

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIEL DE JESÚS LIMONTA VELÁZQUEZ

MARCADORES CIRCULANTES DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE EM DENGUE

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

Orientadora: Prof. Dra Rita Maria Ribeiro Nogueira

Colaboradora: Prof. Dra Luzia Maria de Oliveira Pinto

RIO DE JANEIRO

2012

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

L734

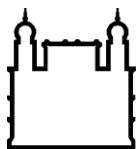
Limonta Velázquez, Daniel de Jesús

Marcadores circulantes de morte celular por apoptose em dengue /
Daniel de Jesús Limonta Velázquez. – Rio de Janeiro, 2012.
xv, 75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2012.
Bibliografia: f. 65-75

1. Dengue. 2. Apoptose. 3. Marcadores circulantes. 4. Gravidade.
I.Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Daniel de Jesús Limonta Velázquez

**MARCADORES CIRCULANTES DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE EM
DENGUE**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira

COLABORADORA: Prof. Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

Aprovada em: 26 de março de 2012

EXAMINADORES:

Profa. Dra.	Roberta Olmo Pinheiro - Presidente
Profa. Dra.	Patrícia Brasil
Profa. Dra.	Ana Maria Bispo de Filippis
Profa. Dra.	Elba Regina Sampaio de Lemos
Prof. Dr.	Marcelo Alves Pinto

Rio de Janeiro, 26 de Março de 2012

Dedico este trabalho a meus queridos pais, Juana Mercedes e Manuel de Jesús, a Jacinta pelo estímulo e apoio constante e a minha bonita filha Ona.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa e bolsa de estudo para realização deste projeto.

Ao ex-coordenador da Pós-Graduação da Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz quando iniciei o Mestrado Acadêmico, Dr. Milton Ozório Moraes.

Às doutoras Rita Maria Ribeiro Nogueira e Luzia Maria de Oliveira Pinto, orientadoras deste projeto, pela ajuda, críticas e sugestões que contribuíram extremamente para a minha formação profissional.

Ao Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr pelo imenso apoio desde o início para fazer o Mestrado neste projeto e por ser fonte de inspiração do meu trabalho.

À Dra. Claire Kubelka pela confiança e orientação metodológica.

À Dra. Flávia Barreto dos Santos pelo tato, paciência, compreensão e pela amizade que se iniciou durante a realização deste trabalho.

À Dra. Ana Maria Bispo de Filippis pela atenção constante e pelas informações.

Por estarem sempre presente, com peculiar compreensão e colaboração, agradeço às amigas especiais da equipe do Laboratório de Flavivirus (LabFla) do Instituto Oswaldo Cruz.

A todos os prezados colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Imunologia Viral. Muito obrigado pelo apoio, carinho e amizade.

Aos funcionários do prédio Helio e Peggy Pereira do Instituto Oswaldo Cruz, pela colaboração.

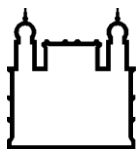
Ao Hospital Dia Professora Esterina Corsini, na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande (MS), e o Centro de Referência de Dengue (CRD) do Hospital dos Plantadores de Cana, Campos dos Goytacazes (RJ) por permitir a utilização dos dados, sem os quais este estudo não teria sido possível. Em especial aos doutores Rivaldo Venâncio da Cunha, Luiz José de Souza e Sônia Maris O Zagne.

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

Especialmente à minha mãe Dra. Juana Mercedes Velázquez Argota pelo amor incondicional e constante.

Ao meu pai, Dr. Manuel de Jesus Limonta Vidal, pelo excelente exemplo de incansável cientista pesquisador.

Meus sinceros agradecimentos aos meus amigos no bairro Olaria pelo apoio, carinho e amizade durante a minha permanência no Rio de Janeiro e todos os outros que contribuíram direta e indiretamente para que eu pudesse realizar este trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

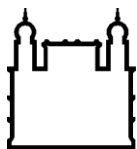
Marcadores circulantes de morte celular por apoptose em dengue

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniel de Jesús Limonta Velázquez

Dengue é a doença viral transmitida por mosquitos de maior importância mundial e é, causada por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus (DENV-1,-2,-3,-4). É uma virose frequente em áreas tropicais e subtropicais e atualmente o Brasil notifica um número crescente de casos. Durante mais de 30 anos a dengue foi classificada em febre da dengue e febre hemorrágica da dengue. Porém, a OMS no ano 2009 propôs uma nova classificação: dengue com e sem sinais de alarme (DSSA e DCSA) e dengue grave (DG) no intuito de facilitar tanto o diagnóstico como o manejo do tratamento. A patogenia da dengue é multifatorial na qual se aceitam contribuições de fatores virais e do hospedeiro. Estudos sobre mecanismos da imunopatologia da dengue descreveram associações entre fenômenos descritos como “tempestade” de citocinas, hiperativação de células imunes, anticorpos e células T de reação cruzada entre diferentes sorotipos virais. Além disso, estudos vêm demonstrando a contribuição da apoptose na imunopatologia da dengue. Neste contexto, o objetivo do trabalho da tese foi avaliar o envolvimento de proteínas circulantes relacionadas a apoptose na patogênese da infecção pelos DENV. Para isso, 106 amostras foram obtidas de pacientes com suspeita clínica de infecção por DENV durante a epidemia de 2010 nos estados brasileiros de Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro. Para confirmação dos casos, cinco diferentes técnicas foram utilizadas: ELISA de captura de IgM, IgG anti-dengue, detecção da proteína viral NS1, isolamento viral e RT-PCR. Nesta casuística, 72 casos de dengue foram confirmados. A detecção de IgM anti-dengue confirmou um maior número de casos suspeitos. Os sorotipos encontrados foram DENV-1 e DENV-2. Baseado na nova classificação da OMS, tivemos 35 indivíduos com DSSA, 17 pacientes com DCSA e 15 indivíduos com DG. Contudo, a classificação tradicional da dengue diagnosticou apenas 5 casos com febre hemorrágica da dengue. Nos 67 pacientes da dengue foram dosados níveis plasmáticos de moléculas pró-apoptóticas (TNF- α , TRAIL, FasL) e anti-apoptótica (Survivina). Níveis aumentados de TNF- α , FasL e TRAIL foram encontrados nos pacientes com a forma DSSA quando comparados aos controles e pacientes graves (DG). Nossos resultados não indicaram correlações importantes entre os níveis de TNF- α e parâmetros associados à gravidade, mas, observamos correlações diretas entre FasL ou TRAIL com plaquetas e TRAIL com hematócrito. Todavia, o único caso fatal apresentou o maior nível plasmático de FasL. De forma interessante, TRAIL se correlacionou inversamente com a contagem dos linfócitos. Em relação à Survivina, os resultados indicaram que o grupo DCSA apresentou níveis diminuídos em comparação aos controles e pacientes graves e de forma interessante, Survivina se correlacionou diretamente com a contagem de leucócitos. Assim, o TRAIL seria indicador de bom prognóstico da doença, e TRAIL poderia estar envolvido com a maior susceptibilidade dos linfócitos à morte. Por outro lado, Survivina poderia estar participando da proliferação e/ou migração dos leucócitos. Até o presente, este é o primeiro trabalho abordando mediadores circulantes de apoptose segundo a nova classificação clínica da dengue. Mais pesquisas precisam ser realizadas para discernir a complexa interação entre moléculas pró e anti-apoptóticas e suas implicações na gravidade da dengue.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Circulating mediators of cell death by apoptosis in dengue

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniel de Jesús Limonta Velázquez

Dengue is the most important viral disease transmitted by mosquitoes in the world, and is caused by any of the four dengue virus serotypes (DENV-1,-2,-3,-4). It is very common in the subtropical and tropical areas and currently Brazil is notifying an increasing number of cases. During more than thirty years dengue was classified in dengue fever and dengue hemorrhagic fever. However, in 2009 the WHO proposed a new dengue classification: dengue with and without warning signs and severe dengue to facilitate diagnosis and treatment management. The complex pathogenesis of dengue is multifactorial and it is accepted the contributions of viral and host factors. Studies on dengue immunopathogenesis have described associations of the phenomenon described as cytokines storm, immune cells hyperactivation and cross-reacting T cells and antibodies with different DENV serotypes. Besides, a number of studies have been demonstrating the contribution of apoptosis to dengue immunopathology. In this context, the objective of the thesis work was to assess the involvement of circulating proteins related to apoptosis with DENV infection pathogenesis. To achieve that, 106 samples from patients with clinical suspicion of DENV infection were obtained during the 2010 epidemic in the Brazilian states of Mato Grosso do Sul and Rio de Janeiro. In the confirmation of suspicious cases, five different techniques were used: anti-dengue IgM and IgG capture ELISA, detection of viral protein NS1, viral isolation and RT-PCR. In this group, we confirmed 72 cases of dengue. Anti-dengue IgM confirmed the largest number of suspected cases. DENV-1 and DENV-2 were found. Based on the new WHO classification, we had 35 individuals with dengue without warning signs, 17 patients with dengue with warning signs and 15 individuals with severe dengue. However, the traditional dengue classification only diagnosed 5 cases with dengue hemorrhagic fever. In 67 dengue patients the levels of two pro-apoptotic molecules (TRAIL, FasL) and an anti-apoptotic protein (Survivin) were determined. Elevated levels of TNF- α , FasL and TRAIL were found in patients with dengue without warning signs compared to controls and severe patients. Our results did not indicate important correlations between TNF- α and parameters associated to severity, but we observed positive correlations of FasL and TRAIL with platelets, and TRAIL with hematocrit. However, the only fatal case presented the highest plasmatic level of FasL. Interestingly, TRAIL was inversely correlated with lymphocytes counting. Regarding Survivin, the results indicated dengue with warning signs group showed diminished levels than controls and severe patients and it is interesting that Survivin was positively correlated with leukocytes counting. Thus, TRAIL would be a good prognosis indicator of the disease, and TRAIL could be involved with greater death susceptibility of lymphocytes. On the other hand, Survivin might be participating in the proliferation and/or migration of leukocytes. So far, this is the first work that study circulating mediators of apoptosis using the new clinical dengue classification. More research is needed to discern the complex interactions among pro and anti-apoptotic molecules and their implications in dengue severity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE - imunoamplificação dependente de anticorpos

ADN - ácido desoxirribonucléico

Ae. aegypti - *Aedes aegypti*

Ae. albopictus - *Aedes albopictus*

ALT - alanina aminotransferase

Apo2L – ligante 2 de apoptosis

ARN - ácido ribonucléico

ARNm - ARN mensageiro

AST - [aspartato](#) aminotransferase_

Bcl-2 – linfoma de células B 2

Caspases - proteases com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras [proteínas](#) depois de um resíduo de [ácido aspártico](#)

CD95L – ligante de CD95

CMSP - células mononucleares do sangue periférico

DC - dengue clássico

DCSA - dengue com sinais de alerta

DC-SIGN - ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de célula dendrítica

DD – domínios de morte

DENV – vírus dengue

DG - dengue grave

DR – receptores de morte

DSSA - dengue sem sinais de alerta

ELISA - ensaio de imunoenzimático

FasL - ligante de Fas

FHD - febre hemorrágica da dengue

HIV - vírus da imunodeficiência adquirida

HLA - antígenos leucocitários humanos

IAP - proteína inibidora da apoptose

IFN - interferon

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

LIV - Laboratório de Imunologia Viral

MIAF - fluido ascítico hiperimune de camundongo

NS - não estrutural

OMS - Organização Mundial de Saúde

RJ - Rio de Janeiro

RT-PCR - Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase

SC - sistema complemento

SCD - síndrome de choque da dengue

SFB - soro fetal bovino

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TDR – Programa Especial para Pesquisa e Treinamento de Doenças Tropicais

Th1 – do inglês “T helper 1”

TNFR – receptor do fator de necrose tumoral

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

TRAIL - ligante indutor da apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral

TUNEL – do inglês “Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick-end labeling”

SUMÁRIO

1. DENGUE	01
1.1. O vírus dengue.....	01
1.1.1. Classificação e estrutura.....	01
1.1.2. Replicação viral.....	02
1.2. Aspectos da infecção pelos vírus dengue.....	03
1.2.1. Breve histórico e epidemiologia da dengue.....	03
1.2.3. Epidemiologia dos vírus dengue.....	06
1.2.3.1. Dengue nas Américas.....	06
1.2.3.2. A dengue no Brasil.....	07
1.3. Manifestações clínicas.....	11
1.3.1.. Classificação clínica.....	13
1.2.4. Diagnóstico laboratorial	14
1.5. Tratamento.....	18
1.6. Controle e prevenção.....	19
1.7. Patogênese da dengue.....	20
1.7.1. Fatores Virais.....	20
1.7.2. Fatores do hospedeiro.....	21
1.7.3. Imunopatologia da infecção pelos vírus dengue.....	22
1.7.3.1. Envolvimento de Anticorpos.....	23

1.7.3.2. Hiperprodução de citocinas.....	24
1.7.3.3. Desregulação das células T.....	24
1.7.3.4. Pecado original antigênico na dengue.....	25
1.7.3.5. Ativação do sistema complemento	26
2. APOPTOSE.....	27
2.1. Histórico e definição.....	27
2.2. Mecanismos e controle da apoptose.....	28
2.3. Vias de ativação da apoptose.....	30
2.4. A apoptose na dengue.....	32
2.4.1. A apoptose na infecção <i>in vitro</i> pelos vírus dengue.....	33
2.4.2. A apoptose em modelos animais da dengue.....	35
2.4.3. A apoptose em pacientes infectados pelos vírus dengue.....	35
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1. Estudo populacional e amostras de sangue.....	39
4.2. Aprovação ética.....	39
4.3. Diagnóstico virológico dos vírus dengue.....	39
4.3.1. Isolamento viral.....	40
4.3.1.1. Detecção e identificação viral.....	40

4.3.2. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase.....	42
4.3.3. Detecção da proteína não estrutural NS1.....	42
4.3.4 Detecção de anticorpos da classe IgM anti-dengue.....	42
4.3.5 Classificação da resposta imune do tipo primária e secundária.....	42
4.4. Coleta dos dados clínicos.....	42
4.5. Classificação clínica da dengue segundo a OMS.....	43
4.6. Quantificação de moléculas circulantes envolvidas na apoptose pela técnica de ELISA.....	43
4.7. Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Métodos laboratoriais na confirmação dos casos suspeitos.....	46
5.2 Dados demográficos dos casos confirmados de infecção pelos vírus dengue.....	46
5.3. Classificação clínica dos pacientes nos quais foram dosadas as moléculas relacionadas a apoptose.....	46
5.4. Caracterização laboratorial dos pacientes nos quais foram dosadas as moléculas solúveis relacionadas a apoptose.....	47
5.5. Correlação entre parâmetros laboratoriais e patogênese da dengue.....	48

5.6. Dosagem de moléculas circulantes relacionadas ao processo de apoptose em amostras de pacientes nas fases aguda e convalescente.....	49
5.7. Correlações entre os níveis plasmáticos na fase aguda de moléculas envolvidas na apoptose com os parâmetros laboratoriais associados à patogênese.....	54
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	66
8. PERSPECTIVAS.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Informações sobre os kits e procedimentos dos ensaios de ELISA....	44
Tabela 5.1 Diagnóstico laboratorial dos DENV considerando diferentes metodologias.....	45
Tabela 5.2 Perfil demográfico dos pacientes infectados pelos DENV.....	48
Tabela 5.3 Correlações entre os dados laboratoriais dos pacientes infectados pelos DENV.....	49
Tabela 5.4 Correlações entre as dosagens de proteínas solúveis associadas à apoptose em pacientes infectados pelos DENV.....	52
Tabela 5.5 Correlações entre as dosagens de proteínas solúveis associadas a apoptose com os dados laboratoriais dos pacientes infectados pelos DENV na fase aguda.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Poliproteína viral dos DENV que é dividida em três proteínas estruturais (verde) e sete não estruturais (vermelho).....	3
Figura 1.2 Número anual médio de casos de febre da dengue e febre hemorrágica da dengue informado à Organização Mundial da Saúde e de países que informam dengue, 1955–2007.....	5
Figura 1.3 Número de casos de febre da dengue e febre hemorrágica da dengue, reportados à Organização Mundial da Saúde nas Américas, 1980-2007.....	7
Figura 1.4 Incidência de dengue de acordo com a região geográfica e ano de ocorrência, Brasil, 1986-2008.	9
Figura 1.5 Número de hospitalizações por FHD de acordo com o grupo de idade, 1998-2007.	10
Figura 1.6 Dias de doença, viremia, antígeno de NS1 e sorologia usada no diagnóstico da dengue.	14
Figura 2.1 Via extrínseca da apoptose.....	32
Figura 5.1 Dosagens de proteínas plasmáticas envolvidas na apoptose pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) em pacientes com dengue.....	51
Figura 5.2. Dosagens de proteínas plasmáticas envolvidas na apoptose em amostras pareadas da fase aguda e convalescente de pacientes com dengue. A concentração de FasL (A), TRAIL (B) e Survivina (C) são demonstrados.....	53

1. DENGUE

1.1. Os vírus dengue

Os flavivirus constituem um grupo de mais de 70 vírus e a maioria deles são arbovirus (do inglês “arthropode-borne viruses”) que são transmitidos aos vertebrados por mosquitos ou carrapatos. Os membros desta família possuem semelhanças em morfologia, organização do genoma e estratégia de replicação, mas causam uma variedade de doenças, incluindo febre, encefalite e febre hemorrágica (Lindebach, Thiel et al. 2006).

Os vírus dengue (DENV) pertencem à família Flaviviridae (do Latim “flavus” ou amarelo). Esta família consiste atualmente em três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. (Lindebach, Thiel et al. 2006). Além destes gêneros, três grupos de vírus, GBV-A, GBV-C e GBV-D ou vírus de hepatites G (do inglês “hepatitis G virus”) esperam classificação formal dentro da família como possivelmente um novo gênero chamado *Pegivirus* (Stapleton, Fong et al. 2011).

