Bodipy 493/503 em neutrófilos foi obtida através do histograma da sonda Bodipy (figura 9D).

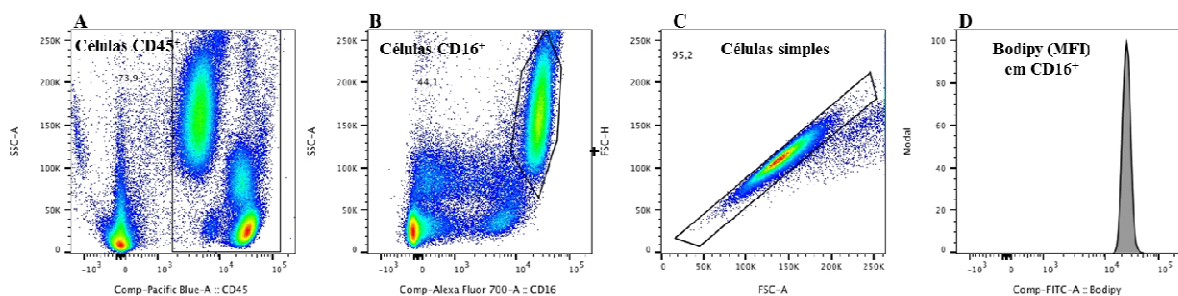


Figura 9- Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nos neutrófilos. (A) Leucócitos foram selecionados utilizando um gráfico de densidade SSC-A versus CD45. (B) Neutrófilos foram selecionados utilizando um gráfico de densidade de SSC-A versus CD16. (C) Células simples foram selecionadas com o gráfico de densidade FSC-H versus FSC-A. (D) Histograma foi utilizado para obter a intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503.

Para avaliar a IMF da sonda Bodipy 493/503 em eosinófilos, os leucócitos foram primeiramente obtidos (figura 10A), em seguida a população CD16<sup>-</sup> e tamanho intermediário, que corresponde aos eosinófilos, foi determinada (figura 10B). Posteriormente, as células simples foram selecionadas (figura 10C). Por fim, IMF da sonda Bodipy 493/503 em eosinófilos foi obtida através do histograma da sonda Bodipy (figura 10D).

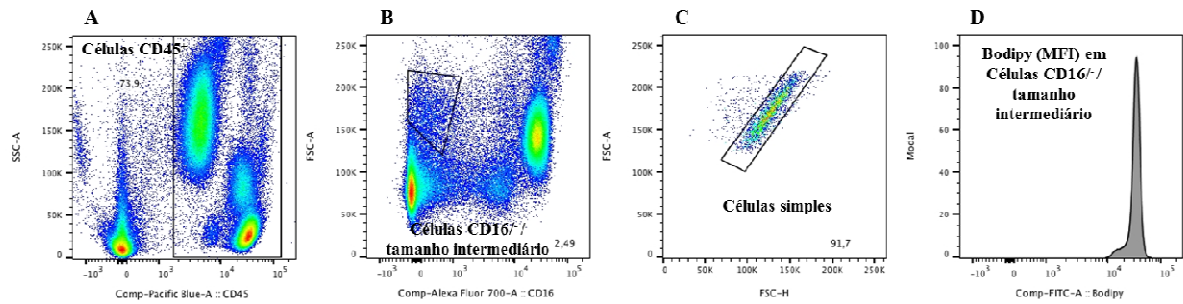


Figura 10- Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nos eosinófilos. (A) Leucócitos foram selecionados utilizando um gráfico de densidade SSC-A versus CD45. (B) Eosinófilos foram selecionados utilizando um gráfico de densidade de FSC-A versus CD16. (C) Células simples foram selecionadas com o gráfico de densidade FSC-H versus FSC-A. (D) Histograma foi utilizado para obter a intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503.

Para avaliar a IMF da sonda Bodipy 493/503 nas subpopulações  $CD16^+$  e  $CD16^-$  de monócitos, primeiramente foram obtidos os leucócitos (figura 11A), em seguida, a população de monócitos foi obtida com  $CD14^+$  e granulosidade intermediária (figura 11B). Posteriormente, as células simples foram selecionadas (11C). As subpopulações de monócitos foram obtidas com  $CD14^+/CD16^+$  ou  $CD14^+/CD16^-$  (figura 11D). Por fim, a IMF da sonda Bodipy 493/503 foi avaliada em cada uma das subpopulações de monócitos,  $CD16^+$  (11E) e  $CD16^-$  (11F) com o histograma da sonda Bodipy.



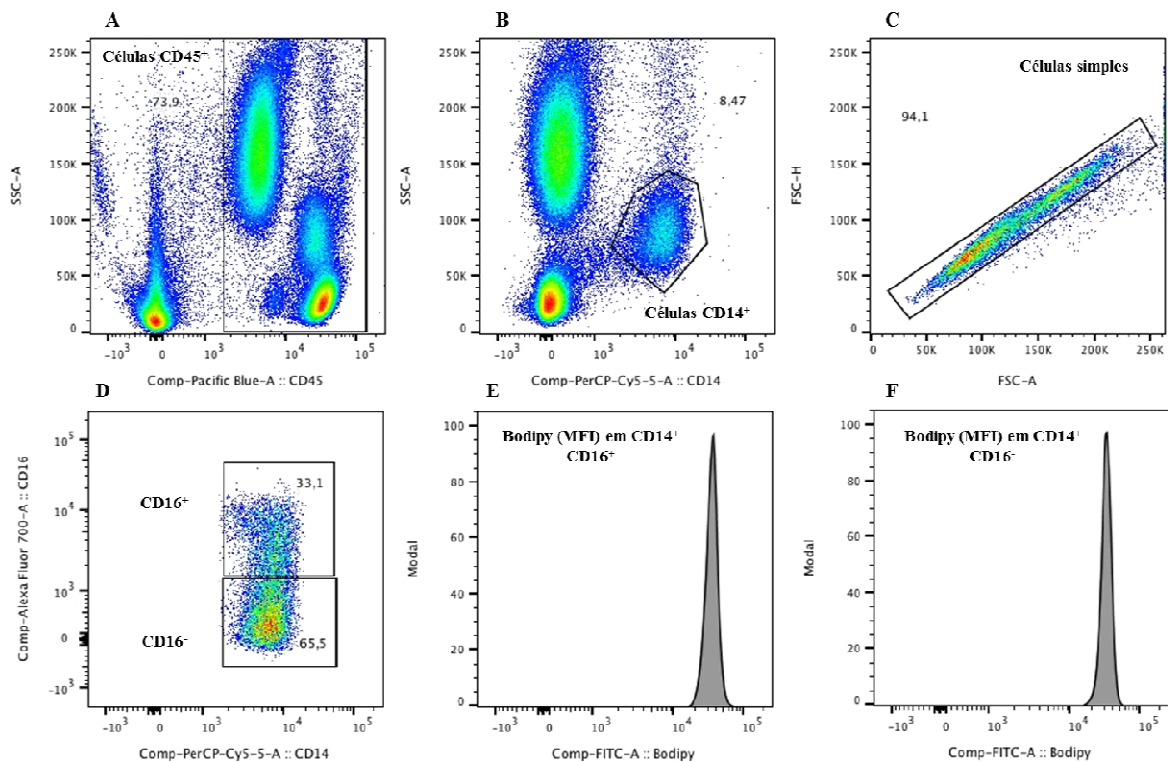


Figura 11- Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nas subpopulações de monócitos  $CD16^-$  e  $CD16^+$ . (A) Leucócitos foram selecionados em um gráfico de densidade SSC-A versus CD45. (B) Monócitos foram selecionados em um gráfico de densidade SSC-A versus CD14. (C) Células simples foram delimitadas por um gráfico de densidade de FSC-H versus FSC-A. (D) As subpopulações de monócitos  $CD16^+$  e  $CD16^-$  foram selecionadas em um gráfico de densidade CD14 versus CD16. (E) Histograma da intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503 para  $CD16^+$  e (F) Histograma da intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503 para  $CD16^-$ .

Para avaliar a IMF da sonda Bodipy 493/503 nas subpopulações de linfócitos, primeiramente os leucócitos foram obtidos (figura 12A). Em seguida, a população de linfócitos totais foi determinada por tamanho pequeno e baixa granulosidade (figura 12B). Posteriormente, as células simples foram selecionadas (figura 12C). A população de linfócitos TCD4 foi selecionada através do duplo positivo CD3/CD4 (figura 12D). IMF da sonda Bodipy 493/503 em linfócitos TCD4 foi obtida através do histograma (figura 12E). Já a população de linfócitos TCD8 foi selecionada através do duplo positivo CD3/CD8 (figura 12F). IMF da sonda Bodipy 493/503 em linfócitos TCD8 foi obtida através do histograma da sonda Bodipy. (figura 12G). A subpopulação de linfócitos B foi selecionada através de CD3 versus CD19, sendo  $CD3^+/CD19^+$  (figura 12H). IMF da sonda Bodipy 493/503 em linfócitos B foi obtida através do histograma da sonda Bodipy (figura 12I).

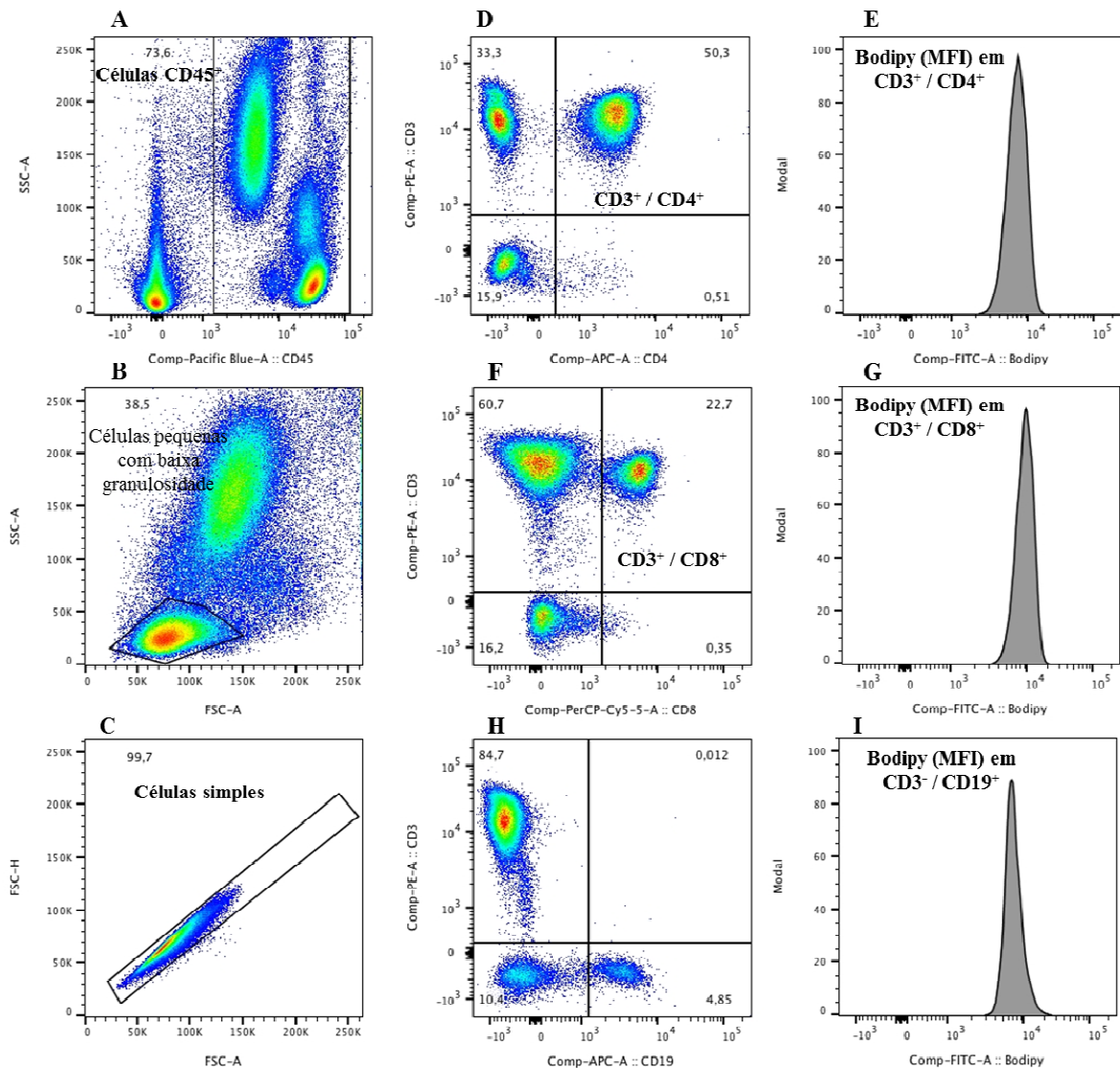


Figura 12- Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nas subpopulações de linfócitos TCD4, TCD8 e B. (A) Leucócitos foram selecionados em um gráfico de densidade SSC-A versus CD45. (B) linfócitos totais foram selecionados em um gráfico de densidade de FSC-A versus SSC-A. (C) Células simples foram delimitadas por um gráfico de densidade de FSC-H versus FSC-A. (D) Os linfócitos TCD4 foram selecionados em um gráfico de densidade CD3 versus CD4. Como duplo positivo CD3/CD4 (E) Histograma da intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503 para linfócitos TCD4. (F) Os linfócitos TCD8 foram selecionados em um gráfico de densidade CD3 versus CD8. Como duplo positivo CD3/CD8 (G) Histograma da intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503 para linfócitos TCD8. (H) Os linfócitos B foram selecionados em um gráfico CD3 versus CD19. Como CD3/CD19<sup>+</sup> (I) Histograma da intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503 para linfócitos B.

Para avaliar a IMF da sonda Bodipy 493/503 das células NK e NKT, primeiramente os leucócitos foram determinados (figura 13A). Em seguida, a população de linfócitos totais foi determinada por tamanho pequeno e baixa granulosidade (figura 13B). Posteriormente, as células simples foram selecionadas (figura 13C). Para determinar as células NK primeiramente foi determinada a população duplo negativo CD3<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup> (figura 13D), em

seguida foi obtida a população  $CD56^+$  que corresponde as células NK (figura 13E) IMF da sonda Bodipy 493/503 em células NK foi obtida através do histograma (figura 13F). Já para determinar as células NKT, foi obtido as células  $CD3^+/CD19^-$  (figura 13D) e em sequência dentre elas as células  $CD56^+$  que corresponde as células NKT (figura 13G). IMF da sonda Bodipy 493/503 em células NKT foi obtida através do histograma da sonda Bodipy (figura 13H).

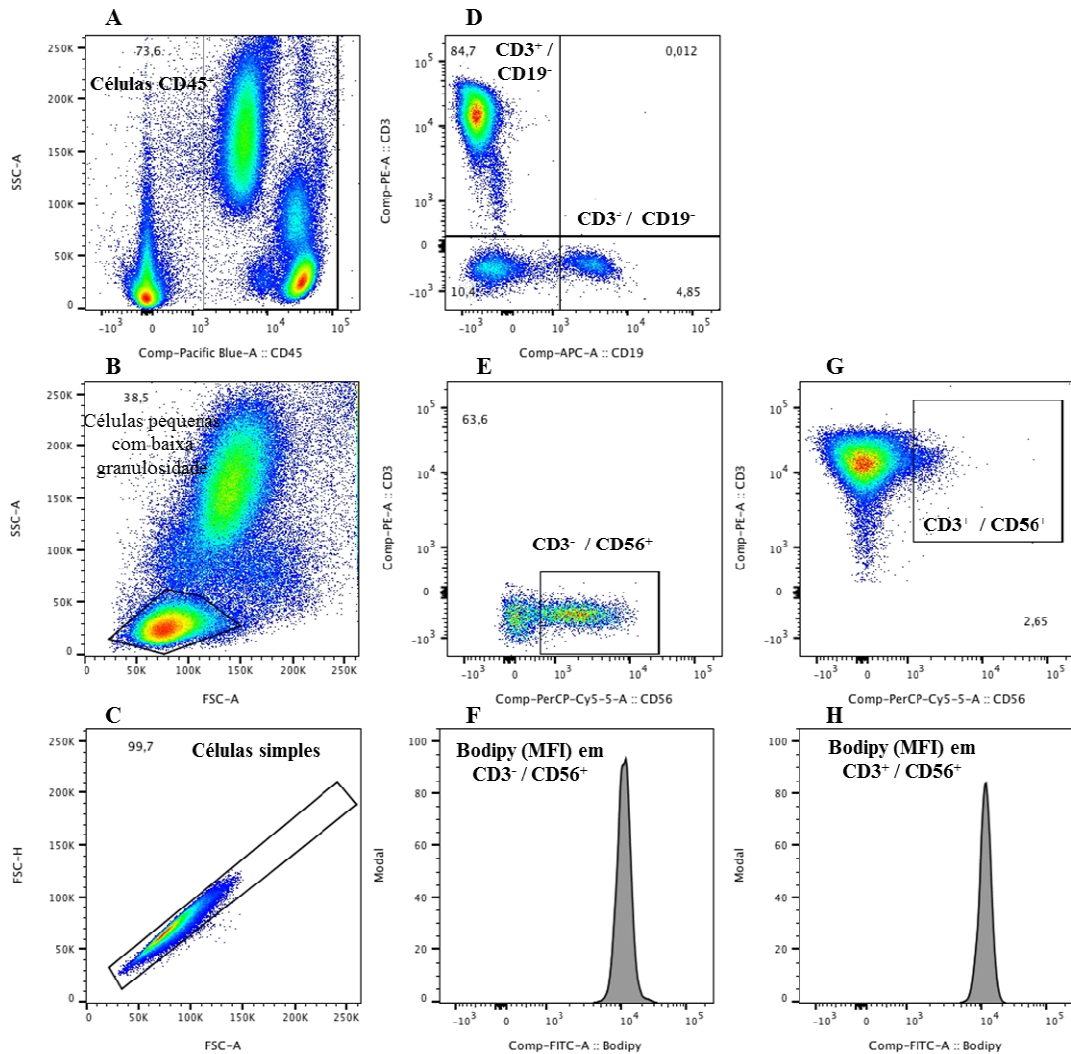


Figura 13- Estratégia de análise dos níveis de corpúsculos lipídicos nas células NK e NKT. (A) Leucócitos foram selecionados em um gráfico SSC-A versus CD45. (B) linfócitos totais foram selecionados em um gráfico de FSC-A versus SSC-A A população de tamanho pequeno e baixa granulocidade corresponde aos linfócitos totais. (C) Células simples foram delimitadas por um gráfico de FSC-H versus FSC-A. As células NK e NKT foram selecionadas em duas etapas. (D) Com o gráfico de CD3 versus CD19, selecionou a população duplo negativo  $CD3^-/CD19^-$ , para as células NK e a população  $CD3^+$  versus  $CD19^-$ , para as células NKT. (E) Posteriormente as células NK foram selecionadas em um gráfico FSC-A versus CD56. (F) Histograma da intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503 em células NK. (G) As células NKT foram selecionadas em um gráfico CD3 versus CD56. (H) Histograma da intensidade mediana de fluorescência (IMF) da sonda Bodipy 493/503.

#### 4.8 Análise da expressão gênica das enzimas formadoras de eicosanoides

O RNA total foi extraído a partir de  $1 \times 10^7$  de leucócitos totais do sangue periférico, dos indivíduos infectados com DENV e não infectados, utilizando PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific). O RNA purificado (50 ng) foi transcrito em cDNA usando GoScript Reserve Transcription System com random primers (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes. O cDNA foi então tratado com RNase H (2 U) (ThermoFisher Scientific) por 20 min a 37 °C. Primeiramente foram testados os genes GAPDH, ACTB, 18s, HPRT1, para determinar qual o melhor gene de expressão constitutiva para o grupo de amostras deste trabalho. Foram selecionadas duas amostras de cada um dos grupos: não infectado, dengue IgM negativo e dengue IgM positivo. Os seguintes critérios foram observados para essa determinação: expressão uniforme do gene testado, eficiência de amplificação semelhante entre o gene constitutivo e o gene de interesse e nível de expressão do gene constitutivo superior a do gene de interesse (Applied Biosystems 2008). ACTB foi escolhido como gene de expressão constitutiva, por atender todos os critérios (tabela 3).

**Tabela 3-** determinação do gene de expressão constitutiva para o grupo de amostras deste trabalho

Gene (Ct médio)	Não infectado (Participante)		IgM negativo (Participante)		IgM positivo (Participante)	
	29	39	2	12	22	26
GAPDH	25.13	21.52	21.94	21.93	21.08	18.63
18s	9.01	8.80	5.99	4.93	10.14	9.96
ACTB	22.09	*	24.43	*	21.54	*
HPRT1	31.02	28.66	28.59	30.46	29.99	26.47

\* Amostras não realizadas para o gene ACTB.

O mRNA do gene de expressão constitutiva e dos genes das enzimas formadoras de eicosanoides, COX-2 (PTGS<sub>2</sub>), TXA<sub>2</sub>S (TBXAS1), PGE<sub>2</sub>S (PTGES<sub>2</sub>), 5-LOX (ALOX5) e LTA<sub>4</sub>H foram amplificados e detectados usando TaqMan® gene expression assays (ThermoFisher Scientific, número de catálogo 4,331,182 gene id: GAPDH Hs99999905\_m1, ACTB Hs99999903\_m1, 18s Hs99999901\_s1, HPRT1 Hs99999909\_m1, PTGS2 Hs00153133\_m1, TBXAS1 Hs01022706\_m1, PTGES2 Hs00228159\_m1, ALOX5 Hs00167536\_m1 e LTA4H Hs01075871. As reações dos genes de interesse foram realizadas em triplicata com 5 µL de cDNA, 6.25 µM de cada gene de interesse juntamente com β-actina, usado para normalizar os dados de expressão gênica, 7.5 µL of TaqMan™ Gene Expression Master Mix (ThermoFisher Scientific) e água até completar um volume final de 15 µL. Foi adicionado em cada experimento duplicata de controle sem ácido nucléico. As

condições de ciclagem foram as seguintes: incubação inicial 2 min a 50 °C e 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. O “cycle threshold” (Ct) foi determinado automaticamente usando Sequence Detection Software, versão 1.4 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi usado para quantificação relativa (Applied Biosystems 2006; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), usando a média de todos os controles não infectados como valor de referência.

#### **4.9 Quantificação da carga viral do *Dengue virus*.**

Os ácidos nucléicos totais foram extraídos a partir de 240 µL de plasma que foi primeiramente centrifugado a 20,000× g por 1.5 h a 4 °C, para concentrar as partículas virais. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e 50 µL de tampão contendo Tris Base (Inlab, São Paulo, Brazil), EDTA (Synth, São Paulo, Brazil), NaCl (Synth) e proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany), foi adicionado. Todas as amostras foram incubadas no termociclador Thermal Cycler Veriti (ThermoFisher Scientific), a 56 °C por 5 min e 98 °C por 15 min. Os ácidos nucléicos obtidos foram utilizados para determinar a carga viral de DENV (cópias de RNA por mL de plasma), que foi quantificado usando o equipamento LightCycler® 96 (Roche, Mannheim, Germany), com os seguintes iniciadores e sonda: DENV-F: 5'-AAG GAC TAG AGG TTA GAG GAG ACC C-3', DENV-R: 5'-CGT TCT GTG CCT GGA ATG ATG-3' e DENV-Probe: 5'-/TEX615/AAC AGC ATA TTG ACG CTG GGA GAG ACC AGA/3IAbRQSp/3' (PACIDÔNIO et al., 2017). As reações foram realizadas em duplicata com 2,5 µL de ácido nucléico, 0,25 µL de cada primer, 0,1 µL de sonda, 2,5 µL de TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher Scientific) e água livre de nuclease para completar um volume final de 10 µL. Foi adicionado em cada experimento duplicata de controle sem ácido nucléico. As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação inicial 20 s a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 3 s a 95 °C e 30 s a 60 °C. Para fins de quantificação, a sequência 3' UTR de DENV foi clonada em pGEMT-Easy plasmid (Promega), amplificado e depois diluído em série para gerar uma curva padrão, como descrito anteriormente (RICHARDSON et al., 2006).

#### **4.10 Análise de monócitos vacuolados**

A morfologia dos monócitos foi analisada por meio de esfregaços sanguíneos corados com um kit de coloração hematológica (Instant-Prov, Newprov, Paraná, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A percentagem de monócitos vacuolados foi determinada pela contagem de cem células usando microscopia óptica com ampliação de 1000x.

#### **4.11 Análise estatística**

O teste D'Agostino and Pearson omnibus foi usado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls foi usado para comparar múltiplas amostras normais. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn foi usado para comparar múltiplas amostras não normais. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar os dados da carga viral. O software Prism 6<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) foi usado para a realização dos testes estatísticos. As diferenças foram consideradas significativas quando um valor de  $p \leq 0,05$  foi obtido.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Diagnóstico de dengue**

Para realização deste estudo 40 participantes foram selecionados e classificados, baseados em critérios clínicos, sorológicos e/ou moleculares, como infectados (28) ou não infectados (12) pelo DENV. A infecção por DENV foi confirmada pelos testes sorológicos dengue ELISA NS1 e dengue ELISA IgM e pelo teste molecular RT-qPCR para DENV/ZikV/ChikV. Os participantes foram considerados infectados por DENV quando positivos em pelo menos um dos três testes realizados. Os dados de cada um dos testes para cada um dos participantes é mostrado na tabela 4. Dentre os 40 participantes, 17 foram positivos pelo teste molecular RT-qPCR, 20 foram positivos com base em ELISA NS1 e 16 foram positivos com base em ELISA IgM. Os 12 participantes que não apresentaram sinais ou sintomas de dengue tiveram a infecção assintomática excluída por serem negativos em todos os testes diagnósticos mencionados acima. A coinfeção, na fase aguda da doença, entre DENV, ZIKV e CHIKV foi excluída pelos resultados na RT-qPCR. A tabela 4 também indica o número de dias de sintomas relatado por cada um dos participantes.

**Tabela 4-** Diagnóstico de dengue de casos atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte.

Participantes	Dias de sintomas	RT-qPCR	ELISA NS1	ELISA IgM
1	5	+	+	+
2	5	+	-	-
3	9	-	-	+
4	5	+	+	+
5	5	+	+	-
6	12	-	-	+
7	10	-	-	+
8	3	+	+	-
9	1	+	+	-
10	2	-	+	-
11	10	-	+	+
12	2	+	+	-
13	8	-	+	+
14	4	-	+	-
15	9	-	+	+
16	6	+	+	+
17	7	-	+	+
18	6	+	+	+
19	5	+	+	-
20	6	+	+	-
21	7	+	-	+
22	10	-	-	+
23	6	+	+	-
24	6	+	+	-
25	6	+	+	-
26	8	-	-	+
27	7	+	+	+
28	4	+	-	+
29	*	-	-	-
30	*	-	-	-
31	*	-	-	-
32	*	-	-	-
33	*	-	-	-
34	*	-	-	-
35	*	-	-	-
36	*	-	-	-
37	*	-	-	-
38	*	-	-	-
39	*	-	-	-
40	*	-	-	-

\* Participantes não infectados, + teste com resultado positivo, - teste com resultado negativo.

Os participantes foram divididos nos seguintes grupos. **Grupo não infectado:** negativo para infecção por DENV e sem sinais e sintomas de dengue. O grupo é composto por 12 indivíduos, sendo 6 mulheres e 6 homens, com mediana de idade igual a 32.5 anos e valores extremos iguais a 27.0 e 56.0 anos. **Grupo dengue:** positivo para infecção por DENV e com pelo menos dois dos sinais e sintomas de dengue no momento da coleta. O grupo é



composto por 28 indivíduos, que foram subdividido em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de IgM contra DENV no plasma dos participantes. Essa divisão se deu pela ampla variação nos dias de sintomas relatados pelos participantes no momento da coleta. O **grupo dengue IgM negativo** é composto por 12 indivíduos, sendo 11 mulheres e 1 homem, com mediana de idade igual a 33 anos e valores extremos iguais a 18 e 85 anos. Já o grupo dengue IgM positivo é composto por 16 indivíduos, sendo 12 mulheres e 4 homens, com mediana da idade igual a 37,5 anos e valores extremos iguais a 18 e 61 anos.

## **5.2 Perfil clínico dos participantes com dengue**

Para determinar os sinais e sintomas de cada um dos participantes, foram analisados os questionários respondidos por eles no momento da inclusão no projeto. Cada um dos participantes foi questionado pela médica colaboradora do projeto sobre as manifestações clínicas que apresentaram no decorrer da doença. Devido ao fato de o relato clínico dos participantes refletirem o decorrer da doença e não o momento da coleta, os sinais e sintomas dos participantes encontram-se apresentados na tabela 5 sem a subdivisão do grupo dengue relatada acima.

As principais queixas informadas foram febre, cefaleia, dor retrocular e mialgia que foram relatadas por 92,8% dos participantes, seguida por prostração relatada por 87,5% dos participantes e artralgia por 71,4%, sendo, portanto as principais queixas dos participantes do grupo dengue. Já manifestações cutâneas foram informadas por 46,4% dos participantes com dengue. Hipotensão postural foi informada por 25% dos participantes. Outros sinais e sintomas foram mais raramente informados como hemorragia leve que foi relatada por 4 participantes (14,3%), além de dor abdominal e vômito persistente relatado por 3 deles (10,7%). Hipotensão arterial e extremidades frias foram relatadas duas vezes (7,1%), desconforto respiratório foi informado apenas por um voluntário (3,6%). Nenhum dos participantes apresentou hematêmese ou melena, hipotermia brusca e pulso rápido. Todos os participantes do grupo não infectado não apresentaram nenhum dos sinais e sintomas relatados pelos participantes com dengue.

**Tabela 5.** Características clínicas de casos de dengue, atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte durante o período de março a maio de 2016

Parâmetro	Dengue (n=28)	
	N	%
Febre	26	92,8
Cefaléia	26	92,8
Dor retrocular	26	92,8
Mialgia	26	92,8
Prostração	24	87,5
Artralgia	20	71,4
Manifestações cutâneas	13	46,4
Hemorragia leve	4	25,0
Hipotensão postural*	7	14,3
Dor abdominal*	3	10,7
Vômitos persistentes*	3	10,7
Hipotensão arterial*	2	7,1
Extremidades frias*	2	7,1
Desconforto respiratório*	1	3,6
Hematêmese ou melena*	0	0
Hipotermia brusca*	0	0
Pulso rápido*	0	0

\*Indica os sinais de alarme de acordo com os critérios do Ministério da Saúde Brasileiro.

Com base nas análises de dados e na evolução clínica de cada um dos participantes a médica colaboradora do projeto classificou todos os participantes como dengue sem sinal de alarme.

### 5.3 Perfil laboratorial dos participantes com dengue

Para auxiliar na classificação clínica dos indivíduos com dengue foram realizados o hemograma completo e análises bioquímicas. Quando todos os grupos foram comparados, a análise do eritrograma (hematócrito, hemácias e hemoglobina) não evidenciou modificação no percentual (Figura 14A) e número de hemácias (Figura 14B), bem como nos níveis de hemoglobina (Figura 14C) no sangue periférico dos participantes com dengue, independente da ausência ou presença de IgM.

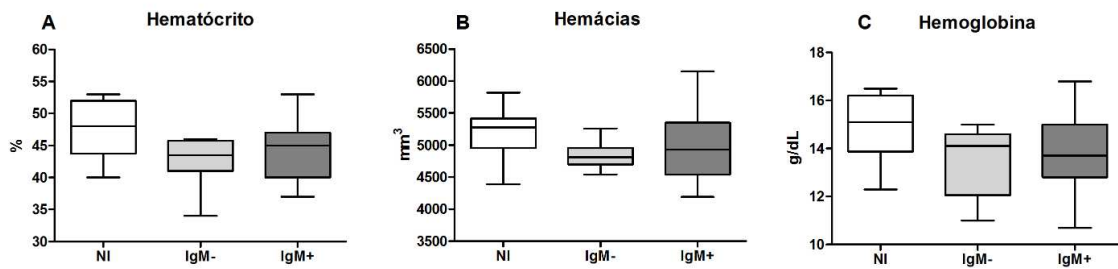


Figura 14- Eritrograma dos participantes com dengue. A) Hematócrito. B) Hemácias. C) Hemoglobina. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NI = Indivíduos não infectados (n = 12). IgM<sup>-</sup> = indivíduos infectados pelo DENV com ausência de IgM no plasma (n = 12). IgM<sup>+</sup> = Indivíduos infectados pelo DENV com presença de IgM no plasma.