1.1.1. Classificação e estrutura

Os DENV são arbovirus do gênero *Flavivirus* que inclui quatro sorotipos DENV-1,-2, -3, -4. Estes vírus como todos os flavivirus, são esféricos, possuem envelope e medem entre 40-60 nm de diâmetro. O genoma é constituído por uma fita simples de ácido ribonucléico (ARN) de polaridade positiva de aproximadamente 11 000 nucleotídeos. A diferença do ARN mensageiro (ARNm) celular com o genoma dos flavivirus é a ausência de uma cauda de poliadenilato na posição 3’ (Lindebach, Thiel et al. 2006).

Estes vírus possuem três proteínas estruturais: a proteína C localizada no nucleocapsídeo, a proteína M que está associada com a membrana e, a proteína E do envelope, principal proteína estrutural, que está diretamente relacionada com a imunidade humoral. Além disso, os DENV têm sete proteínas não estruturais ou NS (do inglês “non structural”) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que estão relacionadas com a infecção viral (Paranjape and Harris 2010).

1.1.2. Replicação viral

Os DENV são introduzidos no hospedeiro pela picada de um mosquito infetado, *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) ou *Ae. albopictus*. O DENV entra nas células alvo através de endocitose mediada por diferentes receptores (ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de célula dendrítica ou DC-SIGN do inglês “Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin”, receptores Fc de imunoglobulinas, “heparan sulfato”, proteínas de choque térmico e o receptor de manosa) e trafega para os endosomas onde o ambiente ácido causa grandes mudanças na conformação da glicoproteína do envelope E. Tais mudanças induzem a fusão das membranas da célula hospedeira com os vírus. O ARN libertado codifica um precursor de uma poliproteína de aproximadamente 3 400 aminoácidos (**Figura 1.1**) (Smit, Moesker et al. 2011; Stiasny, Fritz et al. 2011). Esta poliproteína é co- e post-traduzida através de peptidases da célula hospedeira e pela protease NS2B/NS3 codificada pelo vírus para dar origem a três proteínas estruturais (C, prM e E), que são aproximadamente a quarta parte desta poliproteína e, sete proteínas NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5). As proteínas estruturais constituem a partícula viral enquanto as proteínas NS estão envolvidas na replicação do ARN viral, empacotamento do vírus, e modulação das respostas da célula hospedeira (Paranjape and Harris 2010).

Depois da tradução do genoma de ARN, a NS5 que é uma ARN polimerase ARN-dependente, copia uma fita negativa complementar do ARN do genoma viral que serve como modelo para a síntese de novas fitas positivas de ARN viral. Sucessivos processos de tradução produzem altos níveis de proteínas virais junto com ARN viral. A replicação viral precisa da união ARN-ARN dos extremos do genoma viral 5´ e 3´ para formar um ARN circular. Estudos recentes indicam a importância deste processo na regulação da replicação e tradução do genoma dos DENV (Lindebach, Thiel et al. 2006; Friebe, Pena et al. 2012).

A replicação dos DENV acontece em membranas induzidas pelo vírus na célula hospedeira. Tais estruturas podem ancorar os complexos de replicação viral que consistem em ARN viral, proteínas virais e possivelmente fatores diversos da célula hospedeira. Os vírus não maduros e não infecciosos empacotam-se dentro do retículo endoplasmático onde o ARN viral é unido com a proteína C e é empacotado em uma

bicamada de lipídio derivada do retículo endoplasmático que contém heterodímeros de prM e glicoproteína E. A proteína prM previne a fusão prematura dos vírus durante seu transporte fora da célula. Após o transporte pelo caminho secretório da célula hospedeira, a maturação do vírus acontece na rede trans-Golgi pela transformação de prM em M mediada pela enzima celular furina. As partículas infecciosas amadurecidas então são libertadas através de exocitose no meio extracelular (Lindebach, Thiel et al. 2006; Paranjape and Harris 2010).

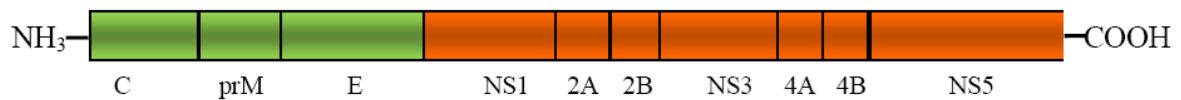


Figura 1.1 Poliproteína viral dos DENV que é dividida em três proteínas estruturais (verde) e sete não estruturais (vermelho).

1.2. Aspectos da infecção pelos vírus dengue

1.2.1. Breve histórico e epidemiologia dengue

As descrições clínicas de uma síndrome parecida à dengue foram registradas em 992 d.C. em uma enciclopédia médica chinesa (Nobuchi 1979). Outros possíveis surtos da dengue ocorreram em 1635 nas Índias Ocidentais e em 1699 no Panamá (McSherry 1982). As primeiras epidemias bem documentadas de casos da dengue aconteceram em 1779-1780 e foram relatadas em três continentes: Ásia, África e América do Norte (Gubler 1998). Com efeito, uma destas epidemias foi descrita na Filadélfia em 1780 (Carey 1971).

O termo dengue é um homônimo espanhol para uma frase da língua africana Swahili, "Ki denga Pepo", que significa pancada ou golpe causado por um espírito do mal que provoca um ataque doloroso semelhante à câimbra. Possivelmente, esse termo cruzou da África para o Caribe em 1827 e em Cuba esta frase foi identificada popularmente em espanhol com a palavra dengue. Além disso, existem documentos históricos espanhóis que indicam o uso de termo febre quebra ossos por um médico militar espanhol no Porto Rico para descrever uma doença febril em 1771 e o uso da

palavra dengue pela Rainha de Espanha em 1801 para descrever uma doença febril aguda com dores ósseas e articulares, hemorragia e icterícia. Estas descrições correspondem possivelmente à forma autolimitada e benigna da dengue conhecida durante muito tempo, há quase meio século, como dengue clássico (DC). (Rigau-Perez 1998).

O padrão da doença dengue de 1780 a 1940 foi caracterizado pelas relativamente infrequentes, mas comumente grandes epidemias. Porém, é provável que os DENV tenham ficado endêmicos em muitos centros urbanos tropicais durante este tempo (Gubler 1998).

Embora a etiologia da dengue fosse sugerida experimentalmente um século atrás, somente durante a Segunda Guerra Mundial foram observados avanços técnicos que permitiram a pesquisadores japoneses (Hotta 1952) e americanos (Sabin and Schelesinger 1945) isolarem os dois primeiros sorotipos dos DENV, DENV-1 e DENV-2, em 1944. Posteriormente o terceiro e quarto sorotipos, DENV-3 e DENV-4, foram identificados durante epidemias ocorridas nas Filipinas e Tailândia em 1954 (Hammon, Rudnick et al. 1960; Hammon and Sather 1964).

Acredita-se que o movimento de tropas durante a Segunda Guerra Mundial, junto com a destruição do ambiente e cidades, contribuiu na expansão dos vírus e também dos vetores ao longo do Sudeste da Ásia e o Pacífico Ocidental. Após a Guerra I ficou evidente a mudança no comportamento da doença porque a incidência de dengue aumentou acima de 30 vezes nos últimos 50 anos (Guzman, Halstead et al. 2010). O crescimento populacional, as migrações, a urbanização descontrolada, inadequada administração da água e resíduos sólidos, a falta de programas efetivos para o controle do vetor e o aumento da rapidez das viagens comerciais mundiais contribuíram para a expansão geográfica do mosquito transmissor e do vírus, permitindo o estabelecimento de uma pandemia que persiste até hoje (Gubler 1998; Kyle and Harris 2008).

Nas décadas de 50 e 70, apesar da elevada transmissão epidêmica e da hiperendemicidade, a epidemia de dengue manteve-se localizada no Sudeste Asiático devido principalmente ao programa de erradicação do *Ae. aegypti* nas Américas, visando o controle da febre amarela urbana (Halstead 2006). Durante os anos 80, verificou-se a expansão geográfica das epidemias de dengue envolvendo a região das Américas, África, China e a Austrália, tendo como distribuição mundial, as mudanças ecológicas e o comportamento da população humana (Gubler 1998).

Atualmente, a dengue está distribuída em mais de 100 países da área tropical e subtropical do mundo e é a arbovirose que causa mais doença e morte nos humanos. Mais de 2.5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção pelos DENV. Estima-se que ocorram anualmente de 50 a 100 milhões de infecções pelos DENV, 500 000 casos das formas graves de dengue (febre hemorrágica da dengue e síndrome de choque da dengue, FHD/SCD) e aproximadamente 20 000 óbitos, principalmente em crianças (**Figura 1.2**) (World Health Organization 2009).

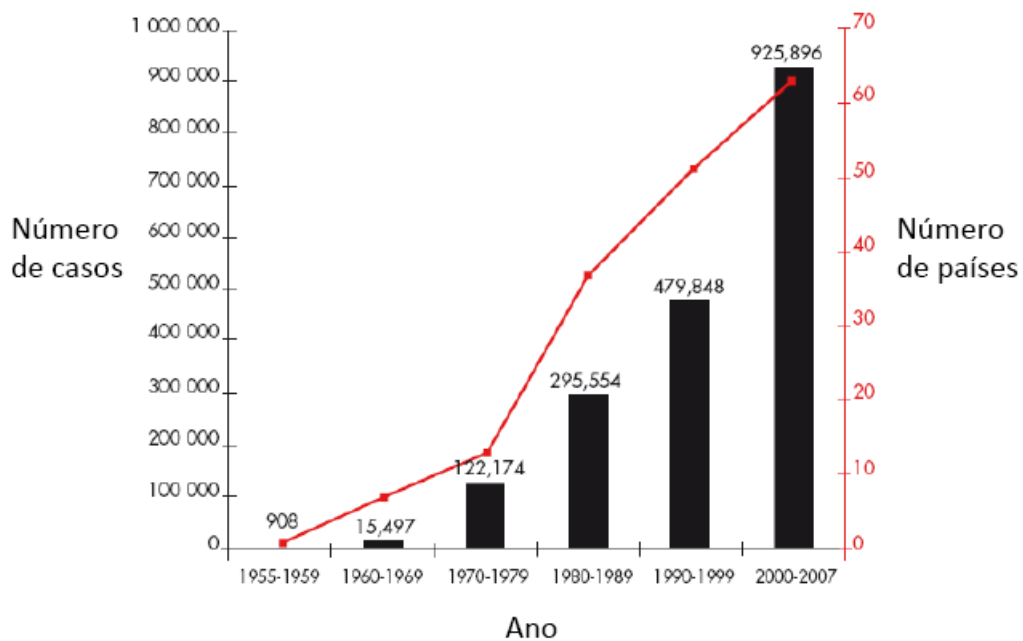


Figura 1.2 Número anual médio de casos de febre da dengue e febre hemorrágica da dengue informado à Organização Mundial da Saúde e de países que informam dengue, 1955–2007. Adaptado da Organização Mundial da Saúde, 2009 (World Health Organization 2009).

1.2.3. Epidemiologia dos vírus dengue

1.2.3.1. Dengue nas Américas

A interrupção da transmissão da dengue na região das Américas resultou da campanha de erradicação de *Ae. aegypti* nas Américas, principalmente durante os anos sessenta e início dos anos setenta. No entanto, a vigilância do vetor e as medidas de controle não foram contínuas e ocorreu a reinfestação pelo mosquito, com a consequência de surtos no Caribe, América Central e América do Sul (Halstead 2006). Em consequência, no ano de 1981, ocorreu em Cuba a primeira epidemia de FHD/SCD das Américas. Nesta epidemia, causada pelo DENV-2, foram notificados cerca de 344 000 casos com aproximadamente 116 000 internações e 158 óbitos (Kouri, Mas et al. 1983; Guzman, Kouri et al. 1990).

Atualmente, os quatro sorotipos dos DENV circulam na região e uma aumentada mortalidade/morbilidade tem sido observada nas décadas recentes. Os casos da dengue aumentaram nas últimas três décadas: 1 033 417 (anos oitenta), 2 725 405 (anos noventa), 4 759 007 (2000-2007). O número maior de casos foi informado à Organização Mundial da Saúde (OMS) no Caribe hispânico (39.1%) nos anos oitenta passando para o Cone Sul nos anos noventa (55%) e 2000-7 (62.9%). Além disso, de 1980 a 1987 foram informadas 242 mortes por dengue, um número bem menor quando comparadas às 1 391 mortes durante 2000-2007. Em consequência, todos os sorotipos virais foram identificados simultaneamente no período 2000-2007 em Barbados, Colômbia, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Guiana francesa, México, Peru, Porto Rico e Venezuela (World Health Organization 2009; San Martin, Brathwaite et al. 2010).

Os países de Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) no período de 2001 a 2007 notificaram 64.6% (2 798 601) de todos os casos de dengue nas Américas. Neste sentido, 6733 casos eram de FHD com um total de 500 mortes. Outro fato interessante foi que 98.5% dos casos de dengue foram notificados pelo Brasil, que também informou o maior número de óbitos. Com efeito, o Brasil é o país que mais reporta dengue do mundo (Teixeira, Costa Mda et al. 2009). Os países andinos (Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) contribuíram com 19% (819 466), México e outros países de América Central com 12.5% (545 049) e os países caribenhos com 3.9% (168 819) dos casos de dengue nas Américas de 2001 a 2007 (World Health Organization 2009).

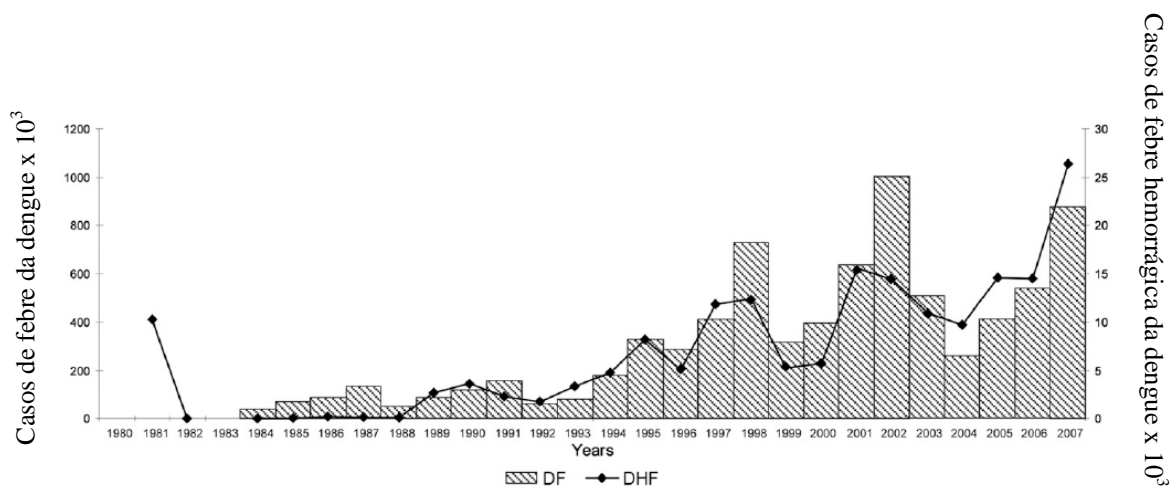


Figura 1.3 Número de casos de febre da dengue e febre hemorrágica da dengue, reportados à Organização Mundial da Saúde nas Américas, 1980-2007. Adaptado de San Martín *et al.*, 2010 (San Martín, Brathwaite et al. 2010).

A maioria dos casos notificados da dengue no Canadá e nos Estados Unidos refere-se a viajantes que visitaram áreas endêmicas na Ásia, Caribe, América Central ou América do Sul (2010). No entanto, surtos de dengue também foram notificados no Havaí nos anos 2001 e 2002 (Efler 2005; Smith 2005), transmissão local no Texas depois dos anos oitenta devido a seu limite com o México (Brunkard, Robles Lopez et al. 2007) e mais recentemente, nos anos 2009 e 2010, na Flórida (2010).

1.2.3.2. A dengue no Brasil

Epidemias da dengue foram descritas em 1846, 1847 e 1848 no Rio de Janeiro (RJ). Em 1886 ocorreu outra epidemia no município de Valença (RJ) quando a doença recebeu vários nomes populares como febre Valenciana e polka, esta última relacionada com as dores articulares muito intensas e ainda a epidemia de 1922-1923 em Niterói (RJ) (Schatzmayr and Curie Cabral 2009).

Houve a confirmação da erradicação no mosquito *Ae. aegypti* no Brasil em 1955 graças a uma campanha iniciada em 1904 por Oswaldo Cruz. Esta possivelmente foi a razão para a ausência de surtos de dengue entre 1923 a 1981. Porém, a reintrodução do *Ae. aegypti* no país na década de 70 foi inevitável em função da descontinuação da campanha de erradicação do mosquito e outros fatores (Schatzmayr 2000).

A primeira epidemia com confirmação laboratorial ocorreu em 1981 na região Amazônica, Em Boa Vista, onde cerca de 11 000 pessoas foram infectadas, sendo identificados DENV-1 e 4 (Osanai, Travassos da Rosa et al. 1983); porém, não houve dispersão para o resto do país, que ficou quatro anos sem notificação da dengue. Foi a partir de 1986 que a dengue tornou-se um problema de saúde pública no Brasil, com a introdução do DENV-1 no estado do RJ e sua disseminação para as regiões nordeste e centro-oeste (Nogueira, de Araujo et al. 2007).

No ano seguinte, alguns estados do nordeste foram afetados e a incidência da dengue alcançou 64.6 por 100 000 habitantes (**Figura 1.4**). A transmissão do DENV foi tão intensa que de acordo com as estimativas baseadas nos exames sorológicos de 1986 e 1987 no RJ, estimou-se que mais de um milhão de pessoas foram infectadas pelo DENV-1 (Schatzmayr, Nogueira et al. 1986; Nogueira, Schatzmayr et al. 1988). As circunstâncias ambientais permaneceram receptivas à circulação do DENV e alguns anos depois a situação foi agravada pela introdução do DENV-2 em 1990, também no estado do RJ, com a ocorrência de casos de DC e os primeiros casos de FHD (Nogueira, Miagostovich et al. 1993).

No início de 1994, o aumento progressivo na incidência da doença no país foi devido à circulação do vírus em mais de 600 municípios distribuídos em 18 estados brasileiros (Nogueira, Miagostovich et al. 1995). Em 1998, o Brasil foi responsável por 85% do número de casos de dengue notificados nas Américas e a incidência alcançou 345.7 casos por 100 mil habitantes. Em 1999, 50% dos 5.507 municípios brasileiros já tinham relatado casos de DC e o *Ae. aegypti* já tinha sido detectado em 64% deles. A ocorrência de casos de FHD nos anos 90 foi relativamente baixa (0.06%), considerando a intensa circulação simultânea dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (Teixeira, Costa Mda et al. 2009).

A incidência da dengue nos primeiros dois anos do presente século no Brasil permaneceu elevada, com 141.0 e 239.4 casos por 100 000 habitantes em 2000 e em 2001, respectivamente (Teixeira, Costa Mda et al. 2009). Com a introdução de DENV-3 em 2002, também no RJ, houve um aumento acentuado dos casos de DC (446.2 casos por 100 000 habitantes) e de FHD (Nogueira 2005). O sorotipo DENV-3 se dispersou rapidamente pelo território brasileiro, praticamente substituindo os sorotipos DENV-1 e DENV-2 em várias cidades nos anos subsequentes (Teixeira, Costa et al. 2005) e modificou a epidemiologia do dengue no Brasil, com características de hiperendemicidade (Nogueira 2005; de Araujo, Bello et al. 2009).

Entre os anos de 2003 a 2005, houve um decréscimo no número de casos notificados da dengue, no estado do RJ (9 242, 2 694 e 2 580, respectivamente), sendo considerados como interepidêmicos. Porém, a partir do ano de 2006, o número de casos da dengue aumentou, sendo notificados 31.054 casos. Desde 2003 até o mês de maio de 2007, o DENV-3 foi o único sorotipo isolado. Contudo, a partir do mês abril de 2007, observou-se a re-emergência do DENV-2. Este sorotipo causou uma grave epidemia no ano de 2008 com um total de 259 392 casos dos 734 384 casos notificados no Brasil (Teixeira, Costa Mda et al. 2009).

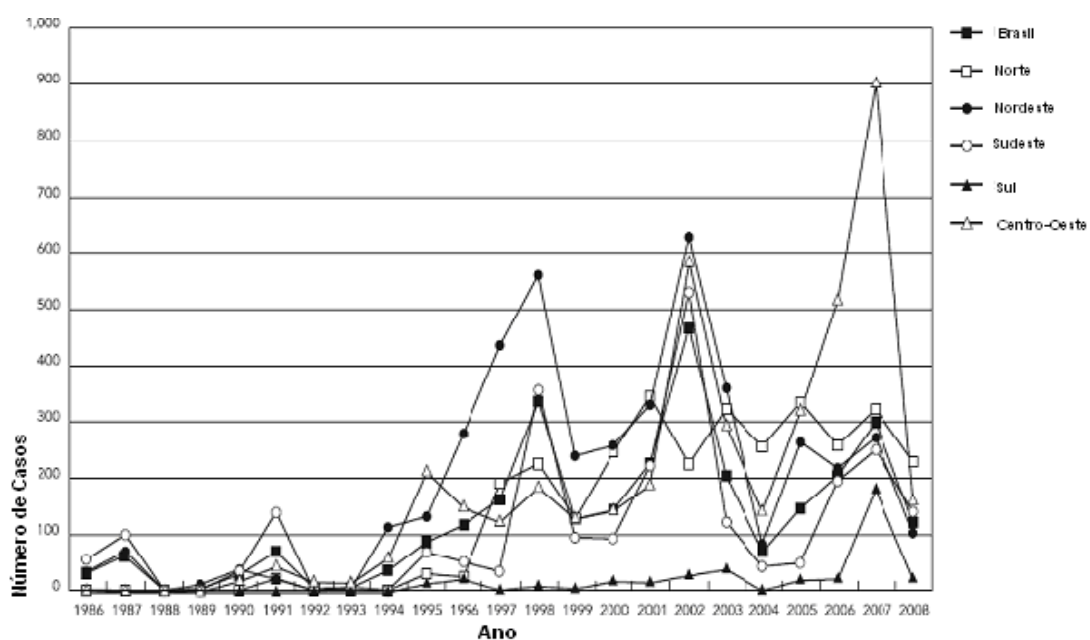


Figura 1.4 Incidência da dengue de acordo com a região geográfica e ano de ocorrência, Brasil, 1986-2008. Adaptado de Teixeira *et al.*, 2009 (Teixeira, Costa Mda et al. 2009).

Taxas de mortalidade abaixo de 1% por FHD são consideradas aceitáveis, mas no Brasil estas taxas são ainda elevadas, variando de 1.45% em 1995 a 11.25% em 2007. As epidemias de DC e FHD no Brasil tinham sido caracterizadas por maior incidência na população adulta, um padrão diferente do observado na maioria do Sudeste Asiático, onde ambas as manifestações da doença são mais frequentes em crianças (Halstead 2006). Entretanto, no primeiro semestre de 2007 houve uma mudança repentina no padrão observado no Brasil, com um aumento significativo na proporção de casos de FHD em menores de 15 anos, 53% dos casos, observado inicialmente no nordeste (**Figura 1.5**) (Teixeira, Costa et al. 2008). Um recente trabalho em Recife propôs que esta mudança está relacionada a uma transição de reemergência a hiperendemicidade em uma população que tem acumulado muitos jovens susceptíveis (Rodriguez-Barrquer, Cordeiro et al. 2011).

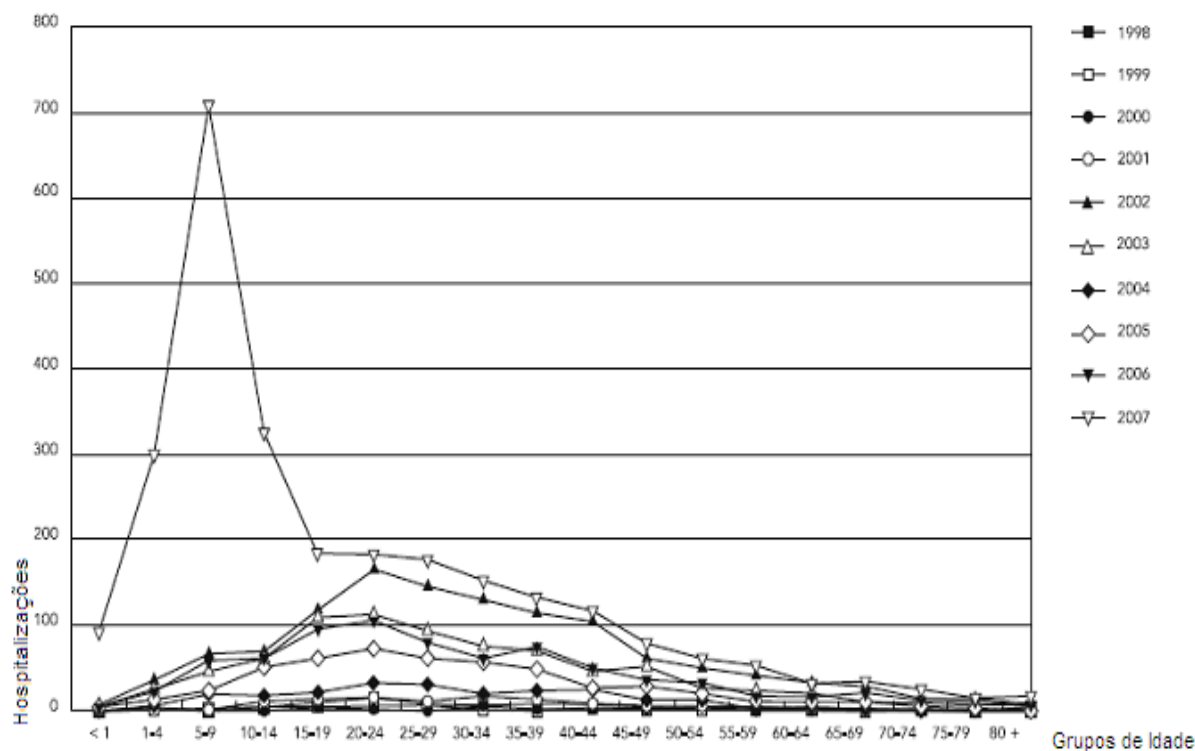


Figura 1.5 Número de hospitalizações por FHD de acordo com o grupo de idade, 1998-2007.

Adaptado de Teixeira *et al.*, 2009 (Teixeira, Costa Mda et al. 2009).

Até a semana 39 (25/09 a 01/10/11) de 2011 registraram-se 721 546 casos de dengue na Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde do Brasil. A comparação das notificações de casos suspeitos da dengue nas primeiras 39 semanas entre 2010 e 2011 apresentou uma redução de 24% neste ano no total de casos notificados. Em consequência, observou-se redução de casos nas regiões sudeste, centro oeste e sul e aumento nas regiões norte e nordeste. Neste sentido, 54,4% (392 696) dos casos da dengue do Brasil concentram-se em quatro estados: o estado de RJ com o maior número de casos (155 771; 21,6%), São Paulo (113 204; 15,7%), Amazonas (61 224; 8,7%) e Ceará (62 497; 8,5%) (Secretaria de Vigilância em Saúde 2011).

Até a semana 39 em 2011, foram registrados 10 620 casos graves da dengue ao SVS. Destes casos, 10 069 (94,8%) foram confirmados. No mesmo período em 2010 foi confirmado um número maior de casos graves (16 590). As regiões sudeste e nordeste concentram 86,2% dos casos graves confirmados em 2011 e com maior proeminência encontra-se o estado do RJ (4 165). Em relação aos óbitos foram confirmados 468, o que representa uma redução de 25,6% quando comparados aos óbitos no mesmo período em 2010 (629). As regiões sudeste e nordeste concentram o maior número de óbitos confirmados. Apesar da alta incidência registrada por dengue no

estado de Mato Grosso do Sul foi observado um número reduzido de óbitos (Secretaria de Vigilância em Saúde 2011).

Em 2011, no Brasil o monitoramento da circulação dos DENV demonstrou o isolamento dos quatro sorotipos virais, com o predomínio para o sorotipo DENV-1 (86,1% das amostras inoculadas positivas). Esta tendência ressalta o segundo ano de recirculação deste sorotipo (Secretaria de Vigilância em Saúde 2011). Em um estudo filogenético muito recente, demonstrou-se que o DENV-1 que circulou no período 2009-2011 apresenta diferentes linhagens dentro do genótipo V (Américas/África) (dos Santos, Nogueira et al. 2011).

No ano 2010 o DENV-4 reemergiu e foi confirmado no estado de Roraima, na Região Norte do Brasil (Temporao, Penna et al. 2011) e mais recentemente no RJ (Nogueira and Eppinghaus 2011). Em 2011, este sorotipo também foi registrado nas regiões nordeste e sul (Secretaria de Vigilância em Saúde 2011). Um trabalho filogenético recente indicou que este DENV-4 estava no Brasil antes de 2010 e que está muito relacionado a cepas que circulam na América do Sul há vários anos (de Souza, Rocco et al. 2011).

No ano 2011 na região centro-oeste, no Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, foram isolados somente os sorotipos DENV-1 e DENV-2, enquanto no RJ têm sido isolados os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (Secretaria de Vigilância em Saúde 2011).

1.3. Manifestações clínicas

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos dos DENV pode causar desde uma infecção assintomática, uma doença febril e autolimitada, até formas clínicas graves e potencialmente fatais caracterizadas por hemorragia, hemoconcentração, comprometimento de vários órgãos e choque (Guzman, Halstead et al. 2010).

O curso clínico desta doença viral inclui três fases: fase febril, crítica e de recuperação. A fase febril se caracteriza por febre com duração de dois a sete dias, associada a eritema facial, dor no corpo, cefaléia, prostração e anorexia. Não é possível prever a evolução e também não é fácil diferenciar entre o dengue e outras doenças febris nesta fase. Devido a isso é muito importante observar os sinais de alerta que poderão indicar a progressão para a fase crítica. Podem ser vistos manifestações

hemorrágicas como petéquias, epistaxes, gengivorragias e menos frequentemente sangramento do trato gastrointestinal e metrorragia importante. O fígado é aumentado e a contagem de leucócitos está diminuída comumente (Kalayanarooj, Vaughn et al. 1997; World Health Organization 2009).

A fase crítica não ocorre em todos os pacientes, dura de 24 a 48 horas e geralmente ocorre entre o terceiro e o sétimo dia da defervescência. Este período é caracterizado pela normalização da temperatura e aumento da permeabilidade capilar acompanhado de aumento do hematócrito. Uma leucopenia progressiva seguida por uma diminuição rápida da contagem das plaquetas precede usualmente o aumento da permeabilidade capilar (ascite, derrame pleural e pericárdico). O choque acontece quando um volume crítico de plasma é extravasado e frequentemente este estado é precedido por sinais de alerta. A prolongação do choque causa dano aos órgãos, acidose metabólica, coagulação intravascular disseminada e hemorragia grave. No entanto, a hemorragia grave e dano grave aos órgãos podem acontecer sem extravasamento plasmático evidente. Os pacientes com dengue não grave melhoram após a defervescência (Wichmann, Hongsiriwon et al. 2004; Srikiatkachorn, Krautrachue et al. 2007; Binh, Matheus et al. 2009; World Health Organization 2009).

Na última fase, fase de recuperação, há melhora do estado geral. Pode aparecer exantema, prurido e bradicardia. O hematócrito se estabiliza ou diminui. A elevação dos leucócitos tipicamente precede à normalização do número de plaquetas e da reabsorção do líquido plasmático extravasado (Lateef, Fisher et al. 2007; World Health Organization 2009).

1.3.1. Classificação clínica

A classificação de dengue pela OMS foi revista recentemente no ano de 2009 (World Health Organization 2009), depois de mais de 40 anos e inúmeros debates (PAHO 1994; Phuong, Nhan et al. 2004; Balmaseda, Hammond et al. 2005; Bandyopadhyay, Lum et al. 2006; Deen, Harris et al. 2006; Setiati, Mairuhu et al. 2007). Na atualidade é aceito que a nova classificação será melhor para a avaliação clínica, gerenciamento dos grupos de risco, tratamento dos pacientes, pesquisa da patogenia da dengue e estudos da eficácia dos candidatos vacinais da dengue (Barniol, Gaczkowski et al. 2011; Srikiatkachorn, Rothman et al. 2011).

Segundo a primeira classificação da dengue da OMS (PAHO 1994), o dengue pode apresentar duas formas clínicas principais: o DC também chamado febre da dengue e a FHD, às vezes com SCD. O DC é caracterizado por febre alta de início súbito, cefaléia, mialgias, astenia, prostração, dor retroorbitária, artralgia e exantema, além de manifestações gastrointestinais e linfadenopatias. Os casos de FHD são caracterizados por quatro manifestações principais: 1) febre, 2) fenômenos hemorrágicos (prova do laço positiva, contusões espontâneas, sangramentos da mucosa, hematemesa e/ou melena, 3) trombocitopenia (<100.000 plaquetas por mm^3) e 4) extravasamento de plasma (hematócrito 20% mais elevado ou queda no hematócrito em 20% ou mais da linha de base após hidratação endovenosa, derrame pleural, ascite, hipoproteinemia) (PAHO 1994).

A classificação da dengue pelo Programa Especial para Pesquisa e Treinamento de Doenças Tropicais ou TDR (do inglês “Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases”) da OMS ano 2009 (TDR/OMS) divide a doença da dengue em dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG). Os sinais de alerta são dor abdominal, vômito persistente, sinal clínico de acúmulo de líquido, sangramento de mucosas, letargia/irritabilidade, aumento de fígado > 2 cm, aumento de hematócrito com queda rápida da contagem das plaquetas. O DG apresenta extravasamento plasmático grave (levando ao choque ou acúmulo de líquido e com desconforto respiratório), hemorragia grave (avaliado pelo médico) e comprometimento de órgãos (fígado com enzimas hepáticas ALT ou AST > 1000 , sistema nervoso central com alteração da consciência, coração e outros órgãos). O

dano nos órgãos inclui encefalite/encefalopatia, dano renal agudo, hepático agudo e cardiomiopatia (World Health Organization 2009; Alexander, Balmaseda et al. 2011) O paciente apresenta choque se a pressão de pulso (diferença entre a pressão sistólica e diastólica) é ≤ 20 mm Hg em crianças ou se tem sinais de perfusão capilar pobre (extremidades frias, enchimento capilar atrasado, ou pulso rápido). Em adultos, a pressão de pulso ≤ 20 mmHg pode indicar um choque mais grave (World Health Organization 2009).