A análise do leucograma indicou uma diminuição de mais do que 50% no número global dos leucócitos (Figura 15A), segmentados (Figura 15B), linfócitos (Figura 15D) e plaquetas (Figura 15E) no sangue periférico dos participantes dos grupos IgM negativo e IgM positivo quando comparado ao grupo não infectado. Não houve diferença nestes parâmetros entre os grupos IgM negativo e IgM positivo. Por outro lado, o número de monócitos (Figura 15C) estava diminuído em mais do que 45% apenas no grupo IgM negativo em relação ao grupo não infectado. Houve ainda um aumento de aproximadamente 40% no número de monócitos do grupo IgM positivo em relação ao grupo IgM negativo, indicando recuperação no número de monócitos no grupo IgM positivo.

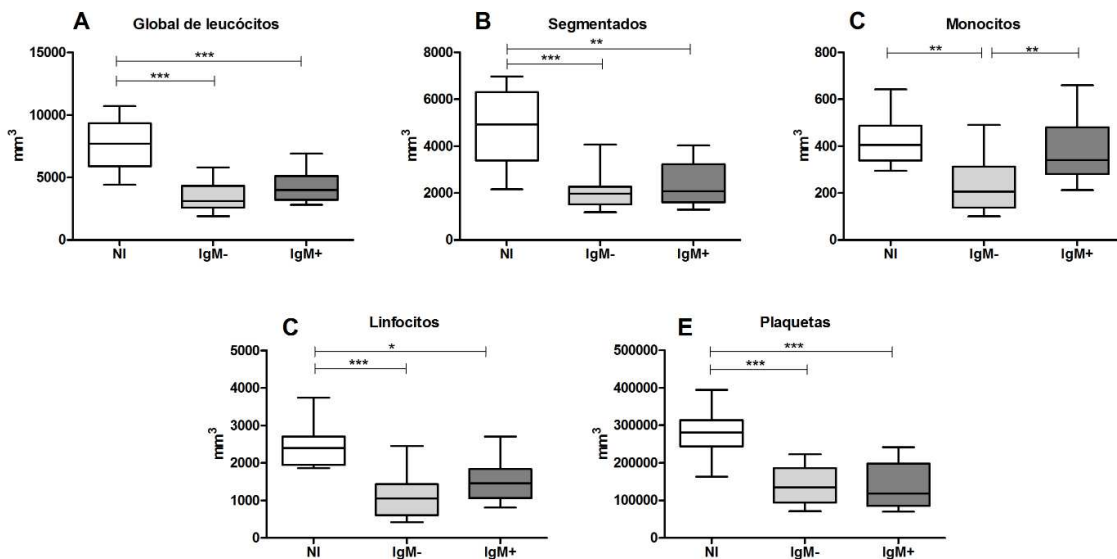


Figura 15. Leucograma e plaquetas dos participantes com dengue. A) Número global de leucócitos. B) Leucócitos segmentados. C) Monócitos. D) Linfócitos. E) Plaquetas. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NI = Indivíduos não infectados (n = 12). IgM<sup>-</sup> = indivíduos infectados pelo DENV com ausência de IgM no plasma (n = 12). IgM<sup>+</sup> = Indivíduos infectados pelo DENV com presença de IgM no plasma (n = 16). (\*) p < 0,05, (\*\*) p < 0,01 e (\*\*\*) p < 0,001.

As análises das enzimas hepáticas evidenciaram que o grupo IgM positivo apresentou níveis séricos de AST (Figura 16A) e ALT (Figura 16B) com aumento de mais do que 50% em relação ao grupo não infectado. Não foi observada diferença nos níveis séricos de ambas as enzimas entre os grupos IgM negativo e não infectado. Além disso, também não houve diferença nos níveis séricos de AST entre o grupo IgM negativo e IgM positivo. Já os níveis séricos de ALT do grupo IgM positivo foi 50% maior do que os níveis do grupo IgM negativo. Foi encontrado também que os níveis séricos das proteínas totais (Figura 16C) estava diminuído em cerca de 10% no grupo IgM negativo quando comparado ao grupo não infectado. Por outro lado, não houve diferença nos níveis séricos das proteínas totais entre o grupo IgM positivo e os grupos não infectado e IgM negativo. E ainda não foi observada diferença nos níveis séricos de albumina (Figura 16D) e globulinas (Figura 16E) entre nenhum dos grupos analisados. As medianas e os valores extremos de cada parâmetro analisado, bem como os valores de p para cada comparação efetuada encontram-se descritos no tópico 5.11, tabela 6.

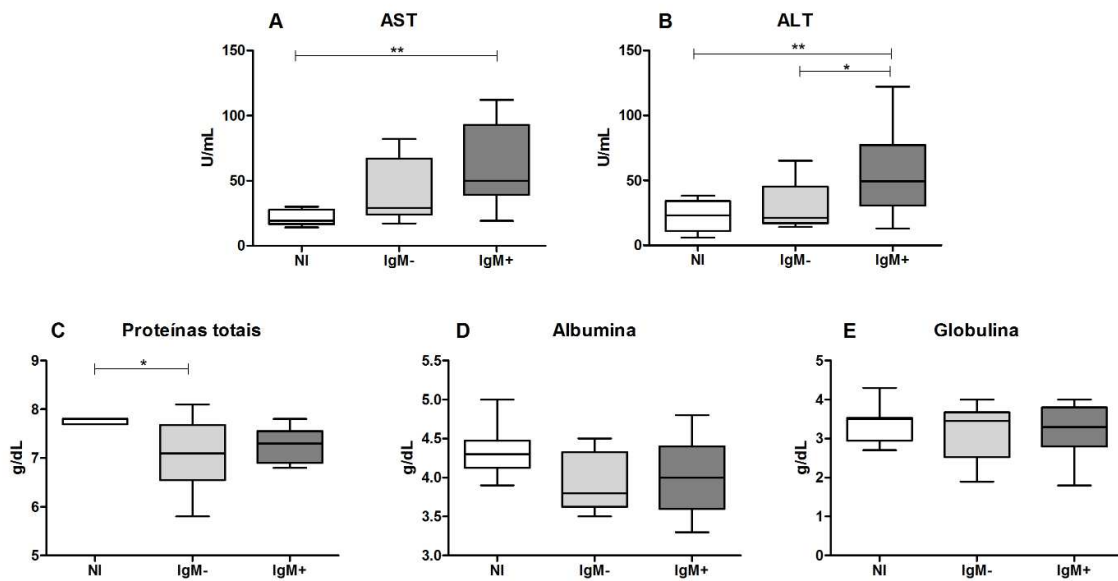


Figura 16. Perfil bioquímico dos participantes com dengue. A) AST. B) ALT. C) Proteínas totais. D) Albumina. E) Globulina. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NI = Indivíduos não infectados (n = 12). IgM<sup>-</sup> = indivíduos infectados pelo DENV com ausência de IgM no plasma (n = 12). IgM<sup>+</sup> = Indivíduos infectados pelo DENV com presença de IgM no plasma (n = 16). (\*) p < 0,05 e (\*\*) p < 0,01.

#### 5.4 Lipidograma dos participantes com dengue

Para avaliar a influência da infecção pelo DENV sobre o perfil lipídico dos participantes, foram mensurados os níveis de colesterol total e ligado à LDL, HDL e VLDL, bem como os níveis de triglicérides no soro dos participantes. Os níveis séricos de colesterol total (Figura 17A) estavam reduzidos em mais do que 20% nos grupos IgM negativo e IgM positivo quando comparado ao grupo não infectado. Em contrapartida, não foi observada diferença no colesterol total entre os grupos IgM negativo e IgM positivo. Também não houve diferença no colesterol ligado à HDL (Figura 17B) e LDL (Figura 17C) entre nenhum dos grupos de estudo. Por outro lado, o colesterol ligado à VLDL (Figura 17D) estava diminuído em 44% no grupo IgM negativo quando comparado aos grupos não infectado e IgM positivo. Já os níveis séricos de triglicérides (Figura 17E) do grupo IgM positivo estavam reduzidos em mais do que 50% quando comparado ao grupo não infectado. Não foi observada diferença nos níveis séricos de triglicérides entre o grupo não infectado e IgM positivo. As medianas e os valores extremos de cada parâmetro analisado, bem como os valores de *p* para cada comparação efetuada encontram-se descritos no tópico 5.11, tabela 6.

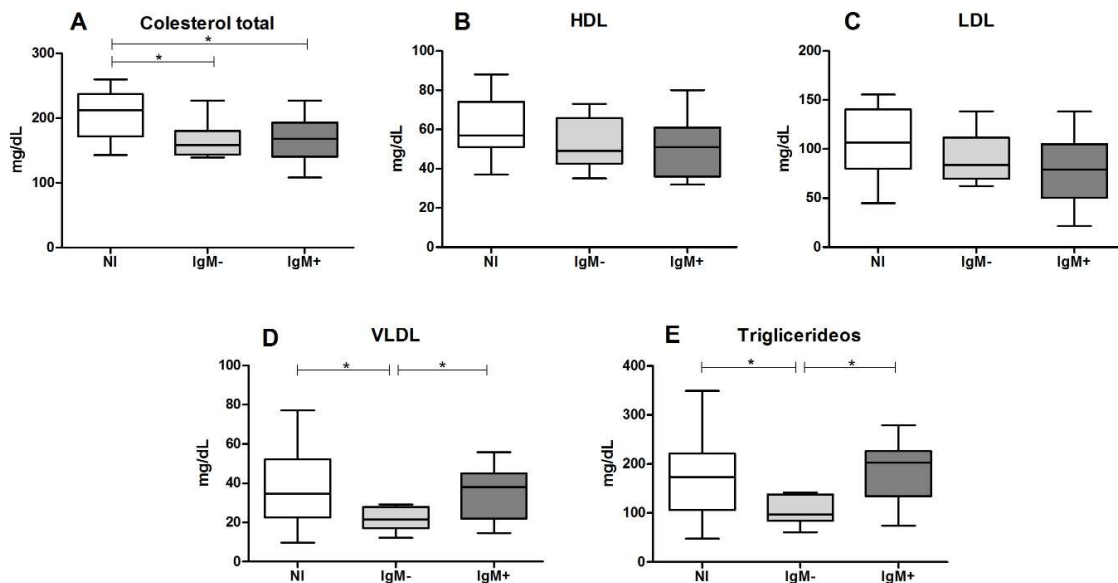


Figura 17. Lipidograma dos participantes com dengue. A) Colesterol total. B) HDL. C) LDL. D). VLDL E) Triglicerídeos. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NI = Indivíduos não infectados (n = 12). IgM<sup>-</sup> = indivíduos infectados pelo DENV com ausência de IgM no plasma (n = 12). IgM<sup>+</sup> = Indivíduos infectados pelo DENV com presença de IgM no plasma (n = 16). (\*) p < 0,05.

### 5.5 Perfil de citocinas plasmáticas dos participantes com dengue

Para analisar o impacto da dengue sobre o perfil de citocinas dos participantes, foram mensurados os níveis plasmáticos das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ . Os participantes do grupo IgM negativo apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  (Figura 18A), IL-6 (Figura 18B), IL-8 (Figura 18C) e IL-10 (Figura 18D) quando comparado ao grupo não infectado. Já os participantes do grupo IgM positivo apresentaram apenas aumento nos níveis plasmáticos de IL-10 (Figura 18D) em relação ao grupo não infectado. Não houve alteração nos níveis plasmáticos das demais citocinas avaliadas em nenhum dos grupos analisados. As medianas e os valores extremos de cada parâmetro analisado, bem como os valores de p para cada comparação efetuada encontram-se descritos no tópico 5.11, tabela 6.

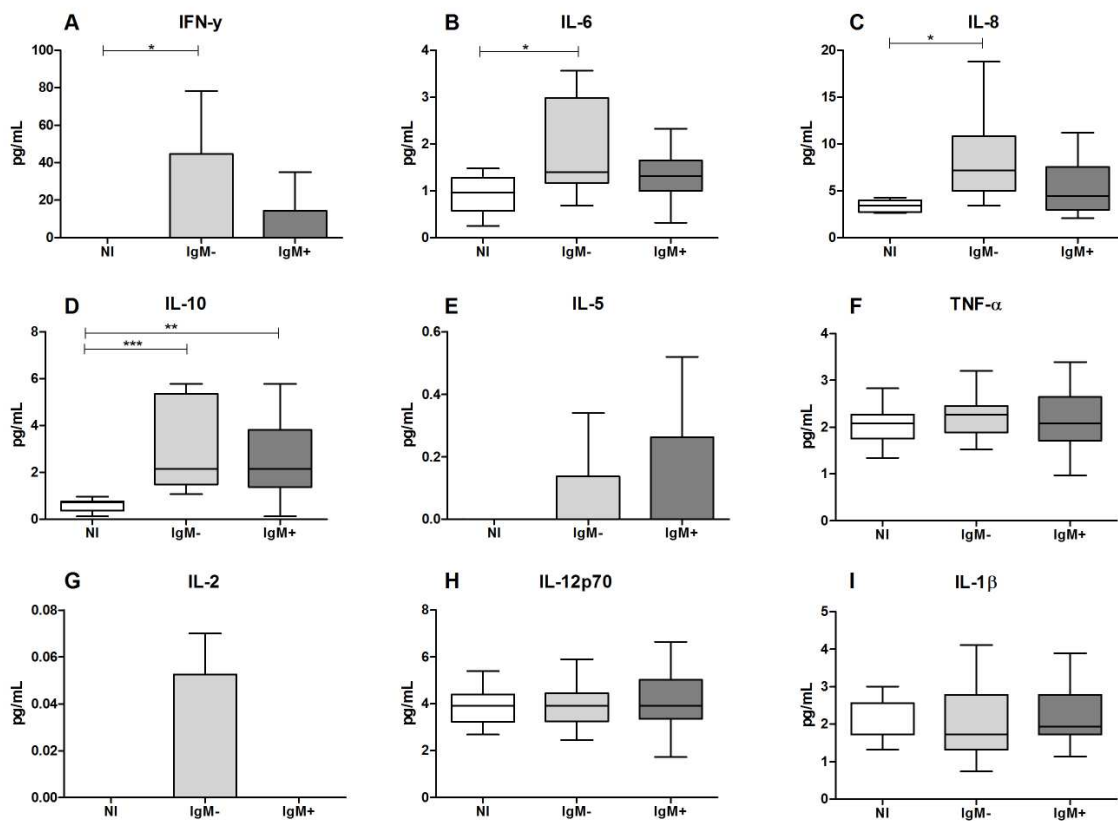


Figura 18. Perfil de citocinas dos participantes com dengue. A) IFN- $\gamma$ . B) IL-6. C) IL-8. D) IL-10. E) IL-5. F) TNF- $\alpha$ . G) IL-2. H) IL-12p70. I) IL-1 $\beta$ . Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NI = Indivíduos não infectados (n = 12). IgM $^-$  = indivíduos infectados pelo DENV com ausência de IgM no plasma (n = 12). IgM $^+$  = Indivíduos infectados pelo DENV com presença de IgM no plasma (n = 16). (\*) p < 0,05, (\*\*) p < 0,01 e (\*\*\*) p < 0,001.

### 5.6 Influencia da infecção pelo DENV sobre os níveis plasmáticos dos eicosanoides TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>

Para avaliar o impacto da infecção por DENV na produção de eicosanoides, foram quantificados os níveis de TXA<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, através de seus metabólitos estáveis, e LTB<sub>4</sub> no plasma de indivíduos infectados por DENV. Não foi observada diferença no nível plasmático de TXA<sub>2</sub> (Figura 19A) entre os grupos não infectado e IgM negativo. Entretanto, os níveis de TXA<sub>2</sub> do grupo IgM positivo foi 3 vezes maior do que os níveis plasmáticos do grupo não infectado e IgM negativo. Em contrapartida, não foi observada diferença nos níveis plasmáticos de PGE<sub>2</sub> (Figura 19B) e LTB<sub>4</sub> (Figura 19C) em nenhum dos grupos analisados. As medianas e os valores extremos de cada parâmetro analisado, bem como os valores de p para cada comparação efetuada encontram-se descritos no tópico 5.11, tabela 7.