1.2.4. Diagnóstico laboratorial

A confirmação laboratorial é muito importante porque a dengue tem diferentes apresentações clínicas que tornam difícil o diagnóstico apenas em bases clínicas (**Figura 1.6**). O teste mais específico para confirmar a infecção pelos DENV é o isolamento viral, mas é complexo, caro, dura de 1-2 semanas e precisa de pessoal especialmente treinado. Também a detecção do genoma e antígeno viral NS1 são métodos confirmatórios. A soroconversão de IgM e IgG anti-DENV e o aumento de quatro vezes ou mais desta IgG são testes sorológicos “standard” para confirmar a infecção viral. No entanto, altos níveis de IgM e IgG anti-DENV em uma amostra aguda sugere a infecção por DENV (World Health Organization 2009; Guzman, Halstead et al. 2010).

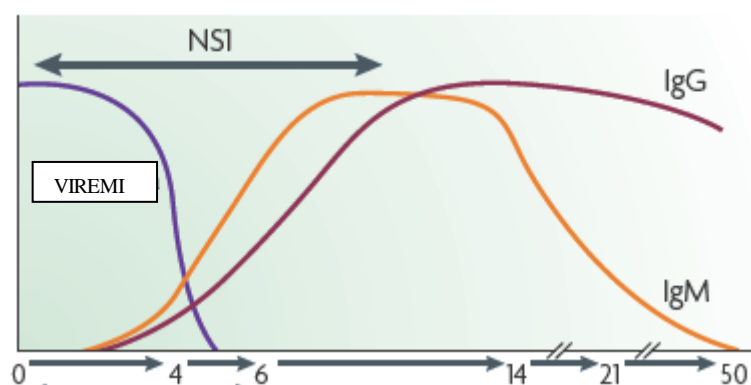


Figura 1.6 Dias de doença, viremia, antígeno de NS1 e sorologia usada no diagnóstico da dengue. Adaptado de Guzmán *et al.*, 2010 (Guzman, Halstead et al. 2010).

Durante a fase aguda ou fase de viremia (até 4-5 dias) da doença podem ser usados o isolamento viral, detecção de ácido nucléico do vírus ou de antígeno NS1 para diagnosticar a infecção. Ao final da fase aguda da infecção, a sorologia é o método de escolha (Guzman, Halstead et al. 2010).

A linhagem de células de mosquitos *Ae. albopictus* C6/36 é o método de escolha para isolar os DENV, não obstante, outras linhagens de células de mosquito e mamíferos possam ser usadas. A amostra deve coletar-se nos primeiros 3–5 dias de febre (**Figura 1.6**). Se o DENV não causar efeito citopático nas células da cultura, o vírus poderá ser identificado usando anticorpos monoclonais anti-DENV específicos em um teste de imunofluorescência ou por detecção de ácidos nucléicos virais (World Health Organization 2009). O soro é a amostra mais usada, mas o plasma, leucócitos, sangue e tecidos de autópsia podem ser utilizados (Guzman, Alvarez et al. 1999; Wang, Lin et al. 2000; Limonta, Gonzalez et al. 2009). Estas amostras devem ser conservadas à temperatura adequada (-70 °C ou em nitrogênio líquido) para manter a viabilidade do vírus (World Health Organization 2009).

Os testes de amplificação do genoma viral precisam de pessoal experiente e um laboratório equipado, mas são os mais sensíveis. Existem muitos protocolos de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR do inglês “reverse transcription polymerase chain reaction”) para amplificar uma região específica do DENV (Lanciotti, Calisher et al. 1992; Morita, Maemoto et al. 1994; Harris, Roberts et al. 1998), contudo, o mais usado é um “nested” RT-PCR para detectar os quatro sorotipos (Lanciotti, Calisher et al. 1992). Diferentes pesquisadores do Brasil (Dos Santos, Poloni et al. 2008; Conceicao, Da Poian et al. 2010) e do mundo (Wang, Sung et al. 2002; Shu, Chang et al. 2003; Chien, Liao et al. 2006) desenvolveram protocolos de RT-PCR em tempo real que permitem quantificar o genoma viral em 1-2 horas em amostras de soro ou plasma. Do mesmo modo, os tecidos podem ser usados para a detecção molecular do genoma de DENV (Guzman, Alvarez et al. 1999; Limonta, Gonzalez et al. 2009). Recentemente, um trabalho brasileiro mostrou pela primeira vez a detecção do genoma de DENV (DENV-3) por RT-PCR em tempo real em tecidos de casos fatais por dengue (de Araujo, Schatzmayr et al. 2009). Também a urina e saliva podem ser utilizadas para amplificar o ARN viral por RT-PCR em tempo real (Poloni, Oliveira et al. 2010).

O antígeno NS1 dos DENV pode ser detectado nos tecidos de óbitos e também na circulação, até nove dias após o início da doença (World Health Organization 2009). Os antígenos virais em tecidos humanos têm sido detectados por imunohistoquímica em estudos no Brasil (Miagostovich, Ramos et al. 1997; Nogueira, Filippis et al. 2002; Carvalho de Macedo, Nicol et al. 2006; de Araujo, Schatzmayr et al. 2009), Cuba

(Limonta, Capo et al. 2007) e outros países (Hall, Crowell et al. 1991; Huerre, Lan et al. 2001; Jessie, Fong et al. 2004). Muitos testes comerciais, ELISA (do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”) ou ensaio de imunoadsorção ligado á enzima e testes rápidos, têm sido desenvolvidos para detectar NS1. Este testes ainda estão em avaliação em diferentes países (Alcon, Talarmin et al. 2002; Xu, Di et al. 2006; Hang, Nguyet et al. 2009) incluindo Brasil (Castro-Jorge, Machado et al. 2010; Lima Mda, Nogueira et al. 2010). Neste contexto, um trabalho muito recente do Brasil demonstrou pela primeira vez no mundo a presença de NS1 em diferentes tecidos de casos fatais usando três testes de captura de NS1 (Lima Mda, Nogueira et al. 2011). Outro estudo brasileiro mais recente demonstrou a detecção de NS1 em líquido cefalorraquidiano de casos fatais de dengue (Araujo, Brilhante et al. 2011).

Os testes que geralmente são usados para o diagnóstico da infecção por DENV são os sorológicos porque são relativamente baratos e fáceis quando comparados com a cultura de células e métodos moleculares. A resposta de anticorpos contra o DENV difere de acordo com o estado imune do hospedeiro. Quando a infecção ocorre em pessoas não infetadas previamente por um flavivirus ou não imunizadas com uma vacina anti-flavivirus (vacina da febre amarela, encefalites japonesa ou encefalites transmitidas por carrapatos), os pacientes desenvolvem uma resposta primária de anticorpos caracterizada por um aumento de anticorpos específicos. Os primeiros anticorpos que aparecem são da classe IgM (Innis, Nisalak et al. 1989; Nogueira, Miagostovich et al. 1992). Estes anticorpos são detectáveis em 50% dos pacientes antes dos dias 3-5 de início da doença, aumentando até 80% no dia 5, até 99% no dia 10 e desaparecem após 2-3 meses (**Figura 1.6**). Na fase convalescente os níveis de IgM são significativamente baixos nas infecções secundárias e podem não ser detectáveis em alguns casos. Este fato diminui a eficiência da detecção de IgM nos casos secundários da dengue (World Health Organization 2009; Guzman, Halstead et al. 2010). A IgG anti-dengue é geralmente detectável com baixos títulos ao término da primeira semana da doença, aumentando lentamente para ser detectável depois de vários meses e provavelmente a vida toda. Entretanto, em respostas secundárias os anticorpos IgG aumentam rapidamente na fase aguda (World Health Organization 2009).

O MAC-ELISA (do inglês “IgM antibody capture ELISA”)utiliza-se geralmente para a detecção de IgM em soro, plasma e sangue conservado em papel de filtro

coletados cinco dias após o início da febre (Innis, Nisalak et al. 1989; World Health Organization 2009). No entanto, existem outros testes diagnósticos rápidos para detectar a IgM. Um trabalho multicêntrico internacional recente avaliou a sensibilidade e especificidade de diferentes kits comerciais de ELISA e testes rápidos para detectar a IgM em soro e concluiu que o ELISA é geralmente melhor do que os testes rápidos. Além disso, este trabalho avaliou que a reatividade cruzada com outros flavivirus como febre amarela, encefalites japonesas e encefalites de Saint Louis não é possivelmente um problema, porém alguns resultados falsos positivos foram obtidos em soros de pacientes com malária e leptospirose (Hunsperger, Yoksan et al. 2009).

O ELISA de IgG e o método de inibição de ELISA são testes usados para diagnosticar uma infecção recente ou antiga pelos DENV. A infecção recente é documentada detectando soroconversão ou aumento de quatro vezes ou mais da IgG entre o soro agudo e convalescente. Estes testes se correlacionam com os resultados obtidos com a inibição da hemaglutinação (Fernandez and Vazquez 1990; Kuno, Gomez et al. 1991; Miagostovich, Nogueira et al. 1999; Vazquez, Acosta et al. 2009). Também estes testes permitem identificar uma infecção primária ou secundária da dengue em amostras de soro, plasma e sangue (World Health Organization 2009).

Para diferenciar as infecções primárias e secundárias por DENV podem ser usadas as relações de densidade óptica IgM/IgG (Kuno, Gomez et al. 1991; Shu, Chen et al. 2003). No entanto, este procedimento ainda deve ser padronizado (World Health Organization 2009; Guzman, Halstead et al. 2010). Outros métodos sorológicos usados consistem na técnica de neutralização por redução de placas que permite a identificação do sorotipo viral infectante em infecções primárias e, anticorpos neutralizantes anti-DENV, que são importantes fundamentalmente em estudos de pesquisa com vacinas. (Roehrig, Hombach et al. 2008).

Os testes hematológicos como a contagem de plaquetas e leucócitos, do mesmo modo o hematócrito são usualmente usados na fase aguda da dengue. A trombocitopenia ($<100\ 000$ plaquetas por mm^3) e a leucopenia ($5\ 000$ leucócitos por mm^3) são observadas frequentemente nos casos de dengue (Kalayanarooj, Vaughn et al. 1997; Srikiatkachorn and Green 2010). De fato a plaquetopenia tem sido usada como marcador de gravidade de dengue (Wichmann, Gascon et al. 2007; Ramos, Arguello et al. 2008; Srikiatkachorn and Green 2010). Por outro lado, a leucocitoses

tem sido demonstrada em trabalhos prévios (Lee, Liu et al. 2005; Huhtamo, Vuorinen et al. 2006; Lee, Liu et al. 2008). A hemoconcentração (hematócrito 20% maior do que o esperado), devido a extravasamento de plasma por hiperpermeabilidade vascular, unido à queda abrupta das plaquetas é um dos sinais de alerta. (World Health Organization 2009).

1.5. Tratamento

A anamnese, exame físico e os testes laboratoriais definem que fase da dengue (febril, crítica, recuperação) e classificação clínica (DSSA, DCSA, DG) o paciente apresenta. Segundo as normas recentes da OMS no ano 2009 os grupos de tratamento se dividem em três: grupo A, B e C. O grupo A (DSSA sem doenças associadas) é tratado no domicílio com avaliação diária do médico, hemograma a cada 48 horas e adequada ingestão de líquidos. Os pacientes do grupo B (DCSA ou DSSA com doenças associadas) são hospitalizados e tratados imediatamente com soluções endovenosas de cristalóides, precisam de avaliação médica constante e seguimento por hemograma. O grupo C é o grupo mais grave e os pacientes podem apresentar choque. Este grupo C precisa de rehidratação urgente por etapas definidas de soluções cristalóides e inclusive de soluções colóides. Existem também protocolos para os sangramentos, transtornos da coagulação e administração excessiva de soluções endovenosas (World Health Organization 2009).

Desaconselha-se usar remédios à base de ácido acetilsalicílico ou outros anti-inflamatórios não-esteróides normalmente usados para febre, porque eles facilitam a hemorragia. Um medicamento usado na dengue é o paracetamol por suas propriedades analgésicas e antitérmicas (World Health Organization 2009).

Apesar de ter sido demonstrado a atividade de diferentes moléculas *in vitro* contra a DENV e em animais de laboratório, na atualidade não existe um fármaco específico para os DENV (Wilder-Smith, Ooi et al. 2010). No entanto, pesquisadores de diferentes institutos e empresas farmacêuticas internacionais têm demonstrado uma ação contra os DENV de drogas antivirais (Takhampunya, Ubol et al. 2006; Schul, Liu et al. 2007), peptídeos inibitórios (Hrobowski, Garry et al. 2005; Schmidt, Yang et al. 2010), ARN de interferência (Zhang, Singam et al. 2004; Subramanya, Kim et al. 2010; Stein, Perry et al. 2011), análogos de adenosina (Yin, Chen et al. 2009; Latour, Jekle et al. 2010), anticorpos monoclonais (Balsitis, Williams et al. 2010; Sukupolvi-Petty, Austin et

al. 2010), derivados de plantas naturais (Reis, Valente et al. 2008; Ocazionez, Meneses et al. 2010; Simoes, Maciel et al. 2011), interferon (IFN) (Clyde, Kyle et al. 2006) e outras moléculas (Kinney, Huang et al. 2005; Whitby, Pierson et al. 2005; Martinez-Gutierrez, Castellanos et al. 2011).

Recentemente um ensaio clínico em indivíduos adultos vietnamitas com dengue mostrou que o fármaco cloroquina não diminui a viremia, a ativação de células T e a produção de citocinas (Tricou, Minh et al. 2010).

1.6. Controle e prevenção

Os três aspectos fundamentais do controle e prevenção da dengue são a vigilância epidemiológica para um bom planejamento e resposta, redução da doença e mudança de conduta para melhorar o controle do vetor. No entanto, a maioria dos países endêmicos tem um programa de controle e prevenção da dengue que inclui um componente de controle do vetor que é frequentemente ineficaz e insuficiente. Estes programas combinam métodos de melhoramento ambiental (domicílios e comunidades) e métodos químicos, como administração de larvicidas e “sprays” ambientais adulticidas (World Health Organization 2009; Guzman, Halstead et al. 2010).

A pesquisa para desenvolver uma vacina tetravalente segura, efetiva e disponível para todas as pessoas contra a dengue teve início há várias décadas. No entanto, a emergência e reemergência da doença e o fracasso de controle do vetor principal *Ae. aegypti* renovou o interesse e investimento em novos candidatos vacinais. A obtenção de uma vacina contra o DENV é um grande desafio devido à necessidade de obter uma vacina contra quatro sorotipos virais simultaneamente, para evitar o possível risco de acrescentar uma resposta imunológica anômala mediada por anticorpos anti-DENV (imunoamplificação dependente de anticorpos), ausência de um modelo animal adequado e incompleta compreensão dos mecanismos imunes protetores (ação dos anticorpos neutralizantes) (Wilder-Smith, Ooi et al. 2010).

Apesar destas dificuldades técnicas para a obtenção de uma vacina existem diferentes candidatos em fase pré-clínica e clínica nos Estados Unidos, França, Brasil, Cuba, Tailândia, Taiwan, Índia e outros países usando vírus vivos atenuados, vírus inativados, vacinas de subunidades recombinantes, vacinas com vetores virais, vacinas de partículas similares a vírus, vacinas de ADN e vírus quiméricos que possuem o

genoma do vírus da vacina de febre amarela (Wilder-Smith, Ooi et al. 2010; Schmitz, Roehrig et al. 2011). Destes candidatos a vacina mais avançada é a vacina da empresa Sanofi Pasteur que está na fase clínica III. Esta vacina tetravalente é composta por quatro vírus recombinantes vivos atenuados com o genoma do vírus da vacina da febre amarela 17D que expressa os genes de prM e E do DENV. A vacina já foi administrada a mais de 6000 crianças e adultos nas áreas endêmicas e não endêmicas da dengue com bons resultados de segurança, eficácia e imunogenicidade (Guy, Barrere et al. 2011).

1.7. Patogênese da dengue

Embora a patogênese da dengue não esteja completamente esclarecida, se acredita que é multifatorial. Nesta complexa interação multifatorial participam fatores do vírus, e do hospedeiro como uma resposta imune patológica durante a infecção.

1.7.1. Fatores Virais

Os quatro sorotipos de DENV são distintos antigenicamente e apresentam características genéticas diferentes. Por exemplo, a viremia e antigenemia da NS1 são maiores nas infecções pelo DENV-2 do que DENV-1 em crianças vietnamitas (Chau, Quyen et al. 2008; Duyen, Ngoc et al. 2011). Outro estudo prospectivo sugeriu que crianças tailandesas hospitalizadas com infecções da dengue pelos sorotipos 2 e 3 apresentavam duas vezes mais probabilidade de desenvolver FHD do que crianças com DENV-4 (Fried, Gibbons et al. 2010).

A complexidade da biologia dos DENV se acrescenta pela existência de genótipos dentre os sorotipos dos DENV que apresentam origens geográficas distintas. Por exemplo, há evidência que o genótipo asiático de DENV-2 está associado com a gravidade da doença e infecta mais mosquitos quando comparado ao genótipo americano de DENV-2 (Rico Hesse, Harrison et al. 1997). Esta vantagem na transmissão está relacionada à capacidade desses vírus asiáticos atingirem uma viremia mais alta em humanos (Rabaa, Ty Hang et al. 2010). Neste contexto, No Sri Lanka, a introdução de um genótipo novo de DENV-3 foi associada com uma incidência aumentada de dengue grave (Kanakaratne, Wahala et al. 2009).

É notável que subgrupos genéticos chamados “clades” dentre dos diferentes genótipos dos DENV podem ter associação com uma maior gravidade da dengue, como foi demonstrado recentemente na Nicarágua (OhAinle, Balmaseda et al. 2011).

1.7.2. Fatores do hospedeiro

O fato de só uma pequena proporção de indivíduos com infecção secundária pelo DENV apresentar uma doença grave demonstra que outros fatores não virais estariam relacionados ao curso clínico da infecção. Estes fatores são idade, gênero, susceptibilidade genética e comorbidades (Whitehorn and Simmons 2011).