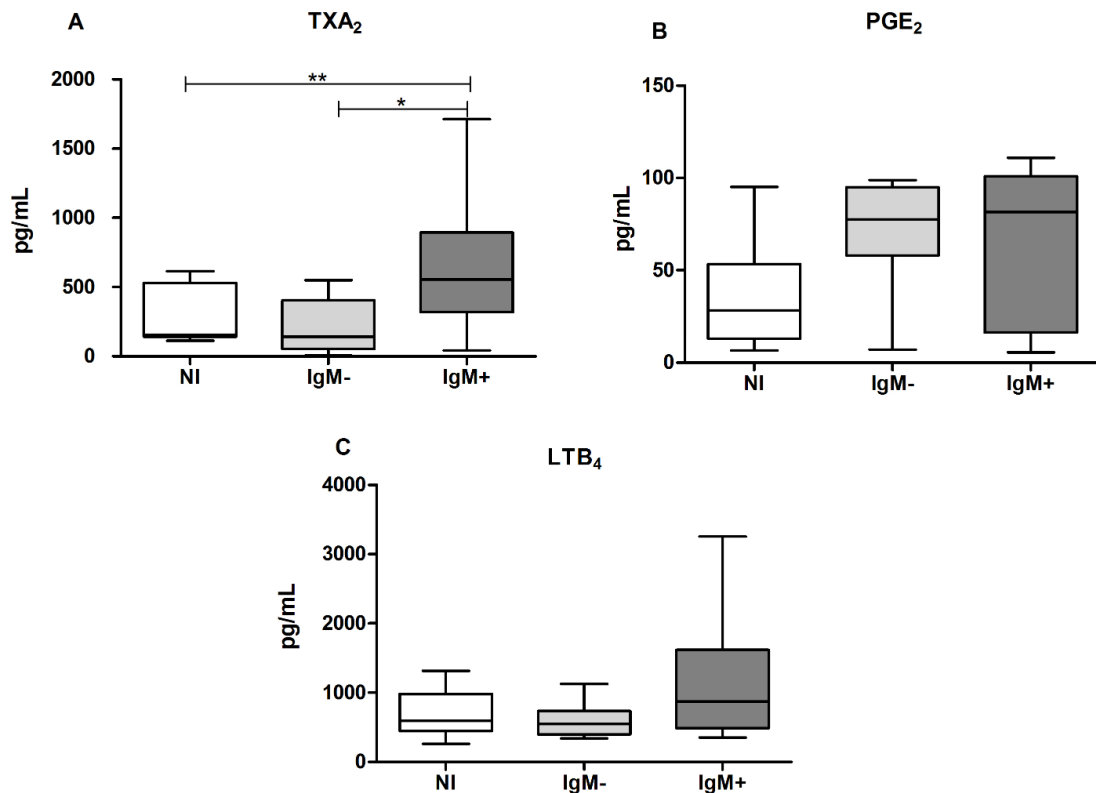


Figura 19. Quantificação dos eicosanoides TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> no plasma de indivíduos infectados com dengue. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e valores extremos. NI = Indivíduos não infectados (n = 12). IgM<sup>-</sup> = indivíduos infectados pelo DENV com ausência de IgM no plasma (n = 12). Indivíduos infectados por IgM<sup>+</sup> = DENV com presença de IgM no plasma (n = 16). (\*) p < 0,05 e (\*\*) p < 0,01.

### 5.7 Influência da infecção pelo DENV sobre os níveis de corpúsculos lipídicos em leucócitos

Para investigar o efeito da infecção por DENV nos níveis de CL nos leucócitos do sangue periférico, medimos a intensidade mediana de fluorescência (MFI) da sonda Bodipy 493/503, um corante verde fluorescente que se liga aos lipídios neutros no centro dos CL. Após analisar os monócitos foi observado um aumento de 60% na subpopulação CD16<sup>+</sup> (Figura 20A) e uma redução de 30% na subpopulação CD16<sup>-</sup> (Figura 20B) no grupo IgM negativo quando comparado ao grupo não infectado. Não foi observada modificação no percentual de ambas as subpopulações de monócitos quando comparados os grupos não infectado e IgM positivo. Quando avaliados os níveis de CL, foi observado um aumento superior a 35% no IMF da sonda Bodipy nos monócitos CD16<sup>+</sup> (Figura 20C) e CD16<sup>-</sup> (Figura 20D) no grupo IgM negativo em relação ao grupo não infectado, indicando um aumento dos níveis de CL em ambas as subpopulações de monócitos no grupo IgM negativo. Em



contrapartida, os níveis de CL nos monócitos  $CD16^+$  e  $CD16^-$  no grupo IgM positivo permaneceu semelhante aos do grupo não infectado.

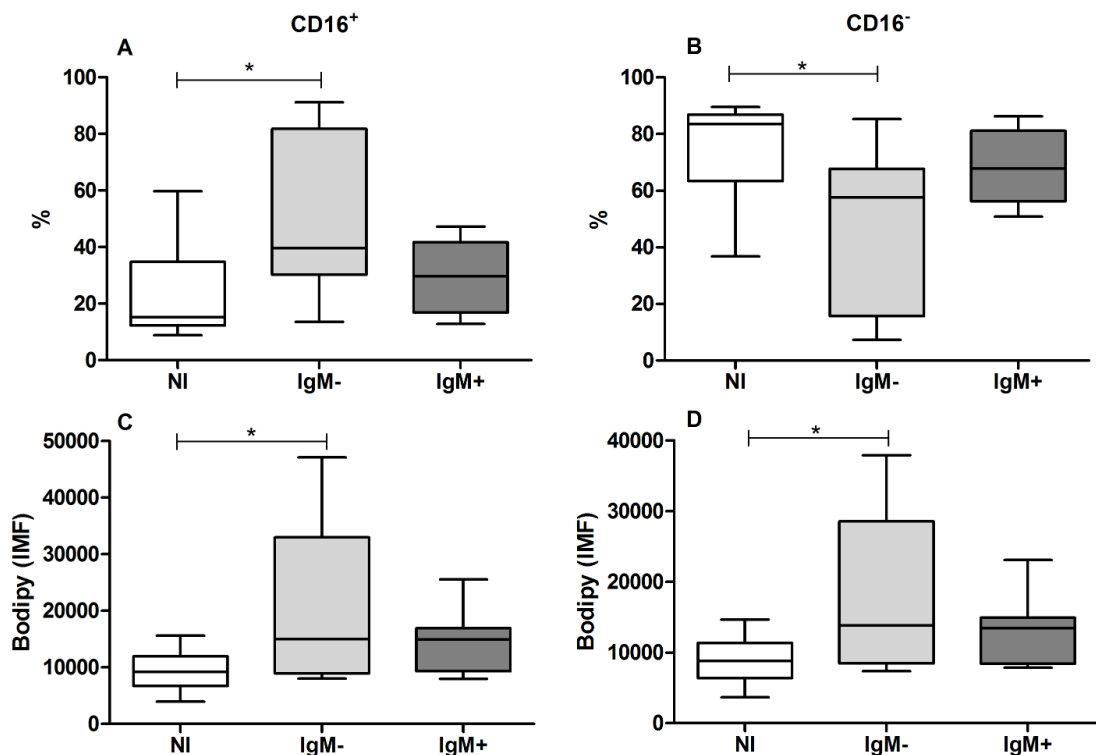


Figura 20. Corpúsculos lipídicos em subpopulações de monócitos de pacientes com dengue. Frequência das subpopulações de monócitos. A)  $CD16^+$ . B)  $CD16^-$ . Efeito da infecção por DENV nas intensidades medianas de fluorescência (MFI) da sonda Bodipy 493/503 em monócitos. C)  $CD16^+$ . D)  $CD16^-$ . Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NI, indivíduos não infectados ( $n = 8$ ); IgM- = Indivíduos infectados por DENV com ausência de IgM no plasma ( $n = 10$ ). IgM+ = Indivíduos infectados por DENV com presença de IgM no plasma ( $n = 10$ ). (\*)  $p < 0,05$ .

Quando analisadas as demais populações de leucócitos presentes no sangue periférico dos participantes, observou-se também que a infecção por DENV diminuiu a frequência de eosinófilos no grupo IgM negativo quando comparado ao grupo não infectado e ao grupo IgM positivo (Figura 21A), enquanto que as células NK apresentaram diminuição na frequência no grupo IgM positivo quando comparado ao grupo não infectado e ao grupo IgM negativo (Figura 21F). Em contrapartida, as células NKT apresentaram aumento na frequência no grupo dengue IgM negativo quando comparado ao grupo não infectado (Figura G). Já as populações de neutrófilos (Figura 21B), linfócitos TCD4 (Figura 21C), linfócitos TCD8 (Figura 21D) e linfócitos B (Figura 21E) não apresentaram alteração na frequência em nenhum dos grupos testados. A infecção por DENV também não alterou os níveis de CL em eosinófilos (figura 21A), neutrófilos (figura 21B), linfócitos TCD4 (figura 21C), linfócitos TCD8 (figura 21D), linfócitos B (figura 21E), células NK (figura 21F) e células NKT (figura

21G) em nenhum dos grupos analisados. As medianas e os valores extremos de cada parâmetro analisado, bem como os valores de  $p$  para cada comparação efetuada encontram-se descritos no tópico 5.11, tabela 7.

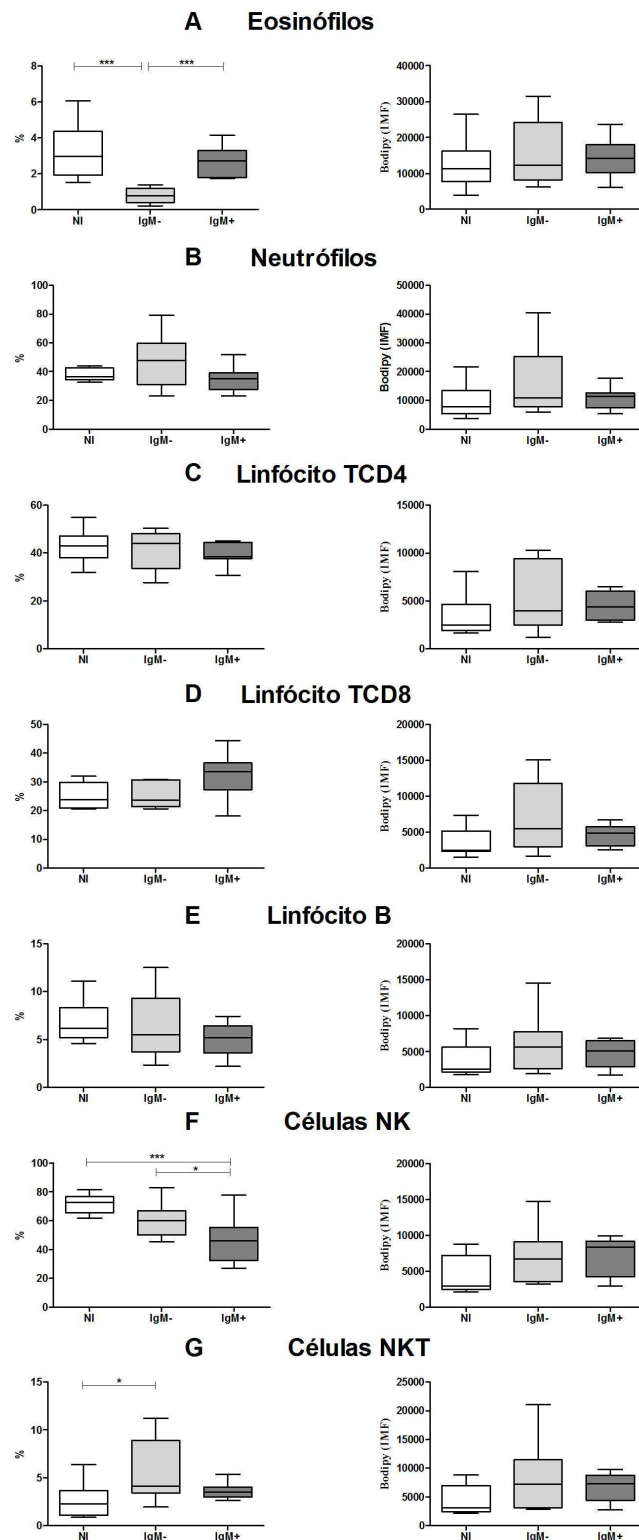


Figure 21. Corpúsculo lipídico em diferentes populações de leucócitos de pacientes com dengue. Efeito da infecção por DENV nas frequências e nas intensidades medianas de fluorescência (MFI) da sonda Bodipy 493/503. (A) eosinófilos; (B) neutrófilos; (C) linfócitos TCD4; (D) linfócitos TCD8. (E) linfócitos B (F) células NK e (G) células NKT. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NI = Indivíduos não infectados (n = 8). IgM<sup>-</sup> = Indivíduos infectados com DENV com ausência de IgM no plasma (n = 10). IgM<sup>+</sup> = Indivíduos infectados por DENV com presença de IgM no plasma (n = 10).

## 5.8 Influência da infecção por DENV na expressão gênica das enzimas formadoras de eicosanoides

O efeito da infecção por DENV nos níveis de mRNA dos genes que codificam as enzimas formadoras de eicosanoides COX-2, TXA<sub>2</sub>S e PGE<sub>2</sub>S (via COX), e 5-LOX e LTA<sub>4</sub>H (via 5-LOX) foram avaliados em leucócitos do sangue periférico por RT-qPCR e os dados foram expressos como quantificação relativa. Foi observada uma redução de mais do que 60% na expressão gênica da enzima COX-2 (Figura 22A) e de mais do que 40% na expressão gênica da enzima TXA<sub>2</sub>S (Figura 22B) no grupo IgM positivo quando comparado ao grupo não infectado. Por outro lado, não foi observada diferença nos níveis de mRNA de COX-2 e TXA<sub>2</sub>S entre os grupos IgM negativo e não infectado ou entre o grupo IgM negativo e IgM positivo. Também não foram observadas diferenças nos níveis de mRNA das enzimas PGE<sub>2</sub>S (figura 22C), 5-LOX (figura 22D) e LTA<sub>4</sub>H (figura 22E) em nenhum dos grupos analisados. As medianas e os valores extremos de cada parâmetro analisado, bem como os valores de *p* para cada comparação efetuada encontram-se descritos no tópico 5.11, tabela 7.

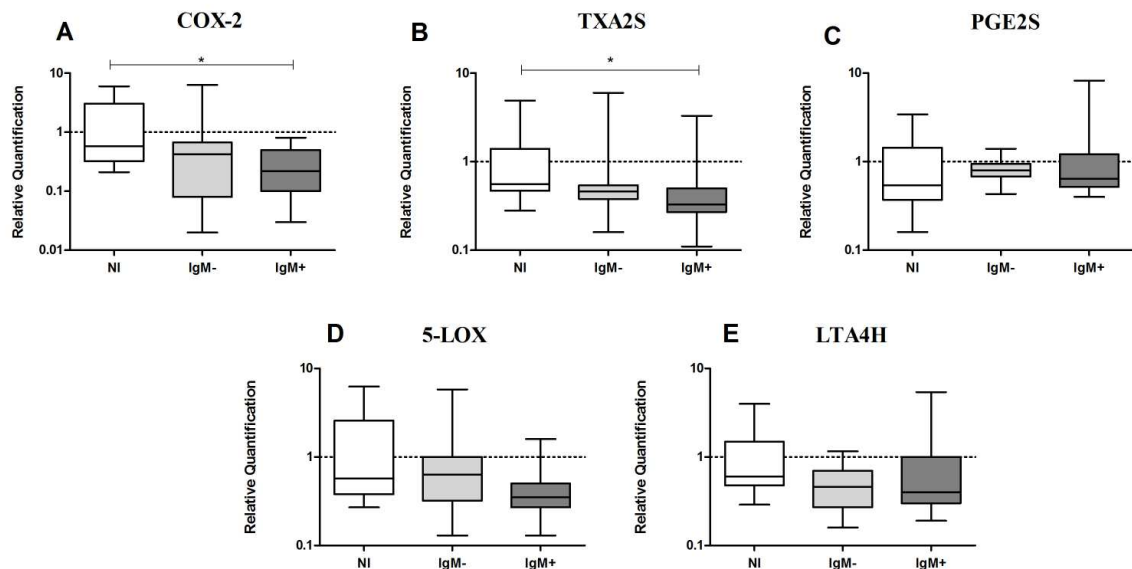


Figura 22. Quantificação dos níveis de mRNA que codificam as enzimas formadoras de eicosanóides COX<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>S, PGE<sub>2</sub>S, 5-LOX e LTA<sub>4</sub>H em leucócitos do sangue periférico de pacientes com dengue. A) COX-2, B) TXA<sub>2</sub>S, C) PGE<sub>2</sub>S, D) 5-LOX e E) LTA<sub>4</sub>H. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NI = Indivíduos não infectados (n = 12). IgM<sup>-</sup> = Indivíduos infectados com DENV com ausência de IgM no plasma (n = 12). IgM<sup>+</sup> = Indivíduos infectados por DENV com presença de IgM no plasma (n = 15). (\*) *p* < 0,05.