No caso da idade, por exemplo, em uma epidemia cubana pelo DENV-2 a morbidade e mortalidade foram muito maiores em crianças do que em adultos (Guzman, Kouri et al. 2002). Este fenômeno também tem sido demonstrado no Sudeste Asiático (Cummings, Iamsirithaworn et al. 2009; Anders, Nguyet et al. 2011). Esta maior susceptibilidade nas crianças em desenvolver a SCD é provavelmente relacionada ao endotélio vascular mais permeável da idade infantil (Gamble, Bethell et al. 2000).

O gênero feminino tem sido demonstrado como um fator de risco para dengue na Ásia (Kabra, Jain et al. 1999; Anders, Nguyet et al. 2011). A explicação para uma elevada representação de meninas entre casos graves e fatais poderia ser apenas devido à diferença de tempo para procurar atenção médica entre meninas e meninos nesses países (Anders, Nguyet et al. 2011). Outra hipótese alternativa são as diferenças fisiológicas e imunológicas entre sexos (Whitehorn and Simmons 2011).

Estudos epidemiológicos em Cuba (Sierra Bde, Kouri et al. 2007) e no Haiti (Halstead, Streit et al. 2001) sugerem que as pessoas de ascendência africana são menos suscetíveis às manifestações graves de dengue. Além disso, considerando que a resposta imune aos antígenos virais são apresentados nas células T em associação com o antígeno leucocitário humano ou HLA (do inglês “human leukocyte antigen”) classe I e II, alguns genes do HLA poderiam estar associados com proteção ou susceptibilidade à infecção pelos DENV, de acordo com estudos no México (LaFleur, Granados et al. 2002), Vietnam (Nguyen, Kikuchi et al. 2008) e Cuba (Sierra, Alegre et al. 2007).

Diferentes polimorfismos genéticos têm sido relacionados com menor resistência ou vulnerabilidade à infecção pelos DENV. Os polimorfismos envolvidos são associados

ao receptor da vitamina D, que pode modular a resposta imune (Coffey, Mertens et al. 2009), ao receptor Fc que participa na entrada dos vírus unidos a anticorpos anti-DENV nas células alvo (Loke, Bethell et al. 2002), de um receptor viral nas células dendríticas chamado CD209 ou DC-SIGN (do inglês “dendritic cell ICAM-3 grabbing nonintegrin”) (Sakuntabhai, Turbpaiboon et al. 2005) e o antígeno de plaquetas humanas (Soundravally and Hoti 2007). Também o polimorfismo do gene do TNF- α , alelo TNF-308A, tem sido relacionado à maior suscetibilidade a dengue grave em Cuba (Perez, Sierra et al. 2010) e Venezuela (Fernandez-Mestre, Gendzekhadze et al. 2004), mas não no Vietnã (Loke, Bethell et al. 2002).

Doenças crônicas não infecciosas igualmente podem ter influência no resultado da infecção pelos DENV. Estudos em Cuba demonstraram que casos graves e fatais de dengue são mais frequentes em pessoas com anemia falciforme (Bravo, Guzman et al. 1987; Limonta, Gonzalez et al. 2009). Eritrócitos falciformes também têm sido comprovados nos tecidos de placentas de mulheres grávidas com dengue no Brasil (Ribeiro, Silami et al. 2012). Um maior número de casos com diabetes e asma bronquial tem sido encontrado em casos fatais de dengue em trabalhos no Brasil (Figueiredo, Rodrigues et al. 2010), Cuba (Bravo, Guzman et al. 1987; Limonta, Torres et al. 2008), Porto Rico (Rigau-Perez and Laufer 2006) e Cingapura (Lahiri, Fisher et al. 2008).

Embora os países de maior prevalência de dengue e vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) coincidam em algumas áreas geográficas, existem poucos trabalhos da coinfeção dengue-HIV. Os trabalhos feitos em Cingapura (Siong, Ching et al. 2008), Brasil (Mendes Wda, Branco Mdos et al. 2006) e Cuba (Gonzalez, Limonta et al. 2009) não apresentam evidências de mudanças do curso clínico da infecção pelo HIV após a infecção pelos DENV.

1.7.3. Imunopatologia da infecção pelos vírus dengue

A ativação da resposta imune durante a infecção pelos DENV está relacionada à tentativa de eliminação do vírus. No entanto, uma resposta inadequada leva à dengue com o comprometimento de diferentes componentes e células da imunidade inata e adaptativa que serão discutidos a seguir.

1.7.3.1. Envolvimento de Anticorpos

Sabin demonstrou nos anos 40 que a infecção com um sorotipo do DENV causa proteção de longa duração para àquele sorotipo específico (imunidade homotípica), mas imunidade de curta duração contra os outros sorotipos (imunidade heterotípica) (Sabin 1950). Na atualidade, é conhecido que a imunidade homotípica é mediada por anticorpos neutralizantes e a imunidade heterotípica por anticorpos subneutralizantes de reatividade cruzada (Rothman 2011).

Estudos na Ásia e América Latina têm identificado a infecção secundária por um sorotipo diferente de DENV como fator de risco de dengue grave e fatal (Guzman and Kouri 2002; Rothman 2011). A explicação fundamental para este risco aumentado é que os anticorpos não neutralizantes de reatividade cruzada, causados por uma infecção primária, se unem ao vírus e têm maior potencial para infectar as células alvo, principalmente as da linhagem monocítica-macrofágica que apresentam receptores Fc. Este fenômeno chamado de imunoamplificação dependente de anticorpos ou ADE (do inglês "antibody-dependent-enhancement") foi proposto inicialmente em 1977 por Halstead e O'Rourke (Halstead and O'Rourke 1977; Halstead and O'Rourke 1977) e tem sido apoiado principalmente por estudos epidemiológicos realizados em Cuba (Guzman, Kouri et al. 1990; Guzman, Kouri et al. 2000).

Outro fato epidemiológico que apóia o papel importante da ADE é a infecção primária de crianças nascidas de mães imunes para dengue. As infecções primárias em crianças entre 4 e 12 meses de idade podem potencialmente resultar em dengue grave. Em crianças de 3-4 meses, os anticorpos neutralizantes maternos diminuem, porém, os anticorpos não neutralizantes permanecem presentes e poderiam aumentar o risco de dengue grave pela ADE (Kliks, Nimmanitya et al. 1988; Chau, Hieu et al. 2009).

O fenômeno da ADE preocupa muito os grupos de pesquisa em vacinas contra a dengue, uma vez que é duvidoso o envolvimento potencial da ADE no incremento da gravidade de indivíduos vacinados que possam ser infectados naturalmente por outros sorotipos de DENV ou até mesmo, outros flavivírus (Whitehorn and Simmons 2011).

1.7.3.2. Hiperprodução de citocinas

As citocinas podem contribuir no controle da infecção viral por diversos mecanismos de ativação, diferenciação e proliferação de células imunes ou pelo efeito antiviral (Abbas, Lichtman et al. 2011). Em alguns indivíduos com infecção secundária

observa-se uma hiperprodução aguda na circulação de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias, principalmente procedentes de células T, monócitos, macrófagos e células endoteliais. Este fenômeno é conhecido como tempestade de citocinas e se pensa estar relacionado à permeabilidade do endotélio vascular, permitindo a passagem do plasma ao espaço extravascular. Por consequência do extravasamento plasmático, poderiam ser observadas manifestações clínicas de ascite a efusão pleural na dengue grave (Chaturvedi, Agarwal et al. 2000; Basu and Chaturvedi 2008).

As concentrações altas de IL-10 se relacionam à redução do funcionamento e número de plaquetas (Libraty, Endy et al. 2002). O TNF- α promove o aumento da permeabilidade endotelial e é plausível que o incremento desta citocina poderia resultar em um curso clínico mais grave da doença (Anderson, Wang et al. 1997). Embora seja muito provável que as citocinas participam de forma sinérgica na hiperpermeabilidade endotelial na dengue, a interação dinâmica delas tem que ainda ser elucidada.

Altos níveis circulantes de outra família de moléculas pró-inflamatórias chamadas quimiocinas (CCL4/MIP-1 β , CCL3/MIP-1 α , CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES) têm sido também associados à dengue grave em alguns estudos (Lee, Liu et al. 2006; Bozza, Cruz et al. 2008; Sierra, Perez et al. 2010).

1.7.3.3. Desregulação das células T

As células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas aos peptídeos dos DENV os reconhecem no contexto do complexo HLA das células apresentadoras de antígenos e respondem com proliferação celular, lise da célula infectada e produção de uma variedade de citocinas, como os IFN que têm ação antiviral. Estes mecanismos teoricamente deveriam restringir a replicação viral e frear o desenvolvimento da doença (Rothman 2011). Na dengue, a imunidade celular ainda é menos conhecida que a imunidade humoral, mas é fato de que células T CD8⁺ (Yauch, Zellweger et al. 2009) e CD4⁺ (Lazo, Gil et al. 2010) protegem camundongos da infecção pelo DENV.

Estudos em humanos indicaram que a produção de IFN- γ pelas células T CD8⁺ era significativamente mais frequente entre pacientes não hospitalizados, caracterizados pelas formas brandas, do que naqueles que precisaram de hospitalização (Mangada, Endy et al. 2002). Em outro grupo estudado, a presença de células T CD4⁺ era mais

alta em pacientes que experimentaram uma infecção subclínica secundária do que em pacientes que tiveram uma infecção secundária sintomática (Hatch, Endy et al. 2011).

O fundamento de que as células T são importantes contribuintes na imunopatologia da dengue considera a produção incrementada de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios *in vitro* e *in vivo* durante a infecção pelos DENV (Chaturvedi, Agarwal et al. 2000; Perez, Garcia et al. 2004; Nguyen, Nguyen et al. 2005; Chakravarti and Kumaria 2006; Lee, Liu et al. 2006; Bozza, Cruz et al. 2008; Sierra, Perez et al. 2010). Os estudos de associação de HLA com resistência ou suscetibilidade à dengue grave apresentam evidências adicionais sobre a participação das células T em determinar o curso clínico da dengue (LaFleur, Granados et al. 2002; Sierra, Alegre et al. 2007; Nguyen, Kikuchi et al. 2008).

1.7.3.4. Pecado antigênico original na dengue

As células B e T de memória de uma exposição anterior a um sorotipo de DENV são capazes de responder mais rapidamente do que as células virgens da infecção por outro sorotipo atual (Abbas, Lichtman et al. 2011). Porém, por causa da diversidade da sequência genética viral entre os sorotipos dos DENV, estas células de memória reativadas durante a infecção secundária podem não ter ótima avidéz para os epitopos imunogênicos correspondentes ao vírus infectante. Dessa forma, os níveis dos anticorpos e células T específicos para o sorotipo de vírus que causou a infecção anterior permanecem, frequentemente, mais altos que os níveis de anticorpos e células T específicos ao sorotipo infectante atual (Halstead, Rojanasuphot et al. 1983). Esta alteração na resposta imune, caracterizada pela memória de uma infecção prévia, é chamada pecado original antigênico (Midgley, Bajwa-Joseph et al. 2011).

Para as respostas primárias e secundárias de células T existem menos dados disponíveis. Contudo, alguns estudos mostraram que as respostas de células T depois de infecções secundárias apresentam uma alta reatividade cruzada e que ocorre uma expansão preferencial de populações dessas células T de memória (Mongkolsapaya, Dejnirattisai et al. 2003).

1.7.3.5. Ativação do sistema complemento

A redução dos níveis de componentes associados à ativação do sistema complemento (SC) em pacientes com a forma grave da dengue sugere um envolvimento

deste sistema na imunopatogenia da doença (Malasit 1987). Particularmente tem sido postulado que a NS1 viral provocaria uma ativação excessiva do SC, induzindo extravasamento vascular (Avirutnan, Punyadee et al. 2006). Por outro lado, a NS1 também poderia interferir em vias de ativação do SC, diminuindo o *clearance* viral (Avirutnan, Fuchs et al. 2010).

2. APOPTOSE

2.1. Histórico e definição

Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar um tipo morfológico de morte celular (Kerr, Willie et al. 1972). Em grego, a palavra apoptose significa ato de cair, como caem as pétalas das flores e as folhas das árvores no outono. A apoptose foi reconhecida por suas características morfológicas marcantes. A célula retrai devido à perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, as organelas celulares mantêm sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam e se rompem originando estruturas contendo conteúdos celulares denominados corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (Lockshin and Zakeri 2001; Ziegler and Groscurth 2004). Os fagócitos precisam de sinais para distinguir células vivas das apoptóticas e dentre esses sinais, talvez o mais importante seja a translocação de resíduos de fosfatidilserina da parte interna à parte externa da membrana citoplasmática (Martin, Finucane et al. 1996; Poon, Hulett et al. 2010).

Outra característica marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do ácido desoxirribonucléico (ADN), a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de ADN de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de bases. Este fenômeno pode ser detectado pela técnica de TUNEL (do inglês "Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick-end labeling") (Saraste and Pulkki 2000).

A apoptose ocorre em diversos processos fisiológicos, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (Ranganath and Nagashree 2001). Na ausência de apoptose, estima-se que duas toneladas de medula óssea com linfonodos e 16 km de intestino se acumulariam em um humano com 80 anos de idade (Melino 2001).

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado que requer a interação de inúmeros fatores. De fato, as alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (Saraste and Pulkki 2000). Os estudos envolvendo a participação de genes no controle da apoptose iniciaram-se com o nematódio *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Horvitz, Shaham et al. 1994). A morte fisiológica nesses organismos é controlada, principalmente, por três genes da família ced (do inglês “cell death abnormal”), além de outras proteínas com homologia para proteínas humanas (Pereira and Amarante-Mendes 2011).

2.2. Mecanismos e controle da apoptose

As caspases (do inglês “cysteine-dependent aspartate-specific proteases”) pertencem à família das cisteína proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que possuem capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (Pop and Salvesen 2009). As caspases humanas que participam da apoptose são as caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 (Pereira and Amarante-Mendes 2011). É notável que todas as caspases não estejam envolvidas somente na apoptose. A caspase 1, por exemplo, é uma protease inflamatória responsável pela maturação da IL-1 β (Creagh, Conroy et al. 2003).

As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios e somente após um sinal de morte celular, são ativadas por clivagem proteolítica. As caspases podem ser classificadas de acordo com seu papel na apoptose em: iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10), envolvidas na iniciação da cascata proteolítica, e as efetoras (caspases 3, 6 e 7), responsáveis pela clivagem de substratos (Pop and Salvesen 2009).

Além das caspases, a família Bcl-2 é constituída de proteínas indutoras e repressoras da morte por apoptose e que participam ativamente da regulação da apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial. O Bcl-2 (do inglês “B-cell lymphoma 2”) foi originalmente identificado como o segundo membro de um conjunto de proteínas descritas em uma translocação genética no cromossoma 14 e 18 em linfomas foliculares (Marsden and Strasser 2003).

Os membros da família Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1 e BOO/DIVA previnem a liberação de citocromo c da mitocôndria e, portanto, funcionam como reguladores anti-apoptóticos. As proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 não só diferem na função, mas também no número de domínios homólogos ao Bcl-2. Neste contexto, Bax e Bak são proteínas pró-apoptóticas que têm três domínios homólogos ao Bcl-2 (BH1, BH2 e BH3, do inglês “Bcl-2 Homology”), enquanto que Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, NOXA e PUMA só têm o BH3. Estas proteínas pró-apoptóticas incrementam a liberação de citocromo c através da formação de poros na membrana mitocondrial e inibem as proteínas anti-apoptóticas da família do Bcl-2. O citocromo c ativa um complexo chamado apoptosoma constituído pelo Apaf-1 e a procaspase 9 que é em seguida ativada, levando a ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7 (Chipuk, Moldoveanu et al. 2010).

As proteínas inibidoras da apoptose ou IAP (do inglês “Inhibitor of Apoptosis Protein”) são moléculas que exercem seu papel anti-apoptótico através da capacidade de inibir a atividade das caspases efetoras 3 e 7, da caspase iniciadora 9 e de modular o fator de transcrição NF-kB. As IAP foram primeiramente isoladas do genoma de baculovírus (Deveraux and Reed 1999). Os baculovírus compreendem um grupo de vírus de insetos, utilizados como vetores de expressão gênica. Esses vírus têm a capacidade de suprimir a apoptose nas células infectadas, através da inibição das caspases. Durante a apoptose, as IAP são removidas por uma proteína liberada da mitocôndria denominada Smac/DIABLO (do inglês “second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI”) (Chai, Du et al. 2000). Dentre diferentes membros das IAP já foram descritos: NAIP, XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 e Survivina ou BIRC5 (do inglês “baculoviral IAP repeat-containing protein 5”) (Altieri 2010). Um grande número de evidências indica que a Survivina é uma proteína essencial na regulação da progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência à radioterapia e à quimioterapia em diversos tipos de câncer (Cheung, Cheng et al. 2011).

Existem fortes evidências da participação da proteína p53 na supressão da tumorigênese. O gene supressor de tumor p53 codifica uma fosfoproteína nuclear cuja disfunção contribui para a tumorigênese e a agressividade do tumor. Além disso, a maioria dos cânceres apresenta mutações no p53 ou defeitos na sua regulação (Lowe, Cepero et al. 2004).

A superfamília dos receptores e seus ligantes de morte fazem parte da família do fator de necrose tumoral ou TNF/TNFR (do inglês “tumor necrosis factor”,) que inclui outros receptores, dentre eles os três principais: TNFR-1, Fas/FasLigand (TNFSF6 do inglês “TNF superfamily member 6”, ou CD95) e TRAIL ou ligante indutor da apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral (do inglês “TNF-related apoptosis-inducing ligand”, ou TNFSF10 do inglês “TNF superfamily member 10”, ou Apo2L do inglês “apoptosis 2 ligand”) (Galluzzi, Vitale et al. 2012). Os membros da família do TNF/TNFR têm como principal característica um domínio extracelular rico em cisteína (Ashkenazi 2002).