### 5.9 Carga viral dos participantes infectados por DENV

A carga viral foi determinada através de RT-qPCR e os participantes com dengue do grupo IgM negativo apresentaram carga viral superior a dos participantes do grupo dengue IgM positivo (figura 23). As medianas e os valores extremos de cada parâmetro analisado, bem como os valores de  $p$  para cada comparação efetuada encontram-se descritos no tópico 5.11, tabela 7.

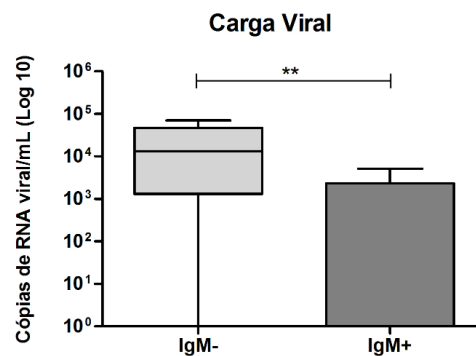


Figura 23. Quantificação plasmática do DENV. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. Cópias de RNA do DENV por mL de plasma. IgM<sup>-</sup> = Indivíduos infectados com DENV com ausência de IgM no plasma (n=12). IgM<sup>+</sup> = Indivíduos infectados por DENV com presença de IgM no plasma (n=16).

### 5.10 Influência da infecção por DENV na vacuolização de monócitos

Para determinar o impacto da infecção por DENV na vacuolização citoplasmática de monócitos foram analisados esfregaços sanguíneos por microscopia óptica. Foi observado que o grupo IgM negativo apresentou porcentagem de monócitos vacuolizados 3 vezes maior do que o grupo não infectado. Não foi observada diferença na vacuolização de monócitos entre os grupos não infectado e IgM positivo ou entre os grupos IgM negativo e IgM positivo (figura 24A). As medianas e os valores extremos de cada parâmetro analisado, bem como os valores de  $p$  para cada comparação efetuada encontram-se descritos no tópico 5.11, tabela 7. A figura 24B mostra uma imagem de microscopia óptica evidenciando a vacuolização de monócitos em esfregaço sanguíneo de um participante do grupo IgM negativo.

### Monócitos vacuolados

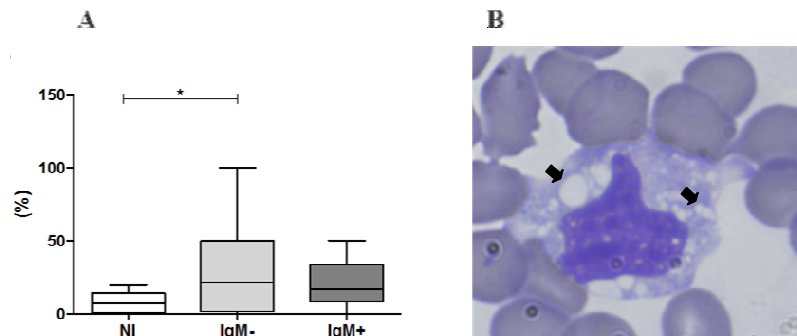



Figura 24. Porcentagem de monócitos vacuolados em participantes infectados por DENV. A) Porcentagem de monócitos vacuolados. B) Esfregaço sanguíneo evidenciando vacúolos em monócitos. NI = Indivíduos não infectados (n = 12). IgM<sup>-</sup> = Indivíduos infectados com DENV com ausência de IgM no plasma (n = 12). IgM<sup>+</sup> = Indivíduos infectados por DENV com presença de IgM no plasma (n = 16). (\*) p < 0,05. Imagem representativa de um monócito vacuolado no sangue de um paciente com dengue aumento de 1000x.  indica os vacúolos.

### 5.11 Resumo dos resultados

Na primeira etapa do estudo os participantes foram caracterizados como dengue sem sinais de alarme, por meio da análise de sinais e sintomas, além das análises laboratoriais e do perfil de citocinas que reforçam essa classificação. A tabela 6 demonstra a mediana seguida dos valores extremos para cada um dos parâmetros analisados, além do p valor obtido na comparação de cada um dos grupos.

**Tabela 6:** Resumo dos resultados obtidos na primeira etapa do estudo

	Mediana e valores extremos			p Valor		
	NI	IgM <sup>-</sup>	IgM <sup>+</sup>	NI/IgM <sup>-</sup>	NI/IgM <sup>+</sup>	IgM <sup>-</sup> /IgM <sup>+</sup>
Perfil hematológico						
Hematócrito (%)	48,00 (40,00-53,00)	43,50 (34,00-46,00)	45,00 (37,00-53,00)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Hemácias (células/mm <sup>3</sup> )	5,275 (4,390-5,820)	4,810 (4,540-5,260)	4,930 (4,190-6,150)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Hemoglobina (g/dL)	15,10 (12,30-16,50)	14,10 (11,00-15,00)	13,70 (10,70-16,80)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Leucócitos (células/mm <sup>3</sup> )	7700 (4,400-10,70)	3100 (1,900-5,800)	4000 (2,800-6,900)	p<0,001	p<0,001	p>0,05
Segmentados (células/mm <sup>3</sup> )	4924 (2156-6975)	1980 (1178-4060)	2068 (1298-4028)	p<0,001	p<0,01	p>0,05
Monócitos (células/mm <sup>3</sup> )	404,5 (295,0-642,0)	206,5 (100,0-490,0)	340,0 (212,0-660,0)	p<0,01	p>0,05	p<0,01
Linfócitos (células/mm <sup>3</sup> )	2400 (1860-3745)	1052 (425,0-2450)	1462 (812,0-2706)	p<0,001	p<0,01	p>0,05
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	280,5 (163,0-395,0)	135,0 (71,00-223,0)	118,0 (70,00-242,0)	p<0,001	p<0,001	p>0,05

	Mediana e valores extremos			p Valor		
	NI	IgM <sup>-</sup>	IgM <sup>+</sup>	NI/IgM <sup>-</sup>	NI/IgM <sup>+</sup>	IgM <sup>-</sup> /IgM <sup>+</sup>
Níveis de AST, ALT (U/mL), proteínas totais e frações (g/dL)						
AST	19,00 (14,00- 30,00)	29,00 (17,00- 82,00)	50,00 (19,00- 112,0)	p>0,05	p<0,01	p>0,05
ALT	23,00 (6,00- 34,00)	21,00 (14,00- 65,00)	49,50 (13,00- 122,0)	p>0,05	p<0,01	p<0,05
Proteínas totais	7,800 (7,700- 7,800)	7,100 (5,800- 8,100)	7,300 (6,800- 7,800)	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Albumina	4,300 (3,900- 5,000)	3,800 (3,500- 4,500)	4,000 (3,300- 4,800)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Globulina	3,500 (2,700- 4,300)	3,450 (1,900- 4,000)	3,300 (1,800- 4,000)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Lipidograma (MG/dL)						
Coolesterol total	212,0 (143,0- 260,0)	158,5 (139,0- 227,0)	168,0 (108,0- 227,0)	p<0,05	p<0,05	p>0,05
HDL	57,00 (37,00- 88,00)	49,00 (35,00- 73,00)	51,00 (32,00- 80,00)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
LDL	106,5 (44,80- 155,4)	83,50 (62,40- 138,4)	78,90 (21,40- 138,4)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Triglicérido	173,5 (48,00- 349,0)	97,00 (61,00- 142,0)	203,0 (74,00- 279,0)	p<0,05	p>0,05	p<0,05
VLDL	34,70 (9,60- 77,20)	21,50 (12,20- 29,20)	38,10 (14,60- 55,80)	p<0,05	p>0,05	p<0,05
Citocinas (pg/mL)						
INF-γ	0,0 (0,0)	0,0 (0,0- 78,32)	0,0 (0,0- 34,92)	p<0,05	p>0,05	p>0,05
IL-6	0,960 (0,250- 1,480)	1,400 (0,690- 3,570)	1,320 (0,320- 2,330)	p<0,05	p>0,05	p>0,05
IL-8	3,430 (2,620- 4,280)	7,180 (3,430- 18,77)	4,420 (2,100- 11,21)	p<0,01	p>0,05	p>0,05
IL-10	0,730 (0,120- 0,960)	2,145 (1,080- 5,780)	2,150 (0,120- 5,780)	p<0,001	p<0,01	p>0,05
IL-5	0,0 (0,0)	0,0 (0,0- 0,340)	0,0 (0,0- 0,520)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
TNF-α	2,080 (1,340- 2,830)	2,270 (1,520- 3,200)	2,080 (0,970- 3,390)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
IL-2	0,0 (0,0)	0,0 (0,0- 0,070)	0,0 (0,0)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
IL 12p70	3,910 (2,690- 5,400)	3,910 (2,450- 5,900)	3,910 (1,720- 6,650)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
IL-1β	1,720 (1,320- 3,000)	1,720 (0,740- 4,110)	1,930 (1,130- 3,890)	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Já na segunda etapa do estudo observamos que os pacientes com dengue sem sinais de alarme apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de TXA<sub>2</sub> no grupo dengue IgM<sup>-</sup> e que este TXA<sub>2</sub> não foi ocasionado pelos CL nos leucócitos do sangue periférico. Uma vez que esta organela estava aumentada no grupo dengue IgM<sup>-</sup> das subpopulações CD16<sup>-</sup> e CD16<sup>+</sup> de monócitos, além disso, as enzimas COX-2 e TXA<sub>2</sub>S apresentaram redução dos níveis de mRNA nos leucócitos do sangue periférico no grupo dengue IgM<sup>-</sup>. A tabela 7 demonstra os valores obtidos nessa etapa desse estudo.

**Tabela 7:** Resumo dos resultados obtidos na segunda etapa do estudo

	Mediana e valores extremos			p Valor		
	NI	IgM <sup>-</sup>	IgM <sup>+</sup>	NI/IgM <sup>-</sup>	NI/IgM <sup>+</sup>	IgM <sup>-</sup> /IgM <sup>+</sup>
Níveis plasmáticos de eicosanoides (pg/mL)						
TXA <sub>2</sub>	155,3 (111,8-616,2)	141,3 (7,70-550,3)	555,9 (44,80-1713)	p>0,05	p<0,05	p<0,01
PGE <sub>2</sub>	28,20 (6,70-95,20)	77,60 (7,10-98,80)	81,55 (5,60-110,9)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
LTB <sub>4</sub>	592,0 (261,8-1315)	553,0 (342,2-1128)	873,0 (352,7-3254)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Nível de corpúsculo lipídico em leucócitos						
Eosínfilo (%)	2,985 (1,530-6,070)	0,780 (0,220-1,390)	2,730 (1,750-4,160)	p<0,001	p>0,05	p<0,001
Eosínfilo (IMF)	11325 (3926-26510)	12313 (6253-31489)	14184 (6080-23650)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Neutrófilo (%)	36,40 (32,50-43,80)	47,80 (23,00-79,10)	34,95 (23,10-51,90)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Neutrófilo (IMF)	7886 (3686-21666)	10810 (6015-40442)	11338 (5347-17779)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Monócito CD16 <sup>+</sup> (%)	15,10 (8,810-59,70)	39,55 (13,50-91,10)	29,70 (12,80-47,20)	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Monócito CD16 <sup>+</sup> (IMF)	9238 (3926-15600)	15007 (8027-47099)	14927 (7992-25519)	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Monócito CD16 <sup>-</sup> (%)	83,50 (36,80-89,60)	57,60 (7,270-85,30)	67,90 (50,90-86,30)	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Monócito CD16 <sup>-</sup> (IMF)	8806 (3663-14652)	13824 (7365-37892)	13451 (7834-23096)	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Linfócito TCD4 (%)	42,90 (31,90-54,70)	43,95 (27,60-50,30)	38,40 (30,70-45,10)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Linfócito TCD4 (IMF)	2466 (1649-8081)	3959 (1179-10294)	4365 (2782-6488)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Linfócito TCD8 (%)	23,85 (20,70-32,00)	23,65 (20,70-30,80)	33,65 (18,10-44,40)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Linfócito TCD8 (IMF)	2505 (1549-7365)	5497 (1696-15100)	4842 (2573-6703)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Linfócito B (%)	6,175 (4,590-11,10)	5,535 (2,350-12,50)	5,220 (2,210-7,430)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Linfócito B (IMF)	2539 (1798-8208)	5599 (1957-14550)	5039 (1741-6881)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Células NK (%)	72,60 (61,70-81,70)	59,95 (45,40-83,10)	46,20 (26,90-77,90)	p>0,05	p<0,001	p<0,05
Células NK (IMF)	2951 (2072-8736)	6703 (3227-14652)	8355 (2911-9929)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Células NKT (%)	2,300 (0,870-6,380)	4,145 (1,940-11,20)	3,540 (2,620-5,380)	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Células NKT (IMF)	3077 (2164-8814)	7252 (2826-21060)	7301 (2739-9751)	p>0,05	p>0,05	p>0,05



	Mediana e valores extremos			p Valor		
	NI	IgM <sup>-</sup>	IgM <sup>+</sup>	NI/IgM <sup>-</sup>	NI/IgM <sup>+</sup>	IgM <sup>-</sup> /IgM <sup>+</sup>
mRNA das enzimas for madoras de eicosanoides (quantificação relativa)						
COX-2	0,580 (0,210-6,020)	0,420 (0,020-6,330)	0,220 (0,030-0,810)	p>0,05	p<0,05	p>0,05
TXA <sub>2</sub> S	0,560 (0,280-4,930)	0,460 (0,160-5,990)	0,330 (0,110-3,310)	p>0,05	p<0,05	p>0,05
PGE <sub>2</sub> S	0,540 (0,160-3,410)	0,800 (0,430-1,400)	0,640 (0,400- 8,250)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
5-LOX	0,570 (0,270-6,250)	0,630 (0,130-5,790)	0,350 (0,130-1,590)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
LTA <sub>4</sub> H	0,600 (0,290-3,980)	0,460 (0,160-1,160)	0,400 (0,190-5,400)	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Carga viral (cópias de RNA viral / mL) e monócitos vacuolados (%)						
Carga viral	---	13335 (0,0-70400)	0,0 (0,0-5140)	---	---	p<0,01
Mon. vacuolado	7,275 (0,0-20,00)	21,60 (0,0-100,0)	16,60 (0,0-50,00)	p<0,05	p>0,05	p>0,05

## 6 DISCUSSÃO

Esse trabalho objetivou avaliar os níveis plasmáticos de eicosanóides, bem como os níveis de corpúsculos lipídicos e a expressão de genes envolvidos na síntese de enzimas da via dos eicosanóides em leucócitos do sangue periférico de indivíduos infectados pelo **Dengue vírus**.

Para a execução do trabalho foram selecionados 28 participantes que tiveram infecção por DENV confirmada. Na avaliação clínica, os participantes foram tratados como um grupo único. Isto foi necessário devido ao fato de que os voluntários, ao responderem o questionário, informaram os sintomas que apresentaram desde o início do quadro clínico e não apenas os sintomas no momento da coleta. Para as demais análises, os participantes com dengue, que apresentaram de 1 a 12 dias de sintomas, foram subdivididos de acordo com a cronologia da resposta humoral na dengue, em grupo IgM negativo e grupo IgM positivo. A produção de IgM se intensifica a partir do quinto dia de sintomas, momento em que começa a ser identificado nos testes sorológicos (GUZMAN et al., 2016; SIMMONS et al., 2015). Em nosso estudo, os participantes do grupo IgM negativo apresentaram em média 5 dias de sintomas, enquanto que os participantes do grupo IgM positivo apresentaram em média 8 dias de sintomas, o que é condizente com os relatos de produção de IgM (GUZMAN et al., 2016; SIMMONS et al., 2015).

Após a avaliação clínica e laboratorial, todos os participantes foram classificados como portadores de dengue sem sinal de alarme pela médica colaboradora do projeto. Apesar de alguns participantes terem informado sintomas condizentes com dengue com sinal de alarme, tais como vômito persistente, dor abdominal e hipotensão postural, esses sintomas foram isolados e nenhum necessitou de hospitalização para reidratação venosa, prática indicada pelo Ministério da Saúde em casos de dengue com sinais de alarme (MS 2018). Juntamente com a determinação dos sinais e sintomas, foram realizadas análises hematológicas e bioquímicas, que são importantes para auxiliar no diagnóstico e monitoramento da evolução clínica da dengue (WHO 2009). Os participantes apresentaram leucopenia, trombocitopenia e aumento das enzimas hepáticas AST e ALT, achados condizentes com o perfil laboratorial descrito para os portadores de dengue (HUANG et al., 2016; MANDAL et al., 2013). Contudo, nenhum apresentou níveis séricos de AST e ALT acima de 1000 U/mL, aumento progressivo do hematócrito e plaquetas abaixo de 100.000 por  $\text{mm}^3$  (NARVAEZ et al., 2011), reforçando assim que os participantes envolvidos em nosso estudo não apresentavam a forma grave da doença. É importante salientar ainda que nenhum

dos 12 participantes incluídos no grupo não infectado apresentou alterações clínicas ou laboratoriais compatíveis com dengue.