Qualquer distúrbio na regulação da apoptose, tanto o excesso quanto a insuficiência, pode ter implicações clínicas e provocar uma variedade de doenças. A apoptose excessiva pode causar doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson, além de lesões secundárias após isquemia causadas pelo bloqueio de circulação do sangue. As doenças autoimunes podem ser geradas por falhas no programa de morte de células T autoreativas que reagem com autoantígenos. O vírus Epstein-Barr, agente da mononucleose infecciosa, é associado a cânceres linfáticos e produz proteínas semelhantes ao Bcl-2. O vírus do papiloma, principal causa do câncer de colo do útero, inativa ou destrói a p53 (Hotchkiss, Strasser et al. 2009). Por outro lado, a infecção pelo HIV induz a apoptose dos linfócitos T CD4+ por diferentes mecanismos (Cummins and Badley 2010).

2.3. Vias de ativação da apoptose

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana envolvidos na ativação da apoptose, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no ADN, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento e baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (Hotchkiss, Strasser et al. 2009). A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas vias diferentes: pela via extrínseca (receptores de morte) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (Hotchkiss, Strasser et al. 2009).

Mais recentemente, o Comitê da Nomenclatura da Morte Celular do ano 2012 propôs trocar as definições tradicionais, baseadas na morfologia dos tipos de morte celular, por definições mais atuais baseadas em testes moleculares e bioquímicos. Desta forma, incluíram: (i) apoptose extrínseca, (ii) apoptose intrínseca caspase-

dependente, (iii) apoptose intrínseca caspase-independente, (iv) necrose regulada, (v) morte celular autofágica e (vi) catástrofe mitótica (Galluzzi, Vitale et al. 2012).

A via extrínseca é desencadeada pela interação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos TNFR (TNFR-1, FasL, TRAIL). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases. Todos os membros da família TNFR possuem um domínio intracelular que contém uma sequência de 80 aminoácidos chamada domínio de morte ou DD (do inglês “death domain”) sendo, por isso, chamados de receptores de morte celular ou DR (do inglês “death receptors”). Quando os DR reconhecem um ligante específico, os seus DD interagem com os DD de moléculas adaptadoras intracelulares, conhecidas como proteína associada à Fas com DD ou FADD (do inglês “FAS-associated protein with a DD”) ou proteína associada ao TNFR com DD ou TRADD (do inglês “TNFR-associated DD”). As moléculas adaptadoras têm capacidade de recrutar a pró-caspase iniciadora 8 que ativada irá ativar a caspase efetora 3, executando a morte por apoptose (Wilson, Dixit et al. 2009).

A via intrínseca é ativada por um número maior de fatores do que a via extrínseca. Esses fatores incluem: estresse intracelular ou extracelular, deprivação de fatores de crescimento, estresse do retículo endoplasmático, danos no ADN, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são traduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria. Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. A organela integra os estímulos de morte celular, induzindo o colapso do potencial interno da membrana mitocondrial, a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes para o citoplasma (Parsons and Green 2010).

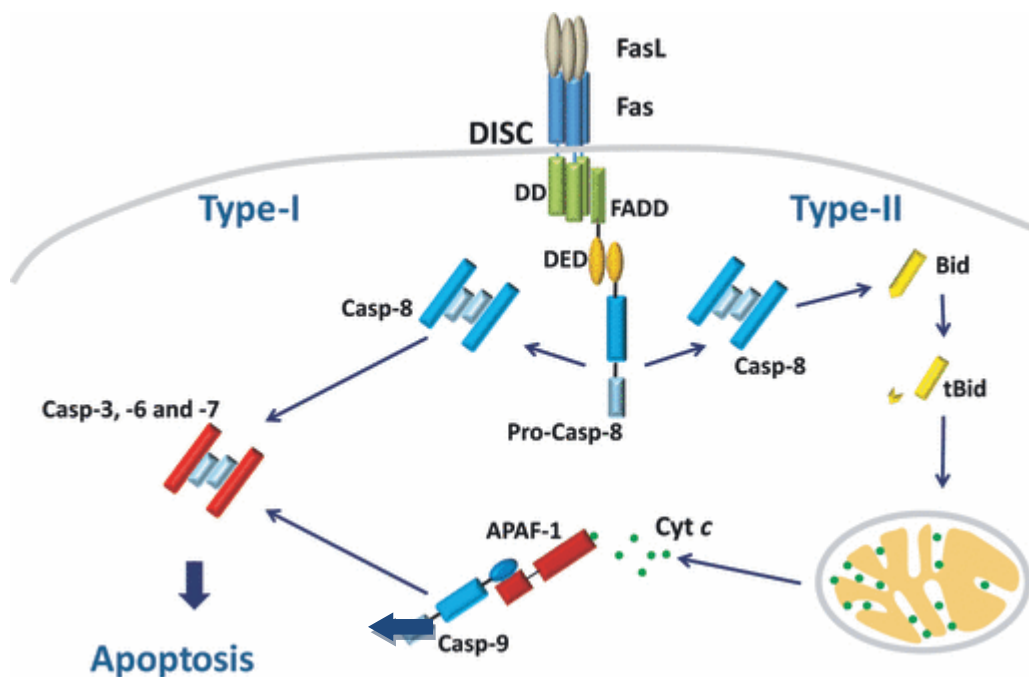


Figura 2.1 Via extrínseca da apoptose. A interação de FasL/CD95L com seu receptor de morte Fas/CD95 induz uma trimerização dos receptores CD95, seguido de recrutamento da proteína adaptadora FADD. A pró-caspase 8 é em seguida recrutada formando o complexo de sinalização de morte induzida ou DISC (do inglês “death-inducing signalling complex”). A caspase 8 ativa pode clivar a caspase 3 diretamente (células tipo I) ou processa o Bid (células tipo II), produzindo uma forma truncada de Bid que se transloca para o mitocôndrio e induz a permeabilização da membrana exterior mitocondrial ou MOMP (do inglês “mitochondrial outer membrane permeabilization”), com a consequente liberação de fatores pró-apoptóticos como o citocromo c e formação do apoptosoma (citocromo c/APAF-1/caspase 9), responsável pela ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7. Adaptada de Pereira e Amarante-Mendes , 2011 (Pereira and Amarante-Mendes 2011).

2.4. A apoptose na dengue

Há muitas evidências em humanos, em modelos animais e *in vitro* do envolvimento da apoptose na infecção dos DENV. Deste modo, se postula fortemente que a morte celular apoptótica poderia ter um papel na fisiopatologia desta doença (Courageot, Catteau et al. 2003; Mongkolsapaya, Dejnirattisai et al. 2003; Myint, Endy et al. 2006; Limonta, Capo et al. 2007).

2.4.1. A apoptose na infecção *in vitro* pelos vírus dengue

Existem muitos exemplos na literatura científica de indução de apoptose durante a infecção *in vitro* pelos DENV. A proteína M dos DENV tem um domínio (ecto-M) de 40 aminoácidos que leva a morte celular apoptótica em células tumorais e transformadas. A análise de mutantes mostrou que somente 9 aminoácidos do ecto-M são necessários à indução de apoptose, sendo chamado de apoptoM, e que a superexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 inibe a apoptose induzida pelo ecto-M em células de hepatoma humano HepG2 (Catteau, Kalinina et al. 2003). Também foi mostrado que o ecto-M induzia a apoptose causando o colapso do potencial de membrana da mitocôndria na linhagem celular HeLa (Catteau, Roue et al. 2003). Em um estudo prévio, os genes de protease de serina NS3 e do precursor de proteína NS2B-NS3 de DENV-2 induziram apoptose em cultura de células Vero (Shafee and AbuBakar 2003). Mais recentemente, outro trabalho demonstrou que estes mesmos genes, NS3 e NS2B-NS3, induziram apoptose de células endoteliais microvasculares em cultura e adicionalmente neste estudo um isolamento clínico de DENV-2 causou também apoptose destas células endoteliais (Vasquez Ochoa, Garcia Cordero et al. 2009). A proteína estrutural C do DENV também pode induzir apoptose em células hepáticas (HepG2) pela interação com a proteína pró-apoptótica Daxx, associada ao Fas (Limjindaporn, Netsawang et al. 2007), e mais recentemente se demonstrou a participação da proteína RIPK2 (Morchang, Yasamut et al. 2011).

A indução de morte celular apoptótica foi demonstrada previamente em isolados de DENV-1 humanos quando inoculados na linhagem de células de neuroblastoma de camundongo Neuro 2a (Despres, Flamand et al. 1996) e de DENV-2 na linhagem de neuroblastoma humano SK-N-SH (Jan, Chen et al. 2000). Outro isolamento humano de DENV-2 causou apoptose através da ativação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 na linhagem de neuroblastoma N18 de camundongos e neuronal humana NT-2 e BHK-21 (Su, Lin et al. 2001).

Em um estudo com várias linhagens celulares (BHK, H1299, HUH-7, Vero) confirmou-se que o DENV-1 induz apoptose por diferentes mecanismos que incluíram a diminuição do potencial interno da membrana mitocondrial e o p53 (Nasirudeen, Wang et al. 2008).

Foi demonstrado que autoanticorpos anti-NS1 de DENV após se unir a células endoteliais induzem apoptose mediada pelo óxido nítrico e hiperprodução de diferentes proteínas pró-apoptóticas e diminuição das anti-apoptóticas (Lin, Lei et al. 2002; Lin, Lin et al. 2004). Em outro estudo, o soro de pacientes com dengue mostrou reatividade cruzada com células endoteliais humanas e causou apoptose mediada por caspases. A reatividade maior foi observada com soros que apresentavam IgM anti-DENV. De forma a confirmar esses achados, a reatividade cruzada com indução de apoptose diminuiu consideravelmente com pré-tratamento do soro com NS1 recombinante de DENV-2 (Lin, Lei et al. 2003). A indução da apoptose de células endoteliais humanas na presença de soro de pacientes parece ser mediada por fatores pró-inflamatórios do soro, possivelmente pelo TNF- α (Cardier, Marino et al. 2005).

O DENV também tem induzido apoptose em células endoteliais de veias da corda umbilical (ECV304) (Avirutnan, Malasit et al. 1998; Liew and Chow 2004), células dendríticas (Palmer, Sun et al. 2005), células da medula óssea (Basu, Jain et al. 2008), monócitos primários (Torrentes-Carvalho, Azeredo et al. 2009; Levy, Valero et al. 2010), linhagem monocítica U937 (Klomporn, Panyasrivanit et al. 2011), cultura primária de hepatócitos (Suksanpaisan, Cabrera-Hernandez et al. 2007) e células de hepatoma humano (Marianneau, Cardona et al. 1997; Thongtan, Panyim et al. 2004; Matsuda, Almasan et al. 2005). Em um dos estudos com células de hepatoma humano se demonstrou que a expressão de TRAIL e seu receptor participavam da indução apoptótica (Matsuda, Almasan et al. 2005).

Recentemente, isolamentos de DENV de casos cambojanos de FHD (Tuiskunen, Monteil et al. 2011) e de um caso fatal paraguaio (Silveira, Meyer et al. 2011) causaram mais apoptose em cultura de células de mosquito e células dendríticas derivadas de monócitos, respectivamente. Por outro lado, o fenômeno de ADE tem sido demonstrado como indutor de apoptose na linhagem celular KU812 de basófilos/mastócitos mediado pelo receptor Fc e com participação das caspases (Brown, Huang et al. 2009).

2.4.2. A apoptose em modelos animais da dengue

Estudo prévio indicou a indução de morte celular apoptótica em células do sistema nervoso central de camundongos recém-nascidos após a inoculação

intracerebral do DENV (Despres, Frenkiel et al. 1998). Outro estudo precedente observou que anticorpos anti-NS1 de DENV-2 provenientes de camundongos, reagem cruzadamente com o endotélio vascular de pequenas veias de camundongos (Lin, Lei et al. 2002). Neste último modelo, observaram-se células endoteliais apoptóticas microvasculares dos tecidos subcutâneos que poderiam estar associadas a sangramentos locais. Adicionalmente, observou-se neste estudo produção *in situ* de altos níveis de TNF- α pelos macrófagos, que estavam associados diretamente à hemorragia e morte celular apoptótica (Chen, Hofman et al. 2007). Em outro estudo utilizando este modelo experimental, também se demonstrou que espécies reativas de nitrogênio e oxigênio poderiam estar relacionadas à indução de apoptose das células endoteliais (Yen, Chen et al. 2008).

2.4.3. A apoptose em pacientes infectados pelos vírus dengue

A apoptose em tecidos de pacientes da dengue foi observada inicialmente no fígado por meio da técnica de TUNEL em dois estudos (Couvelard, Marianneau et al. 1999; Huerre, Lan et al. 2001). Um deles demonstrou a apoptose em um caso adulto fatal com infecção secundária causada por DENV-2 (Couvelard, Marianneau et al. 1999) e o outro, apoptose em células hepáticas de cinco casos fatais de crianças vietnamitas com FHD/SCD, sendo que quatro deles apresentavam infecção secundária por DENV-3 (Huerre, Lan et al. 2001). Mais recentemente em Cuba foram estudados diferentes tecidos de oito óbitos por FHD/SCD com infecção secundária pelo DENV-2 ou DENV-3. Nesta pesquisa, a presença de apoptose das células endoteliais microvasculares estava associada ao extravasamento vascular e ao sangramento observado nos pacientes (Limonta, Capo et al. 2007). Além disso, a apoptose poderia estar associada à fisiopatologia da diabetes mellitus (Limonta, Torres et al. 2008) e a anemia das células falciformes (Limonta, Gonzalez et al. 2009) em parte dos casos estudados.

De forma interessante, em crianças tailandesas durante infecção secundária pelo DENV observou-se que células T de alta afinidade da infecção prévia seriam mais resistentes à apoptose, inclusive expandiriam mais, comparadas às células T CD8+ de baixa afinidade específicas ao sorotipo infectante, susceptíveis à apoptose, caracterizando o fenômeno do pecado antigênico original. Por consequência, ocorreria um menor controle do vírus pelo sistema imunológico, contribuindo para as formas mais severas da doença (Mongkolsapaya, Dejnirattisai et al. 2003).

Níveis plasmáticos aumentados de Fas/CD95 solúvel foi demonstrado em crianças com FHD comparado áqueles com a forma mais branda da doença (Myint, Endy et al. 2006). Uma maior susceptibilidade à apoptose tem sido vista também mediante detecção da expressão de genes pró-apoptóticos em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com dengue (Simmons, Popper et al. 2007; Ubol, Masrinoul et al. 2008; Jaiyen, Masrinoul et al. 2009; Long, Hibberd et al. 2009; Nascimento, Braga-Neto et al. 2009; Devignot, Sapet et al. 2010; Hoang, Lynn et al. 2010). Estudo em CMSP de adultos brasileiros com dengue sugeriu que a apoptose destas células poderia estar associada à diminuição intracelular da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Azeredo, Zagne et al. 2006). Outro trabalho demonstrou significativamente um maior número de CMSP apoptóticas em pacientes com FHD/SCD comparado a forma branda, e que possivelmente a apoptose era mediada por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β (Jaiyen, Masrinoul et al. 2009).

Outra proteína pró-apoptótica, TRAIL, tem sido demonstrada como uma proteína inibidora da replicação do DENV-2 em monócitos, células B, células dendríticas e células endoteliais da veia umbilical (Warke, Martin et al. 2008). Nesta mesma linha, outro trabalho demonstrou que a dosagem de TRAIL estava mais elevada nos pacientes com dengue do que nos pacientes com outras infecções febris. (Becerra, Warke et al. 2009) Mais recentemente, foram demonstrados maiores níveis de ADN circulante, provavelmente de células apoptóticas, no plasma de crianças vietnamitas com FHD do que crianças com a forma branda (Ha, Huy et al. 2011).

Em conjunto, estudos realizados em ensaios *in vitro*, modelos animais e pacientes infectados com dengue vem apontado à contribuição da apoptose na patogenia da dengue. Entretanto, ainda não está claro como se dá essa interação. O objetivo deste trabalho é avaliar o envolvimento de proteínas circulantes relacionadas a apoptose na patogênese da infecção pelos DENV. Os níveis plasmáticos de moléculas pró-apoptóticas (TNF- α , TRAIL, FasL) e da proteína anti-apoptótica (Survivina) foram dosados em pacientes da dengue e correlacionados com parâmetros clínico-laboratoriais associados à gravidade da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar o envolvimento de proteínas circulantes relacionadas a apoptose na patogênese da infecção humana pelos vírus dengue.

3.2. Objetivos Específicos:

3.2.1. Comparar a frequência de positividade entre os cinco testes mais utilizados na confirmação de diagnóstico laboratorial da dengue.

3.2.2. Classificar clinicamente os pacientes de acordo com as novas normas da Organização Mundial da Saúde (2009) e compará-la à classificação tradicional (1997).

3.2.3. Determinar o nível plasmático de proteínas associadas ao processo de morte celular por apoptose em pacientes com diferentes formas clínicas da dengue.

3.2.4. Buscar correlações entre os níveis das proteínas circulantes envolvidas na apoptose com parâmetros clínico-laboratoriais associados à gravidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estudo populacional e amostras de sangue

Para a realização deste estudo, foram coletadas entre março e abril de 2010 amostras de sangue de 107 pacientes febris suspeitos de infecção pelos DENV. Deste total, 63 casos foram atendidos no Hospital-Dia Professora Esterina Corsini, na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS pela equipe do Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha. Outros 44 pacientes foram atendidos no Centro de Referência de Dengue (CRD) do Hospital dos Plantadores de Cana, Campos dos Goytacazes (RJ) pela equipe do Dr. Luiz José de Souza. Doze indivíduos adultos saudáveis oriundos dos estados do RJ e MS foram inseridos no estudo como grupo controle, considerando que os mesmos não haviam apresentado episódios febris há mais de três meses ou histórico de outras doenças e apresentaram sorologia negativa para dengue.

As amostras foram coletadas entre 1^o e o 11^o dia após o aparecimento dos primeiros sintomas. Além disso, amostras da fase convalescente (>14 dias) foram obtidas em 24 casos do hospital da UFMS. Soro e plasma foram separados de amostras de sangue e transportados em nitrogênio líquido ao Laboratório de Imunologia Viral (LIV) e Laboratório de Flavivírus (LABFLA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) até sua utilização.

4.2. Aprovação ética

Os pacientes e voluntários saudáveis (controles) concordaram em participar do projeto mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fiocruz, Ministério de Saúde, sob o número 0111/00.

4.3. Diagnóstico virológico dos vírus dengue

O diagnóstico de infecção aguda pelos DENV foi confirmado laboratorialmente. Quatro diferentes metodologias foram utilizadas e o diagnóstico foi confirmado quando um ou mais testes foram positivos.

4.3.1. Isolamento viral

Para o isolamento viral, foram inoculados soros coletados com intervalo igual ou inferior a sete dias a partir do início do quadro clínico. Como sistema para isolamento de vírus, foram utilizadas culturas de células do mosquito *Ae.albopictus* clone C6/36 (Igarashi, 1978). Em resumo, as células foram cultivadas em tubos de 1,5 x 16 cm

contendo 2,0 mL de meio Leibovitz (L-15) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Após formação de monocamada, o meio foi substituído por igual volume de meio L-15 contendo 2% de SFB. Os soros dos casos suspeitos foram diluídos 1/10 em meio L-15 e 0,1 mL desta diluição/paciente foram inoculados na monocamada celular. Para cada grupo de soros inoculados, foram incluídos controles de vírus e de células. Após a inoculação, os tubos foram incubados à temperatura de 28°C e observados diariamente, por um período de até dez dias, em microscópio óptico invertido (Carl Zeiss, Deutschland, Germany), com aumento de até 800 vezes.

4.3.1.1. Detecção e identificação viral

As culturas que não apresentaram efeito citopático após o 10^o dia de inoculação foram testadas com fluido ascítico hiperimune de camundongo ou MIAF (do inglês “mouse immune ascitic fluid”) para dengue, pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção dos DENV, sendo as reações negativas consideradas como isolamento negativo.

As culturas que apresentaram reação positiva pela IFI para detecção ou pela observação de efeito citopático característico (sincícios), foram processadas pela técnica de IFI para a tipagem viral, empregando-se, neste caso, anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos dos DENV (Gubler, Kuno et al. 1984), seguindo a metodologia abaixo.

Após agitação, os tubos de células inoculados foram mantidos à temperatura de 4°C por no mínimo 2 horas para a sedimentação das células. Aproximadamente 1,0 mL do fluido de cada cultura foi retirado e as células ressuspensas no meio restante. Para a detecção viral, 0,025 mL de suspensão celular de cada cultura foi depositada sobre um dos 10 círculos existentes nas lâminas de 26 x 76 mm (Biolab Merieux, New Zealand). Após secagem à temperatura ambiente, as células foram fixadas com acetona P.A. (Merck, Darmstadt, Germany) a – 20°C durante 20 minutos. Controles de células infectadas e não infectadas foram incluídas em cada grupo de lâminas processadas.

Após secagem à temperatura ambiente, foi adicionado em cada círculo da lâmina, 0,025 mL de um MIAF, diluído 1: 50 em PBS pH 7,5. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos e deixadas à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram adicionados 0,025 mL de IgG de cabra anti-camundongo conjugado com fluoresceína (Antibodies Incorporated, Davis, USA), diluído

1:30 em preto de naftaleno a 0,1% e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após duas lavagens em PBS pH 7,2 por 10 minutos, as lâminas foram rinsadas com água destilada, colocadas à temperatura ambiente para secagem e montadas com glicerina tamponada e lamínulas (24 x 60 mm) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

No caso da técnica de IFI para a tipagem viral, foi preparada uma lâmina para cada amostra, depositando 0,025 mL de suspensão celular em cada círculo. As lâminas foram colocadas à temperatura ambiente para secagem e fixadas com acetona a -20°C durante 20 minutos. Em cada círculo, foram adicionados 0,025 mL de anticorpos monoclonais específicos para os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, diluídos 1: 50 (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) e 1:20 (DENV-2) em PBS pH 7,5. Em cada lâmina, foram incluídos um controle positivo (MIAF diluído 1: 120 em PBS pH 7,5) e um controle negativo (PBS pH 7,5).

Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos e colocadas à temperatura ambiente para secagem. A seguir, foram adicionados 0,025 mL de IgG de cabra anti-camundongo conjugado com fluoresceína diluída 1:30 em preto de naftaleno 0,1% em PBS pH 7,5. Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos, rinsadas em água destilada, secas à temperatura ambiente e montadas com glicerina tamponada e lamínulas (24 x 50 mm).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico de epifluorescência (Carl Zeiss, Deutschland, Germany), com aumento de 400 vezes, equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão HBO 50 W e jogo de filtro convencional (FT 510 / LP 520).

4.3.2. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase

O ARN viral foi obtido através do QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Posteriormente, um Termociclador (GeneAmp PCR System, Applied Biosystems Inc., CA, USA) foi utilizado para amplificar o gene viral de acordo ao protocolo descrito previamente de um “nested” RT-PCR (Lanciotti, Calisher et al. 1992)

4.3.3. Detecção da proteína não estrutural NS1

Foi utilizado o kit comercial Dengue NS1 Ag STRIP (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France): o teste foi realizado de acordo com o fabricante e permite identificar os casos com viremia (Lima Mda, Nogueira et al. 2010; Lima Mda, Nogueira et al. 2011).

4.3.4 Detecção de anticorpos da classe IgM anti-dengue

Foi utilizado o teste de captura de IgM anti-dengue (MAC-ELISA) (PanBio Diagnostics, Brisbane, Australia). Este teste foi realizado de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante, permitindo diagnosticar os casos agudos pela presença de IgM anti-dengue (>11 unidades PanBio) nas amostras agudas ou soroconversão nas amostras convalescentes (Vazquez, Hafner et al. 2007).

4.3.5 Classificação da resposta imune do tipo primária e secundária

Para a determinação do tipo de resposta foi empregado um kit de origem comercial de captura de IgG anti-dengue (PanBio Diagnostics, Brisbane, Australia) e realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Vazquez, Hafner et al. 2007).

4.4. Coleta dos dados clínicos

Dados demográficos, manifestações clínicas e análises laboratoriais (hemogramas, dosagem das transaminases hepáticas, raios X, ultra-som e outros) foram adquiridos pela equipe do LIV, no momento da consulta clínica do paciente, adicionados em formulários padronizados e transferidos posteriormente para o Banco de dados do Programa Epi Data versão 3.1 (<http://www.epidata.dk>). A coleta de todos os dados foi monitorizada pelo corpo clínico especialista em dengue dos hospitais participantes. Fotocópias das fichas clínicas foram feitas para análises subsequentes.

4.5. Classificação clínica da dengue segundo a OMS

Após confirmação laboratorial do diagnóstico de dengue, a classificação quanto ao nível de gravidade da doença foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo TDR/OMS no ano 2009. Segundo as normas da TDR/OMS 2009, dengue pode ser classificada em: dengue sem sinais de alerta ou DSSA, dengue com sinais de alerta ou DCSA e dengue grave ou DG (World Health Organization 2009; Alexander, Balmaseda et al. 2011)

Os critérios para DSSA são febre acompanhada de dois ou mais sinais específicas que não são de alerta. Em relação aos casos de DCSA os sinais de alerta indicam algum grau de permeabilidade vascular. Por fim, os casos de DG apresentam pelo menos uma das manifestações graves da doença (World Health Organization 2009).

4.6. Quantificação de moléculas circulantes envolvidas na apoptose pela técnica de ELISA

Plasmas obtidos após coleta de sangue em tubo heparinizado (14,4 unidades de heparina por mL de sangue) foram utilizados para dosagens de TNF- α (Pepro Tech, Inc., NJ, USA), FasL, TRAIL e Survivina (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA),

segundo protocolo fornecido pelo fabricante. O espectrofotômetro Expert Plus® (Biocrom Ltd, Cambridge, England) foi usado na aquisição da medida da densidade óptica das amostras e padrões (comprimento de onda de 450nm). Abaixo seguem informações sobre os kits utilizados nas dosagens (**Tabela 4.1**).

Em relação à dosagem de TNF- α , 100 μ L do anticorpo de captura à concentração de 0,5 μ g/mL para o TNF- α (Pepro Tech, Inc., NJ, USA) diluído em PBS pH 7,2 foram adicionados por poço numa placa de 96 poços (Falcon BD) e incubados por 18h à temperatura ambiente. Ao final deste período, quatro lavagens com solução de lavagem (0,05 % de tween-20 em PBS pH 7,2) foram realizadas. Em seguida, 200 μ L de solução de bloqueio (5% de albumina de soro bovino ou BSA em PBS pH 7,2) foram adicionados por poço com incubação por 2 horas a temperatura ambiente. A curva padrão de TNF- α (igualmente para as restantes proteínas) foi preparada através de diluições seriadas da alíquota do padrão fornecida pelo fabricante. Foram adicionados 100 μ L das amostras de plasma concentradas e dos padrões diluídos por poço na placa com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, foram realizadas quatro lavagens com solução de lavagem e adicionados 100 μ L do anticorpo de detecção na concentração de 0,25 μ g/mL para o TNF- α . Ao final desta etapa, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μ L do conjugado Avidina-HRP por poço, diluído 1: 2000 em solução diluente por 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, 100 μ L do substrato 3,3',5,5'-TMB (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) foi adicionado por poço. A aquisição da medida da densidade óptica das amostras e padrões foi realizada pelo espectrofotômetro Expert Plus® (Biocrom Ltd, Cambridge, England) utilizando o comprimento de onda de 620nm.

Tabela 4.1 Informações sobre os kits utilizados e procedimentos dos ensaios de ELISA.

Molécula	Diluição da amostra	da Curva Padrão pg/mL	Fabricante	Catálogo
TNF-α	Concentrada	1000-15,62	Pepro Tech	900-K25
FasL	Concentrada	1000-31,25	R&D Systems	DFL00
TRAIL	Concentrada	1000-31,25	R&D Systems	DTRL00
Survivina	Concentrada	2000-31,25	R&D Systems	DSV00

4.7. Análise estatística

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais foram arquivados no Programa Epi Data versão 3.1 (<http://www.epidata.dk>). As diferenças entre os grupos de pacientes e controles em relação aos parâmetros utilizados no estudo e as correlações entre os dados foram feitas através do teste não paramétrico Mann-Whitney U e Spearman, utilizando o programa GraphPad Prism versão 5 para Windows (<http://www.graphpad.com>). Os dados passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorow-Smirnov admitindo-se um nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Métodos laboratoriais na confirmação dos casos suspeitos

Os testes virológicos utilizados neste estudo permitiram confirmar a infecção aguda pelos DENV em 72 dos 107 pacientes com suspeita clínica da doença (67,3%). Como podemos observar na **Tabela 5.1**, a sorologia confirmou um maior número de casos (77,8%), seguido da detecção de NS1 (47,8%). Em relação aos sorotipos identificados, DENV-2 foi o sorotipo predominante na epidemia de Campos dos Goytacazes (RJ). Em MS a cocirculação de DENV-1 e DENV-2 foi confirmada. O RT-PCR demonstrou maior sensibilidade (40,6%) em relação ao isolamento de vírus (23,6%).

Em relação à resposta imune, altos títulos de IgG específica para os DENV foram detectados em 62/72 ou 86,1% dos pacientes, indicando infecção secundária segundo o fabricante do kit (PanBio Diagnostics, Brisbane, Australia).

Tabela 5.1 Diagnóstico laboratorial dos DENV considerando diferentes metodologias.

Método	Amostras positivas/testadas ^a	% de positividade
Diagnóstico confirmado por uma ou mais metodologias	72/107	67,3
IgM anti-dengue	56/72	77,8
NS1 viral	11/23	47,8
Isolamento viral	16/69	23,2
	3 DENV-1 e 13 DENV-2 ^b	
RT-PCR	28/69	40,6
	7 DENV-1 e 21 DENV-2	
IgG anti-dengue	62/72	86,1

^a amostras de pacientes com diagnóstico laboratorial positivo em relação ao total de amostras de pacientes testadas

^b número de amostras positivas para o DENV-1 e DENV-2

5.2 Dados demográficos dos casos confirmados de infecção pelos vírus dengue

As tabelas e resultados se referem a 67 pacientes nos quais foram dosadas as moléculas solúveis relacionadas a apoptose. Dos pacientes, 50,7% são do sexo feminino com idade média de 40 anos e apenas 5 crianças (< 15 anos) foram incluídos no estudo (**Tabela 5.2**). Os pacientes na fase aguda encontravam-se entre o 1º e 11º dias de doença, contados a partir do aparecimento dos primeiros sintomas e os convalescentes entre o 17º e 44º dias.

5.3. Classificação clínica dos pacientes nos quais foram dosadas as moléculas relacionadas a apoptose

Baseado na classificação mais recente do nível de gravidade da OMS (World Health Organization 2009), os casos de dengue foram organizados em três grupos como demonstrado na **Tabela 5.2**. O primeiro grupo é composto por 35 indivíduos com a forma branda da doença, sem apresentar sinais de alerta (DSSA); 17 pacientes apresentaram sinais de alerta e constituiu o segundo grupo (DCSA); 15 pacientes desenvolveram a forma grave da doença (DG).

Os sinais e sintomas clínicos mais frequentes nos três grupos foram febre, cefaleia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, adinamia, exantema, anorexia, náuseas e vômitos. Os grupos DCSA e DG apresentaram também hepatomegalia, adenomegalia, vômitos persistentes, irritabilidade e sonolência. Apenas os pacientes DG apresentaram parestesia e dispnéia. Um dos pacientes com a forma grave apresentou hipotermia, hipotensão, esplenomegalia, pulso fino, cianose, comprometimento hepático e choque, evoluindo a óbito.

Manifestações hemorrágicas, como hematúria e gengivorragia, foram observadas. Contudo, petéquias, epistaxe, metrorragia e melena estavam presentes nos pacientes DCSA e nos casos graves. As manifestações hemorrágicas foram mais frequentes nos casos de DG. Extravasamento plasmático, com ascite e/ou derrame pleural foi observado em 54% dos indivíduos com a forma grave (DG) (**Tabela 5.2**).

Dos 15 casos graves (DG), 5 casos foram classificados como FHD/SCD de acordo com a classificação tradicional da OMS (World Health Organization 1997). Os pacientes foram divididos da seguinte forma: FHD-I (2 casos), FHD-II (2 casos), SCD-IV (único caso fatal). Esses 5 casos, mostraram sintomas, sinais e parâmetros laboratoriais de gravidade (DG) conforme a nova classificação. Os demais 62 casos, segundo a classificação tradicional, foram agrupados como DC.

5.4. Caracterização laboratorial dos pacientes nos quais foram dosadas as moléculas solúveis relacionadas a apoptose

Na **Tabela 5.2**, podemos observar que a contagem de plaquetas diminuiu de forma significativa com a gravidade da doença. De forma surpreendente, os percentuais do hematócrito foram significativamente menores nos pacientes DG comparados aos DSSA. As alterações de função hepática durante a infecção pelos DENV foram avaliadas através da dosagem das enzimas hepáticas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT). Os níveis de AST e ALT foram significativamente maiores nos pacientes DG comparados aos pacientes DSSA. Com exceção da contagem de plaquetas, nenhuma das avaliações laboratoriais discutidas até o momento, indicou diferença estatística entre os grupos DCSA versus DG ou DCSA versus DSSA.

Todos os grupos de pacientes estudados (DSSA, DCSA, DG) apresentaram casos com leucopenia. A porcentagem de monócitos, segundo o leucograma, foi significativamente maior nos pacientes DCSA comparados aos DSSA. Pacientes do grupo DG apresentaram uma tendência à média mais elevada na porcentagem de linfócitos totais comparado aos demais grupos, no entanto este dado não foi significativo.

Tabela 5.2 Perfil demográfico, clínico e laboratorial dos pacientes infectados pelos DENV.