Além dos exames laboratoriais preconizados pelo Ministério da Saúde, também foi analisado o perfil lipídico dos participantes com dengue. Observamos uma diminuição de colesterol total independente da ausência ou presença de IgM, enquanto que diminuição de triglicerídeos foi observada apenas no grupo IgM negativo. Já os níveis de colesterol ligado à LDL e HDL não foram modificados pela infecção, enquanto que os níveis do colesterol ligado à VLDL estavam reduzidos no sangue dos indivíduos do grupo IgM negativo. A diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total tem sido descrita na dengue independente da forma clínica da doença, enquanto que pacientes com a forma grave da doença apresentaram níveis diminuídos de colesterol ligado à LDL (BISWAS et al., 2015; DURÁN et al., 2015). Já níveis plasmáticos aumentados de triglicerídeos têm sido observados em quadros graves de dengue (DURÁN et al., 2015; SUVARNA; RANE, 2009). Portanto, os baixos níveis de triglicerídeos e a não alteração dos níveis de colesterol ligado à LDL observados em nosso estudo, juntamente com os demais dados clínicos e exames laboratoriais, corrobora a conclusão de que os participantes apresentaram apenas a forma leve de dengue.

Além dos exames laboratoriais, também investigamos o perfil de citocinas para analisar a gravidade da doença nos participantes com dengue, já que estes mediadores inflamatórios podem tanto desempenhar um papel protetor, levando à depuração viral, como podem colaborar para os eventos fisiopatológicos vistos nos quadros graves de dengue (COSTA et al., 2013). Por exemplo, na infecção pelo DENV, o IFN- $\gamma$  pode ativar os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, causando a destruição de células infectadas, evitando assim a propagação viral (BOZZA et al., 2008). Por outro lado, também pode aumentar a captação de partículas virais por monócitos através do aumento de receptores Fc, o que favorece a propagação da doença (KONTNY; KURANE; ENNIS, 1988). Já a IL-8 é fortemente associada aos quadros mais graves de dengue, sua síntese é induzida pela proteína viral NS5, sugerindo que a produção de quimiocinas induzidas pelo DENV pode contribuir para a resposta inflamatória na dengue (HERRERO et al., 2013). A IL-8 tem um importante papel na ativação plaquetária seja por sua atividade quimioatrativa ou por seu efeito na permeabilidade endotelial pela ruptura de junções entre as células. A IL-6 juntamente com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , regulam a diferenciação de células T CD4 efectoras e de memória durante a infecção por DENV (SRIKIATKHACHORN; MATHEW; ROTHMAN, 2017). Já a IL-10, uma citocina anti-inflamatória, tem sido associada à supressão da atividade antiviral na dengue por inibir a ação

das células NK, além de atenuar a ativação de IFN- $\gamma$  (TSAI et al., 2013). Em nosso estudo observamos um aumento das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-8 no grupo dengue IgM negativo, porém no grupo IgM positivo os níveis dessas citocinas foram semelhantes aos do grupo controle. Em contrapartida, a citocina IL-10, que desempenha função anti-inflamatória, foi encontrada aumentada tanto no grupo IgM negativo quanto IgM positivo. É possível que no grupo IgM positivo, os elevados níveis de IL-10 tenham modulado negativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias, fazendo com que os participantes não tivessem desenvolvido sinais e sintomas relacionados à maior gravidade da dengue. Portanto, o perfil de citocinas encontrado, juntamente com os demais exames realizados, reforça que os participantes envolvidos em nosso estudo apresentavam dengue sem sinais de alarme.

De forma semelhante às citocinas, os eicosanoides são importantes mediadores inflamatórios, que podem desempenhar diferentes funções na patogênese da dengue (MALAVIGE; OGG, 2017). Em nosso estudo foi observado um aumento plasmático nos níveis de TXA<sub>2</sub>, nos participantes do grupo IgM positivo. Baseado no conhecido papel vasoconstritor e de agregação plaquetária desse eicosanoide e no fato de que o grupo não apresentou sinais graves de dengue, levantamos a hipótese de que o TXA<sub>2</sub> tenha um papel protetor na evolução clínica da doença (DORN; BECKER, 1993). A dengue é conhecida por causar lesão vascular, que está envolvida no extravasamento vascular e sangramento visto nos quadros graves da doença e a ação do TXA<sub>2</sub> pode explicar como este eicosanoide evitaria estes processos (MALAVIGE; OGG, 2017). Após a lesão vascular ocorre ativação plaquetária que leva a rápida produção de TXA<sub>2</sub>, que é então liberado no local da lesão onde amplifica a ativação plaquetária e recruta plaquetas adicionais, levando à formação de um tampão plaquetário, que isola temporariamente a lesão vascular (PANICCIA et al., 2015). Além disso, o TXA<sub>2</sub>, produzido por plaquetas e células endoteliais, age na célula muscular lisa onde interage com TP, receptor acoplado à proteína G, que quando ativada desencadeia a liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático, que culmina com a fosforilação da cadeia leve de miosina o que causa a contração muscular e, conseqüentemente, a vasoconstrição, colaborando, assim para impedir a perda de plasma ou sangue. (CHEN, 2018). Esta hipótese é reforçada pelo fato de que em nosso estudo não observamos alterações nos níveis plasmáticos de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>, que ao contrário do TXA<sub>2</sub> tem conhecido papel no aumento da permeabilidade vascular agindo por distintos mecanismos. (DENNIS; NORRIS, 2015). A PGE<sub>2</sub> interage com os receptores EP2 e EP4, que também são receptores acoplados à proteína

G, levando ao aumento intracelular de AMP cíclico, causando o relaxamento do músculo liso e levando a vasodilatação (RUAN; ZHOU; CHAN, 2011). Já o LTB<sub>4</sub>, produzido por neutrófilos ativados e macrófagos residentes no local da lesão, se liga ao receptor BLT1 em células mononucleares que liberam a proteína de ligação à heparina humana na interface com as células endoteliais que cria poros entre as células endoteliais, promovendo o extravasamento vascular (DI GENNARO et al., 2009).

Portanto, é possível que a combinação dos elevados níveis plasmáticos de TXA<sub>2</sub>, juntamente com a não alteração dos níveis plasmáticos de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> possa ter desempenhado um papel protetor contra o desenvolvimento dos mecanismos fisiopatológicos relacionados às formas graves de dengue nos participantes do nosso estudo. E de fato, tem sido sugerido que o TXA<sub>2</sub> pode desempenhar um papel protetor na dengue, uma vez que foram observados níveis reduzidos desse eicosanoide no sangue de pacientes com dengue que evoluíram com choque hipovolêmico, enquanto que pacientes com dengue grave que não evoluíram com choque apresentaram níveis normais de TXA<sub>2</sub>. Neste mesmo estudo, os pacientes com choque hipovolêmico apresentaram níveis aumentados de prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), um potente vasodilatador. Os autores hipotetizaram que o TXA<sub>2</sub> estivesse compensando os danos de PGI<sub>2</sub> (PREEYASOMBAT et al., 1999). Em contrapartida, a PGE<sub>2</sub> foi associada a um papel deletério na dengue, já que em um estudo onde 13 indivíduos com dengue foram avaliados, 11 indivíduos com elevados níveis de PGE<sub>2</sub> no sangue evoluíram para doença grave com extravasamento vascular, enquanto que os 2 indivíduos com níveis de PGE<sub>2</sub> semelhantes ao do controle não evoluíram para quadro grave de dengue (LIN et al., 2017). O aumento plasmático de LTB<sub>4</sub> foi observado em pacientes na fase febril de dengue, quando comparado à fase de convalescência, porém este aumento não foi relacionado à gravidade da doença (LOKE et al., 2013).

O TXA<sub>2</sub> e a PGE<sub>2</sub> são produtos da oxidação do AA pela ação de ambas as isoformas da ciclooxigenase, sendo a COX-1 constitutivamente ativa e a COX-2 induzida durante o dano celular e a inflamação. Esses eicosanoides são produto da ação direta das enzimas TXA<sub>2</sub>S e PGE<sub>2</sub>S. Por outro lado, o LTB<sub>4</sub> é um dos produtos da oxidação do AA pela enzima 5-LOX, sendo LTA<sub>4</sub>H a enzima final em sua via de síntese (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Devido à ampla distribuição das enzimas COX, virtualmente todas as células são capazes de produzir TXA<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>. Porém, o TXA<sub>2</sub> em resposta a diferentes doenças é produzido principalmente por macrófagos, células endoteliais e plaquetas, sendo as últimas a principal fonte fisiológica desse eicosanoide (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). A grande

capacidade das plaquetas em sintetizar TXA<sub>2</sub>, tanto em processos fisiológicos quanto inflamatórios, faz dessas células um importante alvo dos anti-inflamatórios. A COX plaquetária é o principal alvo do ácido acetilsalicílico, que ao inibir essa enzima diminui a síntese de TXA<sub>2</sub>. Esse efeito pode ser benéfico em várias doenças, como por exemplo, na doença cardiovascular onde auxilia a evitar a formação de trombos. Porém, a inibição medicamentosa da produção de TXA<sub>2</sub> é potencialmente perigosa na dengue pela possibilidade de agravar o extravasamento vascular e sangramento que levam ao choque (REMUZZI; FITZGERALD; PATRONO, 1992). Já a PGE<sub>2</sub> é produzida no decurso de uma resposta imunológica, principalmente por células epiteliais, fibroblastos e células inflamatórias (KALINSKI, 2012). Já os leucotrienos são produzidos predominantemente durante a resposta inflamatória em células inflamatórias como neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e linfócitos B, devido à ativação das enzimas 5-LOX e LTA<sub>4</sub>H (HOGGATT; PELUS, 2010).

Em nosso trabalho também analisamos se os leucócitos estavam envolvidos com a produção dos eicosanoides que mensuramos no plasma dos participantes com dengue. Para isso, primeiro quantificamos os corpúsculos lipídicos nas principais populações de leucócitos do sangue periférico, uma vez que essas organelas são os principais locais de produção de eicosanoides intracelulares (MELO et al., 2011). Avaliamos ainda a expressão gênica das principais enzimas envolvidas na síntese desses eicosanoides pela quantificação do mRNA.

Observamos que as subpopulações de monócitos CD16<sup>+</sup> e CD16<sup>-</sup>, do grupo IgM negativo, apresentaram aumento dos níveis de corpúsculos lipídicos, quando comparado ao grupo não infectado, enquanto que as demais populações de leucócitos avaliadas não apresentaram alteração nos níveis dessa organela independente da presença ou ausência de IgM. Na infecção pelo DENV, alterações nos níveis de CL têm sido descritas principalmente relacionadas à replicação viral (CARVALHO et al., 2012; HEATON; RANDALL, 2010; SAMSA et al., 2009). Samsa e colaboradores (2009) descreveram um acúmulo da proteína do C do DENV nos CL e um aumento dessa organela após a infecção *in vitro* de células BHK por DENV-2. Neste estudo, resíduos hidrofóbicos de aminoácidos na proteína C foram definidos como importantes para a associação do DENV com o CL e formação de novas partículas virais. Além disso, os mesmos autores mostraram que C75, um inibidor da enzima ácido graxo sintase diminuiu a quantidade de CL em células infectadas pelo DENV, inibindo a replicação viral em até 1000 vezes nas células infectadas (SAMSA et al., 2009). Carvalho e colaboradores (2012) também identificaram que a interação DENV com CL é uma interação proteína-proteína que acontece entre a proteína C viral e as proteínas da família PAT,

perilipina 1, perilipina 2 (ADRP) e perilipina 3 (TIP47), principais componentes proteicos na superfície dos CL, sendo a perilipina 3 a que apresentou a maior afinidade de ligação pela proteína C do DENV (CARVALHO et al., 2012). Em contrapartida, Heaton e colaboradores (2010) observaram depleção das áreas de CL correlacionada com o aumento dos autofagossomas. Essa depleção se deve a utilização dos ácidos graxos presentes nos CL como fonte de ATP através da  $\beta$  oxidação por meio da autofagia das organelas. Mesmo mostrando um comportamento oposto nos níveis de CL, este estudo também correlaciona essas os CL com a replicação viral (HEATON; RANDALL, 2010).

Nos leucócitos os corpúsculos lipídicos geralmente estão em número reduzido, porém aumentam em número e tamanho após a ativação celular. Assunção Miranda e colaboradores (2010) mostraram que a infecção natural por DENV alterou os níveis de CL em leucócitos (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2010). Em nosso estudo, analisamos os níveis de CL nas principais populações de leucócitos encontrados no sangue periférico dos participantes e identificamos os monócitos como a única população que sofre aumento dos níveis de CL durante a infecção natural com o DENV. Como os corpúsculos desempenham um importante papel durante a replicação do DENV e os monócitos são as únicas células comprovadamente permissivas à infecção e replicação do DENV *in vivo* (ROBERTS, 2015), levantamos a hipótese de que o aumento dos corpúsculos lipídicos nos monócitos possa estar relacionado à replicação viral. Um achado que reforça essa hipótese é o fato de que uma alta carga viral foi observada no plasma dos participantes IgM negativo, o mesmo grupo de indivíduos em que se observou o aumento dos níveis de CL nos monócitos. É interessante ressaltar que o aumento dos níveis CL ocorreu independente da presença de CD16, já que tanto as células CD16<sup>+</sup> e CD16<sup>-</sup> apresentaram aumento dos níveis de CL. E de fato, Wong e colaboradores (2012) relataram que a permissividade à infecção por DENV pelos monócitos e sua capacidade de replicação nessa célula é também independente da presença de CD16 (WONG et al., 2012). Paralelamente, observamos alteração morfológica nos monócitos, com aumento de vacúolos no mesmo grupo em que observamos aumento nos níveis de CL e da carga viral. Baseado no fato de que o CL é uma organela vacuolada, é possível que o aumento da vacuolização nos monócitos esteja relacionado ao aumento dos níveis de CL e, conseqüentemente a replicação viral. E de fato, essa alteração morfológica foi descrita anteriormente na dengue, mostrando a presença do DENV no interior dos vacúolos de monócitos (MOSQUERA et al., 2005).

Além do seu papel na replicação viral, os CL são organelas envolvidas na síntese de eicosanoides (MESQUITA-SANTOS et al., 2006). O fato de que os CL não estavam alterados

no grupo IgM positivo, que se caracterizou por apresentar níveis elevados de TXA<sub>2</sub> no plasma, nos fez hipotetizar que os leucócitos não seriam as principais fontes de TXA<sub>2</sub> durante a forma branda da dengue. A nossa hipótese foi sustentada pela redução da expressão de mRNA das enzimas COX-2 e TXA<sub>2</sub>S nos leucócitos do grupo IgM positivo, mesmo grupo onde o aumento TXA<sub>2</sub> foi observado. Em estados de doença, outras células e órgãos podem contribuir para a síntese TXA<sub>2</sub> como plaquetas, células endoteliais, pulmão e rim (REMUZZI; FITZGERALD; PATRONO, 1992). Como mencionado anteriormente a lesão vascular pode desencadear a produção de TXA<sub>2</sub> por plaquetas ativadas (PANICCIA et al., 2015) e a dengue é capaz de acarretar tanto lesão vascular (MALAVIGE; OGG, 2017) quanto ativação plaquetária (OJHA et al., 2017). Portanto, é possível que no nosso estudo as plaquetas possam ser a fonte do TXA<sub>2</sub> encontrado em altos níveis no plasma dos participantes do grupo IgM positivo. Além das plaquetas, é provável que as células endoteliais, que podem ser ativadas pelo DENV (DALRYMPLE; MACKOW, 2012), também podem ter contribuído para o aumento dos níveis plasmáticos de TXA<sub>2</sub> no grupo IgM positivo.

O nosso estudo foi o primeiro a avaliar os níveis do mRNA da enzima TXA<sub>2</sub>S em leucócitos do sangue periférico durante o curso natural da infecção pelo DENV. Os níveis de mRNA das enzimas PGE<sub>2</sub>S e LTA<sub>4</sub>H também não haviam sido analisados durante a dengue e seus níveis não se alteraram nos leucócitos dos participantes com dengue. Também avaliamos os níveis de mRNA da enzima 5-LOX nos leucócitos durante a dengue e seus níveis não estavam alterados. Já foi relatado, *in vitro*, que o DENV-2 é capaz de aumentar a expressão de 5-LOX em neutrófilos, com consequente liberação de LTB<sub>4</sub> para o sobrenadante de cultura (LOKE et al., 2013). É possível que esse resultado que contrasta com o nosso possa ser explicado pelo fato de que nos ensaios efetuados por Loke e cols. as células foram expostas ao vírus por um curto período de tempo (7 h) e a uma alta carga viral, o que não reflete a progressão da doença ou a complexidade da resposta imune observada na infecção natural pelo DENV. Em contrapartida, os níveis de mRNA da enzima COX-2 estava diminuído nas células do grupo IgM positivo. De maneira oposta, Lin e colaboradores (2017) relataram um aumento em células sanguíneas de pacientes com dengue e correlacionaram este aumento ao agravamento da doença por terem observado que a COX-2 facilita a multiplicação e a propagação do DENV. Juntamente com estes achados, eles também mostraram, em modelo murino, que a administração de NS398, inibidor da COX-2, suprimiu a replicação do DENV. Além disso, este mesmo inibidor também foi capaz de suprimir a replicação viral em linhagens de monócitos humanos experimentalmente infectados com DENV-2 (LIN et al.,



2017). Diversos aspectos podem explicar as diferenças entre os nossos resultados e os obtidos por Lin e cols. Por exemplo, enquanto que em nosso estudo os participantes apresentavam a forma mais branda da dengue, o trabalho de Lin e cols envolveu participantes com a forma grave da dengue. Além disso, enquanto o nosso grupo trabalhou com leucócitos isolados do sangue periférico, Lin e cols trabalharam com sangue total e a presença de plaquetas e hemácias pode ter contribuído para o aumento do mRNA de **COX-2**, uma vez que as hemácias e as plaquetas também podem expressar **COX-2** (ROCCA et al., 2002, 2004).

Sendo assim, baseado nos achados de nosso estudo, propomos um modelo para o papel dos CL e  $TXA_2$  no prognóstico da dengue (figura 25). A infecção por DENV desencadeia alterações em monócitos como o aumento de CL e da vacuolização dessas células, que podem ser importante sítio para replicação viral. Além disso, alta carga viral e desequilíbrio da resposta imune podem desencadear alterações vasculares que favoreçam o extravasamento vascular e sangramento. Contudo, o aumento de  $TXA_2$ , possivelmente produzido por plaquetas e células endoteliais vasculares, após a soroconversão de IgM pode favorecer a agregação plaquetária evitando o sangramento, além de causar vasoconstrição o que evita o extravasamento vascular, ambos fenômenos observados na dengue grave. Esses resultados foram recentemente publicados pelo nosso grupo (OLIVEIRA et al., 2018) (Apêndice 3).

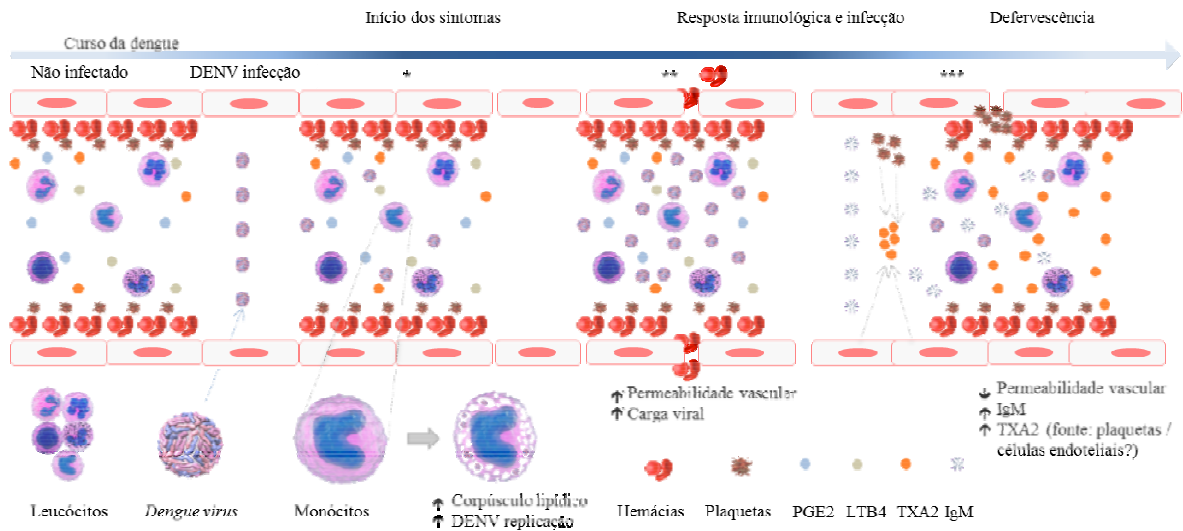


Figura 25- Modelo esquemático do papel do CL e TXA<sub>2</sub> no prognóstico da dengue. Durante o curso da infecção por DENV, o vírus desencadeia alterações morfológicas e funcionais nos monócitos, aumentando a quantidade de CL e vacúolos, que podem ser locais ideais de replicação viral (\*). Além disso, uma alta carga viral e uma resposta imune desequilibrada podem levar ao aparecimento de sintomas de dengue, incluindo danos vasculares com extravasamento de plasma e sangramento (\*\*). Entretanto, após a soroconversão, caracterizada pela produção de IgM, níveis elevados de TXA<sub>2</sub> são produzidos, supostamente por plaquetas e/ou células endoteliais, que podem desencadear vasoconstrição e agregação plaquetária, impedindo o intenso extravasamento vascular e sangramento observados em casos graves de dengue. (\*\*\*)

## 9 CONCLUSÃO


Baseado nos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o aumento de CL observados nas subpopulações CD16<sup>+</sup> e CD16<sup>-</sup> de monócitos, na fase inicial da infecção por DENV, não estava relacionada à síntese de eicosanoides. Essa conclusão foi possível pelo fato de não termos observado aumento das enzimas formadoras de eicosanoides nos leucócitos nessa fase da doença. Além disso, como o aumento dos CL coincidiu com a carga viral mais elevada, hipotetizamos que os CL estivessem relacionados com a replicação do DENV nos monócitos. Concluimos também que, na forma clássica da dengue, a ativação das vias de síntese dos eicosanoides ocorre exclusivamente durante a fase de defervescência da doença, sendo caracterizada pela elevada produção de TXA<sub>2</sub>. Como os indivíduos analisados em nosso estudo não desenvolveram dengue grave e o TXA<sub>2</sub> é um potente vasoconstritor e agregador plaquetário, hipotetizamos que esse mediador lipídico possa ter um papel importante na limitação do desenvolvimento do extravasamento vascular e sangramento durante a infecção pelo DENV. Também verificamos que os leucócitos do sangue periférico não foram responsáveis pelos elevados níveis plasmáticos de TXA<sub>2</sub> observados nos indivíduos com dengue, uma vez que, os leucócitos apresentaram níveis reduzidos de mRNA das enzimas COX-2 e TXA<sub>2</sub>S, que são as responsáveis pela síntese de TXA<sub>2</sub>. Mais estudos que envolvam indivíduos com diferentes manifestações clínicas e em diferentes populações celulares, como plaquetas e células endoteliais, são necessários para investigar o papel dos CL, bem como as vias de síntese de eicosanoides mediados por COX e 5-LOX durante a infecção pelo DENV. Portanto, tomados em conjunto, os nossos dados sugerem que os CL podem ser alvos terapêuticos interessantes para controlar a replicação viral durante a infecção pelo DENV e ainda que os eicosanoides possam servir como importantes alvos terapêuticos e/ou biomarcadores do prognóstico da dengue.

## 10 PERSPECTIVAS

Em nosso trabalho propusemos que os corpúsculos lipídicos em monócitos funcionem como locais para replicação e montagem do DENV. Além disso, também propusemos que o perfil de eicosanóides apresentado pelo indivíduo infectado pelo DENV pode ser importante para impedir o estabelecimento das formas mais graves da doença. E ainda que outras células, que não os leucócitos, poderiam ser responsáveis pela produção de eicosanóides durante a dengue. Para confirmar as hipóteses propostas em nosso trabalho será necessária a realização de novos ensaios. Portanto, nas próximas etapas do estudo pretendemos avaliar: a) o papel dos CL na replicação viral em monócitos humanos; b) o perfil de eicosanóides em indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue; e c) se plaquetas e células endoteliais são fontes de TXA<sub>2</sub> e/ou outros eicosanóides durante a dengue. Esses novos estudos poderão acrescentar informação importante sobre o papel dos CL e dos eicosanóides durante a dengue e poderão subsidiar a criação de novas medidas para acompanhamento e tratamento da dengue.

## 11 REFERÊNCIAS

- AGARD, M.; ASAKRAH, S.; MORICI, L. A. PGE 2 suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. v. 3, n. August, p. 1–11, 2013.
- Applied Biosystems. Relative Quantitation Using Comparative C. 2006. Disponível em: <papers3://publication/uuid/BDBB14AF-36A9-4B7B-875F-4E9A02186C90.pdf> acesso em: 11 May 2017.
- ANDERSON, J. R.; RICO-HESSE, R. the Infecting Genotype of Dengue Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n. 5, p. 886–892, 2006.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I. et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB journal* [official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology], v. 24, n. 1, p. 218–28, 2010.
- AVIRUTNAN, P. et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 193, p. 1078–1088, 2006.
- AZEREDO, E. L. et al. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 143, p. 345–356, 2006.
- BASHYAM, H. S.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 176, p. 2817–2824, 2006.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, p. 504–7, 2013.
- BISWAS, H. H. et al. Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Are Associated with Severe Dengue Outcome. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, p. 1–19, 2015.
- Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>. Acesso em: 17 junho 2018.
- Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 17 de 2018. Disponível em <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/junho/11/2018-022.pdf>. Acesso em: 17 junho 2018.
- BOZZA, F. A. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC infectious diseases*, v. 8, p. 86, 2008.
- BOZZA, P. T. et al. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids Lipid body function in eicosanoid synthesis. An update. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 85, n. 5, p. 205–213, 2011.
- BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 113, p. 30–49, 2007.

- BRAGA, E. L. et al. Detection of circulant tumor necrosis factor- $\alpha$ , soluble tumor necrosis factor p75 and interferon- $\gamma$  in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. February, p. 229–232, 2001.
- PREEYASOMBAT, C. et al. The role of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) in pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF). *Journal of the Medical Association of Thailand*, v. 82, n. November, p. 16–21, 1999.
- CARVALHO, F. A. et al. Dengue Virus Capsid Protein Binding to Hepatic Lipid Droplets (LD) Is Potassium Ion Dependent and Is Mediated by LD Surface Proteins. *Journal of Virology*, v. 86, n. Ld, p. 2096–2108, 2012.
- CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Revista de Microbiologia*, v. 44, p. 649–688, 1990.
- CHEN, H. Role of thromboxane A<sub>2</sub> signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, v. 134, n. November 2017, p. 32–37, 2018.
- COLOGNA, R.; RICO-HESE, R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Journal of virology*, v. 77, n. 7, p. 3929–38, 2003.
- COSTA, V. V. et al. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: Protection versus disease induction. *American Journal of Pathology*, v. 182, n. 6, p. 1950–1961, 2013.
- DA SILVA, M. M. C. et al. Potential biomarkers for the clinical prognosis of severe dengue. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. September, p. 755–762, 2013.
- DALRYMPLE, N. A.; MACKOW, E. R. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Advances in Virology*, v. 2012, 2012.
- DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Publishing Group*, v. 15, n. 8, p. 511–523, 2015.
- DI GENNARO, A. et al. Leukotriene B<sub>4</sub>-induced changes in vascular permeability are mediated by neutrophil release of heparin-binding protein (HBP/CAP37/azurocidin). *The FASEB Journal*, v. 23, p. 1750–1757, 2009.
- DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*, v. 162, n. 3, p. 488–492, 2015.
- DORN, G. W.; BECKER, M. W. Thromboxane A<sub>2</sub> stimulated signal transduction in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 265, p. 447–456, 1993.
- DURÁN, A. et al. Association of lipid profile alterations with severe forms of dengue in humans. *Archives of Virology*, v. 160, p. 1687–1692, 2015.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. *Nature Publishing Group*, v. 2, p. 1–26, 2016.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue  Dawn of a New Era. v. 4, n. May, p. 1–8, 2016.
- HEATON, N. S.; RANDALL, G. Dengue virus induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell host & microbe*, v. 8, n. 5, p. 422–432, 2010.

- HEDI, H.; NORBERT, G. 5-Lipoxygenase pathway, dendritic cells, and adaptive immunity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2004, p. 99–105, 2004.
- HERKER, E.; OTT, M. Emerging Role of Lipid Droplets in Host / Pathogen Interactions \* Lipid Droplets: More than Just Fat Storage. *Journal of biological chemistry*. v. 287, n. 4, p. 2280–2287, 2012.
- HERRERO, L. J. et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 137, n. 2, p. 266–282, 2013.
- HOGGATT, J.; PELUS, L. M. Eicosanoid regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem and progenitor trafficking. *Leukemia*, v. 24, n. 12, p. 1993–2002, 2010.
- HUANG, H. et al. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine outcome. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 7, p. 713–718, 2016.
- JOHN, A. L. S.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nature Publishing Group*, v. 11, n. 6, p. 420–426, 2013.
- JOHN, D. V.; LIN, Y.; PERNG, G. C. Biomarkers of severe dengue disease – a review. *Journal of Biomedical Science*, p. 1–7, 2015.
- JOHN, ST, A. L. et al. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. *PNAS*. p. 1–6, 2011.
- KALINSKI, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *J Immunol*, v. 27, n. 1, p. 339–351, 2012.
- KELLEY, J. F.; KAUFUSI, P. H.; NERURKAR, V. R. Dengue hemorrhagic fever-associated immunomodulators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability. *Virology*, v. 422, n. 2, p. 326–337, 2012.
- KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *Journal of Immunology Research*. v. 2016, n. 3, 2016.
- KONTNY, U.; KURANE, I.; ENNIS, F. A. Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *J Virol*, v. 62, n. 11, p. 3928–3933, 1988.
- KUROSU, T. et al. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 362, p. 1051–1056, 2007.
- LEE, Y. R. et al. MCP1, 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. *Journal of General Virology*, v. 87, n. 2006, p. 3623–3630, 2006.
- LEI, H. Y. et al. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *Journal of Biomedical Science*, v. 8, n. October, p. 377–388, 2001.
- LEI, H.-Y. et al. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *American Journal of Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2008.

- LIN, C. F. et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *Journal of Medical Virology*, v. 63, n. February, p. 143–149, 2001.
- LIN, C. K. et al. Cyclooxygenase-2 facilitates dengue virus replication and serves as a potential target for developing antiviral agents. *Scientific Reports*, v. 7, n. August 2016, p. 1–15, 2017.
- LIN, C.-F. et al. Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules during Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein 1. *The Journal of Immunology*, v. 174, p. 395–403, 2005.
- LIU, I.-J. et al. Molecular Mimicry of Human Endothelial Cell Antigen by Autoantibodies to Nonstructural Protein 1 of Dengue Virus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 11, p. 9726–9736, 2011.
- LIU, M.; YOKOMIZO, T. *Allergology International The role of leukotrienes in allergic diseases. Allergology International*, v. 64, n. 1, p. 17–26, 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LOKE, W. M. et al. Augmentation of 5-lipoxygenase activity and expression during dengue serotype-2 infection. *Virology Journal*, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.
- LOO, Y.-M. et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *Journal of virology*, v. 82, n. 1, p. 335–45, 2008.
- MALAVIGE, G. N.; OGG, G. S. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, v. 151, p. 261–269, 2017.
- MANDAL, S. K. et al. CLINICAL PROFILES OF DENGUE FEVER IN A TEACHING HOSPITAL OF EASTERN INDIA. *NATIONAL JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH*, v. 3, n. Apr – June, p. 173–176, 2013.
- MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, v. 175, p. 2676–83, 2005.
- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 4, p. 564–581, 2009.
- MCCARTHY, M. K.; WEINBERG, J. B. Eicosanoids and Respiratory Viral Infection. *Coordinators of Inflammation and Potential Therapeutic Targets. Mediators of Inflammation. Volume 2012, Article v. 2012, 2012.*
- Ministério da saúde; disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue>>, acesso em: maio 2018.
- MELO, R. C. N. et al. Lipid Bodies in Inflammatory Cells. *Structure, Function, and Current Imaging Techniques. Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2011.
- MESQUITA-SANTOS, F. P. et al. Cutting edge: prostaglandin D2 enhances leukotriene C4 synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, v. 176, p. 1326–1330, 2006.



- MILLER, J. L. et al. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS pathogens*, v. 4, n. 2, p. 11, 2008.
- MOSQUERA, J. A. et al. Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes. *Virology Journal*, v. 2, p. 1–14, 2005.
- NARVAEZ, F. et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 11, p. 1–8, 2011.
- NASCIMENTO, E. J. M. et al. Gene expression profiling during early acute febrile stage of dengue infection can predict the disease outcome. *PLoS one*, v. 4, n. 11, p. e7892, 2009.
- NICOLAOU, A. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids Eicosanoids in skin inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 88, n. 1, p. 131–138, 2013.
- NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology journal*, v. 6, p. 211, 2009.
- OHNISHI, H.; MIYAHARA, N.; GELFAND, E. W. The role of leukotriene B(4) in allergic diseases. *Allergy international* [official journal of the Japanese Society of Allergy], v. 57, n. 4, p. 291–8, 2008.
- OJHA, A. et al. Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Scientific Reports*, v. 7, n. August 2016, p. 1–10, 2017.
- OLAGNIER, D. et al. Dengue Virus Immunopathogenesis: Lessons Applicable to the Emergence of Zika Virus. *Journal of Molecular Biology*, 2016.
- OLIVEIRA, E. S. et al. Increased Levels of Txa<sub>2</sub> Induced by Dengue Virus Infection in IgM Positive Individuals Is Related to the Mild Symptoms of Dengue. *Viruses*, v. 10, 2018.
- Organização mundial de saúde; disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>, acesso em: maio 2018.
- PACIDÔNIO, E. C. et al. The impact of Wolbachia infection on the rate of vertical transmission of dengue virus in Brazilian *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 296, 2017.
- PANICCIA, R. et al. Platelet Function tests: A Comparative Review. *Vascular Health and Risk Management*, v. 11, p. 133–148, 2015.
- PRATT, C. L.; BROWN, C. R. The role of eicosanoids in experimental Lyme arthritis. *Cellular and infection microbiology*. v. 4, n. May, p. 1–6, 2014.
- REMUZZI, G.; FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. Thromboxane synthesis and action within the kidney. *Kidney International*, v. 41, p. 1483–1493, 1992.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. ATVB in Focus Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* p. 986–1001, 2011.
- RICHARDSON, J. et al. Quantitative Analysis of Dengue-2 Virus RNA during the Extrinsic Incubation Period in Individual *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, v. 74, n. 1, p. 132–141, 2006.

ROBERTS, C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Publishing Group*, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015.

ROCCA, B. et al. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 7634–9, 2002.

ROCCA, B. et al. Modulation of the expression and activity of cyclooxygenases in normal and accelerated erythropoiesis. *Experimental Hematology*, v. 32, p. 925–934, 2004.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Publishing Group*, v. 11, n. 8, p. 532–543, 2011.

RUAN, Y. C.; ZHOU, W.; CHAN, H. C. Regulation of Smooth Muscle Contraction by the Epithelium: Role of Prostaglandins. *Physiology*, v. 26, n. 47, p. 156–170, 2011.

SAMSA, M. M. et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 10, 2009.

SEREZANI, C. H. et al. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 1950), v. 177, p. 3201–3208, 2006.

SHRESTA, S. et al. Murine Model for Dengue Virus-Induced Lethal Disease with Increased Vascular Permeability. *Journal of Virology*, v. 80, n. 20, p. 10208–10217, 2006.

SIMMONS, C. P. et al. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. *Vaccine* v. 33, p. 7061–7068, 2015.

SRIKIATKHACHORN, A.; MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Seminars in Immunopathology*, v. 39, p. 563–574, 2017.

SUTHERLAND, M. R. et al. Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units. *Transfusion*, v. 56, n. January, p. 1129–1137, 2016.

SUVARNA, J. C.; RANE, P. P. Serum lipid profile: a predictor of clinical outcome in dengue infection. *Tropical medicine & international health* TM & IH, v. 14, n. 5, p. 576–585, 2009.

TASSANEETRITHEP, B. et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 197, n. 7, p. 823–9, 2003.

TSAI, T. et al. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *Journal of Biomedical Science*. p. 1–9, 2013.

TSAI, Y. T. et al. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cellular Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 604–615, 2009.

WONG, K. L. et al. Susceptibility and Response of Human Blood Monocyte Subsets to Primary Dengue Virus Infection. *PLoS ONE* | v. 7, n. 5, 2012.

WU, S. J. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*, v. 6, n. 7, p. 816–20, 2000.

## Anexo 1- Parecer substanciado do comitê de ética

CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos corpúsculos lipídicos, das enzimas formadoras de eicosanóides e de seus produtos em indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue

**Pesquisador:** Érica Alessandra Rocha Alves

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 55135116.0.0000.5091

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/

**Patrocinador Principal:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/ FIOCRUZ  
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.243.113

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de emenda ao projeto de pesquisa que visa avaliar o papel dos eicosanóides na evolução clínica da dengue. Não é totalmente compreendido porque alguns indivíduos resolvem a infecção pelo DENV rapidamente e sem complicações, enquanto outros apresentam formas mais graves da doença. Vários fatores são responsabilizados pelas diferentes evoluções clínicas apresentadas pelos indivíduos com dengue, dentre os quais o tropismo e a virulência do DENV, a ativação do sistema complemento e a resposta humoral e de células T, bem como as citocinas produzidas pelo hospedeiro.

No projeto original foi proposto a análise das enzimas formadoras de eicosanóides, ciclooxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LOX), por citometria de fluxo. Contudo, não foi possível a análise de tais enzimas por meio desta técnica, pois não se conseguiu realizar a marcação adequada das mesmas durante a padronização dos ensaios. Devido a tal problema, para a análise dos leucócitos já coletados e que se encontram criopreservados a - 80oC, essa técnica será substituída pela análise da expressão gênica destas mesmas enzimas.

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/**



Continuação do Parecer: 2.243.113

Além disso, também será incluída a análise da expressão gênica das enzimas prostaglandina E2 sintase (PGE2S), tromboxano A2 sintase (TXA2S) e leucotrieno A4 hidrolase (LTA4H), que são as enzimas geradoras de PGE2, TXA2 e LTB4, que serão quantificados no soro dos voluntários, como especificado no projeto original. Além disso, para ampliar o painel de citocinas pró-inflamatórias analisadas também foram incluídas as dosagens de IL-8 e IL-1beta no soro dos voluntários.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Geral: Analisar os corpúsculos lipídicos, as enzimas formadoras de eicosanóides e seus produtos em indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue.

Objetivos Específicos:

- a) Quantificar a frequência de leucócitos expressando corpúsculos lipídicos em sangue periférico obtido de indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue.
- b) Determinar a frequência de leucócitos expressando ciclooxigenase-2 (COX-2) em sangue periférico proveniente de indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue.
- c) Analisar a frequência de leucócitos expressando 5-lipooxigenase (5-LOX) em sangue periférico oriundos de indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue.
- d) Verificar os níveis de expressão gênica das enzimas COX-2, 5-LOX, PGE2 sintase (PGE2S), TXA2 sintase (TXA2S) e leucotrieno A4 hidrolase (LTA4H) em leucócitos do sangue periférico oriundos de indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue.
- e) Mensurar os níveis dos eicosanóides prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano B2 (TXA2) e leucotrieno B4 (LTB4) contidos no soro de indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue.
- d) Dosar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, TNF-, IFN-, IL-8 e IL-1 contidos no soro de indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios apontados pelos pesquisadores são:

Riscos: Os riscos envolvem tanto os doadores de sangue como os profissionais de saúde envolvidos na obtenção das amostras. É importante que o pesquisador tenha um breve histórico clínico do voluntário. Os principais riscos para doador estão relacionados com o momento da coleta, sendo eles: infecção no local da coleta; Dor no local da coleta de amostra de sangue; Hematoma ou trombo; Sangramento excessivo; Comprometimento de nervo; Reação vasovagal; Síncope. Para o profissional de saúde responsável pela obtenção da amostra, os riscos envolvem:

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715		CEP: 30.190-002
Bairro: Barro Preto		
UF: MG	Município: BELO HORIZONTE	
Telefone: (31)3349-7825	Fax: (31)3349-7825	E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 2.243.113

Lesão por agulha ou objeto perfurocortante durante ou depois do procedimento; Ruptura de recipiente de sangue; Exposição a sangue.

**Benefícios:** O benefício do projeto consiste em contribuir para o desenvolvimento de estudos relacionando infecções pelo Dengue virus e os eicosanoides, cujos resultados podem colaborar para a elaboração de novas medidas terapêuticas que proporcionem um restabelecimento mais rápido dos indivíduos que fizerem as formas mais graves de dengue.

A presente pesquisa apresenta relação risco-benefício positiva. Apesar dos participantes não terem benefício direto, os resultados da pesquisas poderão ajudar a comunidade científica a entender melhor os mecanismos envolvidos na evolução clínica da dengue. Por outro lado, os riscos envolvidos são mínimos e estão relacionados ao procedimento de coleta de sangue.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O tema abordado pela pesquisa tem relevância, principalmente, se consideramos a alta prevalência de casos de dengue no país. Entender quais os mecanismos imunológicos que podem determinar a evolução da doença para desfechos mais graves é de fundamental importância para a diminuição das taxas de mortalidade relacionadas à dengue.

A presente emenda foi proposta em decorrência de questões metodológicas mas o objetivo geral do estudo permanece inalterado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados.

**Recomendações:**

Vide "Considerações Finais a Critério do CEP".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após análise, esta relatoria recomenda a aprovação da emenda.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após submissão e análise criteriosa da emenda em questão, constamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições a ele concedidas pela Legislação

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715		CEP: 30.190-002
Bairro: Barro Preto		
UF: MG	Município: BELO HORIZONTE	
Telefone: (31)3349-7825	Fax: (31)3349-7825	E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/**



Continuação do Parecer: 2.243.113

vigente, manifesta-se pela aprovação das modificações no referido projeto de pesquisa. Firma-se, diante deste documento, a necessidade de apresentação dos relatórios anuais e final, bem como a notificação de eventos adversos, novas emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_980469 E1.pdf	18/08/2017 10:26:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	18/08/2017 10:24:06	Érica Alessandra Rocha Alves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_REV.doc	17/08/2017 11:45:39	Érica Alessandra Rocha Alves	Aceito
Outros	CartaRespostaparaoCEP.pdf	19/07/2016 11:47:14	Eneida Santos de Oliveira	Aceito
Outros	questionario.doc	19/07/2016 11:46:42	Eneida Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciaGilberto.jpg	19/07/2016 11:45:43	Eneida Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuenciaLais.jpg	19/07/2016 11:45:29	Eneida Santos de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	19/07/2016 11:45:07	Eneida Santos de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.docx	11/04/2016 14:46:10	Érica Alessandra Rocha Alves	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
 Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

Apêndice 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “avaliação dos corpúsculos lipídicos, das enzimas formadoras de eicosanoides e de seus produtos em indivíduos com diferentes formas clínicas de dengue”.

Você foi selecionado de forma aleatória e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento.

Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo deste estudo é estudar, através de ensaios celulares e bioquímicos, o papel da resposta imunológica pelos eicosanoides na evolução clínica da dengue.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em ceder cerca de 20mL de seu sangue.

Os riscos relacionados com sua participação envolvem apenas os riscos de um procedimento para coleta de sangue, sendo os eventos menos graves, dor no local da picada para a coleta, ansiedade, hematomas e desmaio.

O principal benefício relacionado com a sua participação consiste em contribuir para o desenvolvimento científico, auxiliando na construção de conhecimento a respeito do vírus da dengue e a gravidade da doença.

Suas informações pessoais serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, pois não serão citados nomes. As amostras serão identificadas apenas por números.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP - CPqRR, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

---

Eneida Santos de Oliveira

Endereço e telefone institucional do Pesquisador Principal - CPqRR/FIOCRUZ Minas  
 - Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto – sala 406 - Belo Horizonte (Cep: 30190-002)  
 - Pesquisador: Érica Alessandra Rocha Alves - Telefone: (31) 3349 7836  
 E-mail: erica.alves@cpqrr.fiocruz.br

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - CPqRR/FIOCRUZ Minas  
 - Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002)  
 -Secretária: Bernadete Patrícia Santos – TeleFax: (31) 3349 7825  
 e-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

---

Sujeito da pesquisa

## Apêndice 2- Questionário

## FICHA DE INFORMAÇÃO SOBRE O PACIENTE COM SUSPEITA CLÍNICA DE DENGUE

Data de  
Preenchimento: \_\_/\_\_/\_\_

Código: \_\_\_\_\_

Jejum/Horas: \_\_\_\_\_

I Parte: Identificação

1-Nome completo: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_

2- Sexo

 Masculino (1)     Feminino (2)

3- Idade (em anos completos) \_\_\_\_\_

4- Data de Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_

5- Bairro de residência \_\_\_\_\_

II Parte: Exames clínicos

6- Pressão arterial: \_\_\_\_\_

7- Temperatura: \_\_\_\_\_

8- Prova do laço: \_\_\_\_\_

III Parte : Sinais, Sintomas e diagnóstico clínico.

9- Data de Início dos Sintomas : \_\_/\_\_/\_\_

10- Febre alta (Anotar quantos dias de febre \_\_\_\_\_)

 Presente (1)     Ausente (2)

11- Dor de Cabeça (cefaléia)

 Presente (1)     Ausente (2)

12- Dor nos olhos (retroocular)

 Presente (1)     Ausente (2)

13- Dor muscular (mialgia)

 Presente (1)     Ausente (2)

14- Dor nas juntas (artralgia)

 Presente (1)     Ausente (2)

15- Manchas pelo corpo (petéquias, púrpuras ou rash disseminado)

 Presente (1)     Ausente (2)



16- Prostração

Presente (1)       Ausente (2)

17- Hemorragias

Presente (1)       Ausente (2)

IV Parte : Sinais de alarme/ choque.:

18- Dor abdominal intensa e contínua

Presente (1)       Ausente (2)

19- Vômitos persistentes;

Presente (1)       Ausente (2)

20- Desmaios (lipotímia) ou “corpo mole” (hipotensão postural)

Presente (1)       Ausente (2)

21- Hemorragias intensas (hematêmese ou melena)

Presente (1)       Ausente (2)

22- Sonolência e/ou irritabilidade

Presente (1)       Ausente (2)

23-Diminuição da quantidade de urina (diurese reduzida)

Presente (1)       Ausente (2)

24- Baixa rápida na temperatura (hipotermia brusca)

Presente (1)       Ausente (2)

25- Desconforto respiratório

Presente (1)       Ausente (2)

26- Hipotensão Arterial

Presente (1)       Ausente (2)

27- Extremidades Frias

Presente (1)       Ausente (2)

28- Pulso rápido e fino

Presente (1)       Ausente (2)

V Parte : Histórico de Dengue

29- Infecções prévias por DENV

Presente (1)       Ausente (2)

## 30- Sorologia para Dengue

- Positiva (1)
- Negativa (2)
- Não realizada (3)

VI Parte: Colesterol

31- Data do último exame realizado \_\_\_\_\_

32- apresentou alteração (anotar qual alteração) \_\_\_\_\_

- Presente (1)       Ausente (2)

33- Usa medicamento para controle de colesterol

- Presente (1)       Ausente (2)

VII Parte: Medicamentos34- Faz uso de constante de algum medicamento?  Sim  Não Se sim, qual? \_\_\_\_\_35- Está utilizando Paracetamol?  Sim  Não

36- Quantas vezes por dia esta utilizando Paracetamol? \_\_\_\_\_

37- Utiliza Paracetamol por outros motivos?  Sim  Não Qual frequência? \_\_\_\_\_38- Faz uso de bebidas alcoólicas?  Sim  Não Qual frequência? \_\_\_\_\_VIII Parte: Amostra

Hora da coleta: \_\_\_\_\_

Condições de armazenamento (quanto tempo ficou em temp ambiente, qdo foi processada):

---



---



---



---