Grupo	DSSA ⁿ⁼³⁵	DCSA ⁿ⁼¹⁷	DG ⁿ⁼¹⁵
Sexo (Feminino/Masculino)	17/18	10/7	7/8
Idade (Média ± SD)	39,1 ± 17,1	41,8 ± 17,6	40,4 ± 19,6
Dias de Doença (Média ± SD)^a (Mín-Máx)	4,0 ± 2,2 (1-10) ⁿ⁼³¹	3,8 ± 2,9 (1-11) ⁿ⁼¹⁶	4,5 ± 2,2 (1-8) ⁿ⁼¹⁴
Infecção primária (n/total; %)	6/34; 17,6%	0/17	0/12
Infecção secundária (n/total;%)	28/34; 82,4%	17/17; 100%	12/15; 80%
DENV-1 (n/total;%)	3/16; 18,7%	3/7; 42,8%	0/4
DENV-2 (n/total;%)	13/16; 81,3%	4/7; 47,2%	4/4; 100%
Sorotipo desconhecido (n/total; %)	19/35; 54,3%	10/17; 58,8%	11/15; 73,3%
Extravasamento plasmático (n/total; %)^b	0/25	0/16	7/13; 54%
Plaquetas x 10³/mm³ (Média ± SD) (Mín-Máx)	143,4 ± 76 (25-318) ⁿ⁼³¹	97 ± 55,6 [#] (13-233) ⁿ⁼¹⁶	46,4 ± 45 ^{***, §§} (10-156) ⁿ⁼¹⁴
Hematócrito % (Média± SD) (Mín-Máx)	40,7 ± 3,4 (28,8- 47,7) ⁿ⁼³¹	39,8 ± 4,8 (31-46,7) ⁿ⁼¹⁶	38,3 ± 4,5 ^{**} (35 - 43,2) ⁿ⁼¹⁴
AST U/L (Média ± SD) (Mín-Máx)	70,3 ± 71,4 (17-292) ⁿ⁼²³	95,6 ± 93,3 (30- 284) ⁿ⁼¹⁴	1808± 5926,3 [*] (35-20618) ⁿ⁼¹²
ALT U/L (Média ± SD) (Mín-Máx)	70,9 ± 77,6 (15-287) ⁿ⁼²³	77,1 ± 71 (17-269) ⁿ⁼¹⁴	557,5 ± 1588,6 [*] (29-5598) ⁿ⁼¹²
Leucócitos x10³/mm³ (Média ± SD) (Mín-Máx)	4,6 ± 2,7 (1,7-13,1) ⁿ⁼²⁷	4,3 ± 2,6 (1,7-10,5) ⁿ⁼¹⁶	5,8 ± 3,5 (1,1-12) ⁿ⁼¹³
Monócitos % (Média ± SD) (Mín-Máx)	12,1 ± 4,5 (3- 21,2) ⁿ⁼²⁷	9,1± 3,3 [#] (4- 11,9) ⁿ⁼¹³	12,7 ± 5,6 (5- 20,1) ⁿ⁼¹²
Linfócitos % (Média ± SD) (Mín-Máx)	34,7 ± 15,3 (11,8-63,6) ⁿ⁼²⁶	36 ± 18,9 (1-70) ⁿ⁼¹⁴	43,8± 16,8 (18,9-73) ⁿ⁼¹¹

^a Dias de doença, contados a partir do aparecimento dos primeiros sintomas.

^b Derrame pleural e/ou ascite.

As contagens de plaquetas e leucócitos, a porcentagem do hematócrito, monócitos e linfócitos, bem como a dosagem das enzimas AST e ALT foram obtidas através dos hemogramas realizados pelos laboratórios dos hospitais nos quais os pacientes foram atendidos (Hospital-Dia Professora Esterina Corsini, MS, e Hospital dos Plantadores de Cana, RJ).

Teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, três símbolos representam P<0,0001; dois símbolos P<0,001 e um símbolo P<0,05.

representa diferença estatística entre DSSA vs DCSA;

§ representa diferença estatística entre DCSA vs DG;

* representa diferença estatística entre DSSA vs DG

5.5. Correlação entre parâmetros laboratoriais e patogênese da dengue

No intuito de avaliar os parâmetros envolvidos na patogênese da dengue, fizemos correlações entre os dados laboratoriais dos pacientes. Na **Tabela 5.3** observamos correlação inversa entre as (i) enzimas hepáticas AST ou ALT e a contagem de plaquetas/mm³. Além disso, observamos correlações diretas entre: (ii) hematócrito e a contagem de plaquetas e (iii) as enzimas AST e ALT com a contagem de linfócitos. Esses dados nos permitiram selecionar alguns parâmetros, como contagem de plaquetas e os níveis das enzimas hepáticas, como parâmetros potencialmente

envolvidos na patogênese da doença. Por consequência, esses parâmetros laboratoriais serão continuamente correlacionados com os demais resultados.

Tabela 5.3 Correlações entre os dados laboratoriais dos pacientes infectados pelos DENV.

	Dias de doença	Plaquetas/mm ³	AST/TGO U/L	ALT/TGP U/L
Dias de doença		ns ⁿ⁼⁶⁰	ns ⁿ⁼⁴⁸	ns ⁿ⁼⁴⁸
Plaquetas/mm ³	ns ⁿ⁼⁶⁰		<i>r (-) 0,472ⁿ⁼⁴⁹</i> **P 0,0006	<i>r (-) 0,332ⁿ⁼⁴⁹</i> *P 0,02
Hematócrito %	ns ⁿ⁼⁵⁹	<i>r 0,292ⁿ⁼⁶¹</i> *P 0,02	ns ⁿ⁼⁴⁸	ns ⁿ⁼⁴⁸
Leucócitos x10 ³ /mm ³	ns ⁿ⁼⁵⁴	ns ⁿ⁼⁵⁶	ns ⁿ⁼⁴⁹	ns ⁿ⁼⁴⁹
Monócitos %	ns ⁿ⁼⁵⁰	ns ⁿ⁼⁵²	ns ⁿ⁼⁴⁶	ns ⁿ⁼⁴⁶
Linfócitos %	ns ⁿ⁼⁴⁹	ns ⁿ⁼⁵¹	<i>r 0,317ⁿ⁼⁴⁵</i> *P 0,03	<i>r 0,318ⁿ⁼⁴⁵</i> *P 0,03

Foi realizada a correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism versão 5. Correlação direta é vista quando o valor de *r* é positivo e correlação inversa quando o *r* é negativo. Valores de P (“two-tailed”) foram considerados significativos quando: P < 0,05. Refere-se ns à correlação não significativa e n representa o número de pares analisados.

5.6. Dosagem de moléculas circulantes relacionadas ao processo de apoptose em amostras de pacientes nas fases aguda e convalescente.

Como demonstrado na **Figura 5.1**, em relação ao TNF- α pacientes do grupo DSSA apresentaram níveis plasmáticos mais elevados da citocina comparado aos indivíduos saudáveis e pacientes com as formas mais graves (DG). De forma surpreendente, não detectamos diferença entre os pacientes do grupo do DCSA e DG com os demais grupos.

As detecções das moléculas FasL e TRAIL foram altamente variáveis em cada um dos grupos de pacientes. Pelo exposto observa-se que pacientes do grupo DSSA foram os que apresentaram níveis mais elevados de FasL e TRAIL quando comparados aos controles e pacientes do grupo DG, de forma estatisticamente significativa. Observamos ainda uma tendência de diminuição dessas moléculas com a gravidade da doença, mas sem significância estatística. Por outro lado, é importante ressaltar que o único caso fatal, causado pelo DENV-2, apresentou nível de FasL plasmático mais elevado do grupo, 792,23 pg/mL.

Em relação à dosagem da Survivina, observamos uma grande variabilidade na detecção desta proteína. Ainda assim, os resultados indicam que o grupo DCSA apresentou níveis diminuídos e estatísticos em comparação aos controles saudáveis e pacientes DG.

As análises de correlação entre as dosagens das proteínas indicaram uma única correlação direta entre os níveis de TRAIL e FasL (**Tabela 5.4**).

Uma análise preliminar foi realizada em amostras pareadas de 12 pacientes nas fases aguda e convalescente comparando-se os níveis plasmáticos das moléculas FasL, TRAIL e Survivina. Como demonstrado na **Figura 5.2**, na fase aguda os níveis da proteína FasL diminuíram em 7 dos 12 pacientes na fase de convalescência, de forma similar ao TRAIL (6 dos 12). O nível de Survivina diminuiu em 28% dos casos avaliados (2/7).

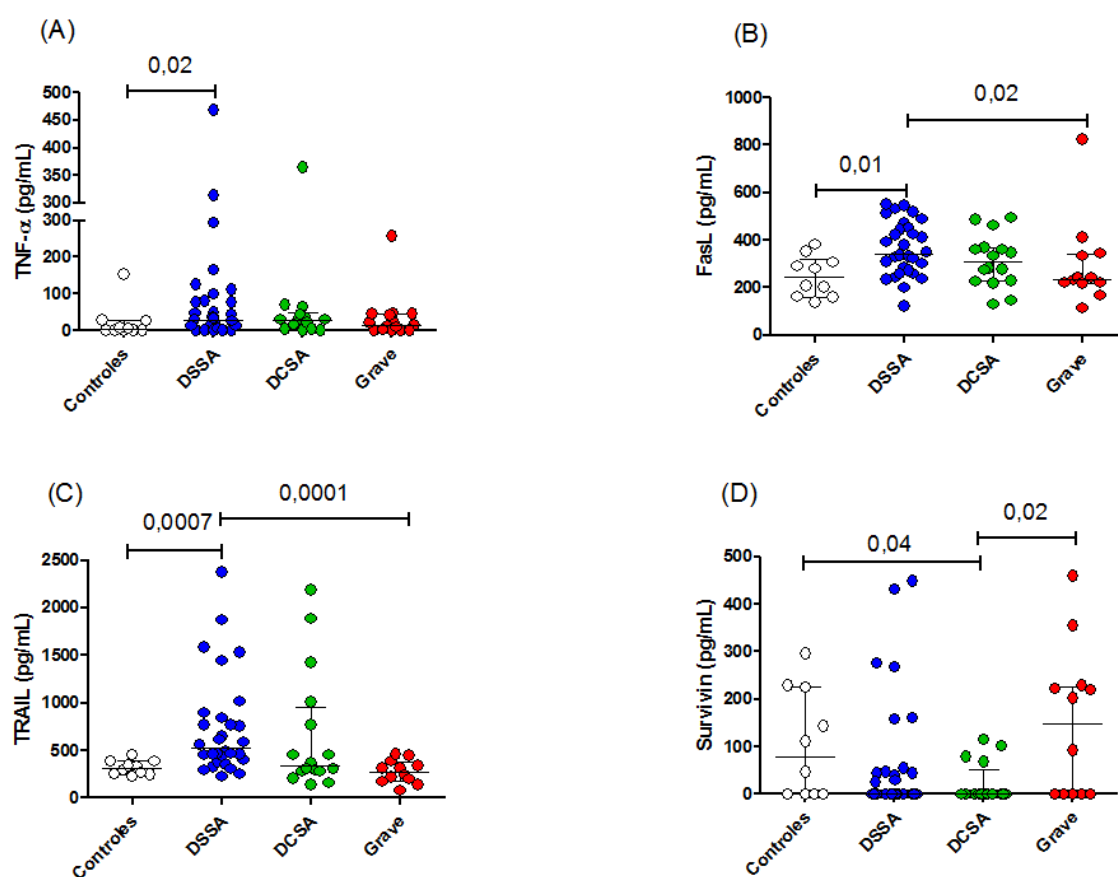


Figura 5.1 Dosagens de proteínas plasmáticas envolvidas na apoptose pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) em pacientes com dengue. Os níveis das moléculas TNF- α (A), FasL (B), TRAIL (C) e Survivina (D) são demonstrados nos controles e pacientes segundo a recente classificação da dengue da OMS. Linhas horizontais representam a mediana do grupo e as verticais à variação interquartil (25-75%). Os valores com

significância estatística estão incluídos. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para análise estatística, utilizando o programa GraphPad Prism 5.

Tabela 5.4 Correlações entre as dosagens de proteínas solúveis associadas à apoptose em pacientes infectados pelos DENV.

	TNF-α (pg/mL)	FasL (pg/mL)	TRAIL (pg/mL)
FasL (pg/mL)	ns ⁿ⁼⁵⁴		<i>r 0,343ⁿ⁼⁵⁷</i> **P 0,009
TRAIL (pg/mL)	ns ⁿ⁼⁵⁴	<i>r 0,343ⁿ⁼⁵⁷</i> **P 0,009	
Survivina (pg/mL)	ns ⁿ⁼⁵³	ns ⁿ⁼⁵⁷	ns ⁿ⁼⁵⁷

Foi realizada a correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism versão 5. Correlação direta é vista quando o valor de r é positivo e correlação inversa quando o r é negativo. Valores de P (“two-tailed”) foram considerados significativos quando: $P < 0,05$. Refere-se ns à correlação não significativa e n representa o número de pares analisados.

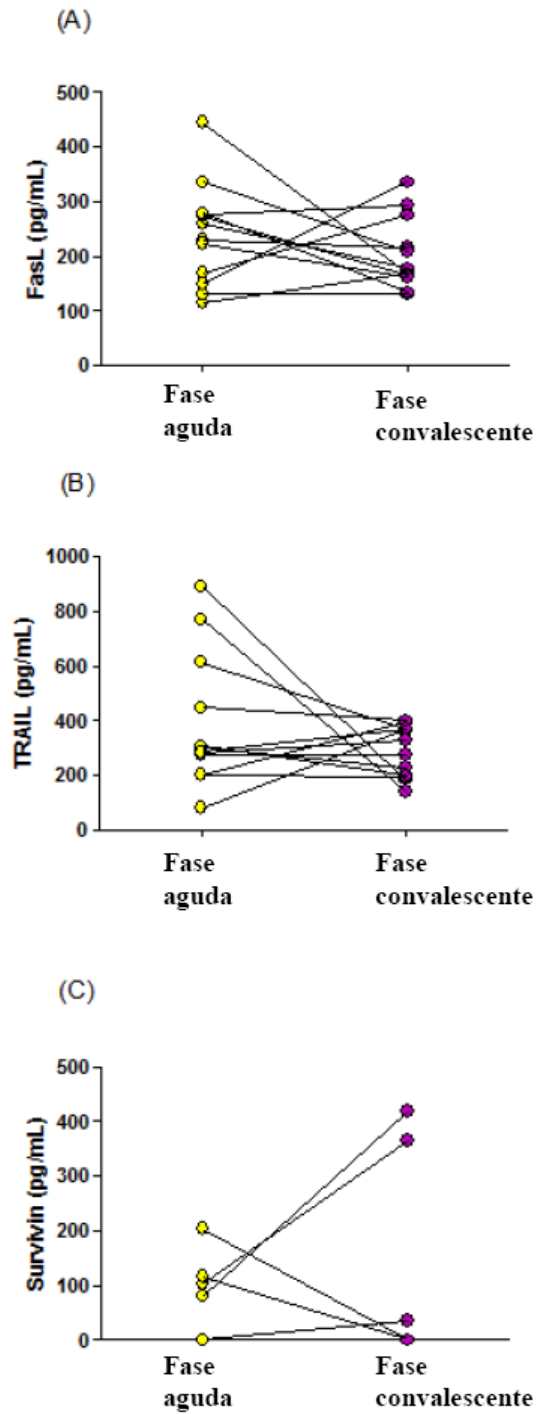


Figura 5.2. Dosagens de proteínas plasmáticas envolvidas na apoptose em amostras pareadas da fase aguda e convalescente de pacientes com dengue. A concentração de FasL (A), TRAIL (B) e Survivina (C) são demonstrados.

5.7. Correlações entre os níveis plasmáticos na fase aguda de moléculas envolvidas na apoptose com os parâmetros laboratoriais associados à patogênese

Nosso próximo passo foi avaliar a relação entre os níveis das proteínas plasmáticas na fase aguda com os parâmetros associados à patogênese. Como demonstrado na **Tabela 5.5**, observamos de forma bastante interessante uma correlação inversa entre os (i) níveis de TRAIL com a frequência (%) de linfócitos, enquanto que às correlações diretas indicaram que (ii) TRAIL e FasL correlacionam com a contagem de plaquetas/mm³ e (iii) TRAIL com o hematócrito. De forma interessante, (iv) Survivina estava correlacionada com a contagem dos leucócitos totais. Nenhuma correlação foi observada entre os níveis plasmáticos de TNF- α e os dados laboratoriais (dado não demonstrado).

Tabela 5.5 Correlações entre as dosagens de proteínas solúveis associadas a apoptose com os dados laboratoriais dos pacientes infectados pelos DENV na fase aguda.

	TRAIL (pg/mL)	FasL (pg/mL)	Survivina (pg/mL)
Plaquetas/mm ³	<i>r</i> 0,476 ⁿ⁼⁵⁴ *** <i>P</i> 0,0003	<i>r</i> 0,290 ⁿ⁼⁵⁴ * <i>P</i> 0,03	ns ⁿ⁼⁵⁴
Hematócrito %	<i>r</i> 0,368 ⁿ⁼⁵³ ** <i>P</i> 0,007	ns ⁿ⁼⁵³	ns ⁿ⁼⁵³
AST/TGO U/L	ns ⁿ⁼⁴³	ns ⁿ⁼⁴³	ns ⁿ⁼⁴³
ALT/TGP U/L	ns ⁿ⁼⁴³	ns ⁿ⁼⁴³	ns ⁿ⁼⁴³
Leucócitos x10 ³ /mm ³	ns ⁿ⁼⁴⁹	ns ⁿ⁼⁴⁹	<i>r</i> 0,351 ⁿ⁼⁴⁹ * <i>P</i> 0,01
Monócitos %	ns ⁿ⁼⁴⁵	ns ⁿ⁼⁴⁵	ns ⁿ⁼⁴⁵
Linfócitos %	<i>r</i> (-)0,572 ⁿ⁼⁴⁴ *** <i>P</i> < 0,0001	ns ⁿ⁼⁴⁴	ns ⁿ⁼⁴⁴

Foi realizada a correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism versão 5. Correlação direta é vista quando o valor de *r* é positivo e correlação inversa quando o *r* é negativo. Valores de *P* ("two-tailed") foram considerados significativos quando: *P* < 0,05. Refere-se ns à correlação não significativa e *n* representa o número de pares analisados.

6. DISCUSSÃO

A patogenia do dengue é complexa, multifatorial e ainda não está completamente compreendida. Dentre os diversos fatores, a desregulação das respostas imunológicas inata e adquirida ativadas na tentativa de eliminar os DENV, tem sido considerada como um importante fator prognóstico e/ou indutor de gravidade da doença (Rothman 2011). A apoptose tem sido sugerido como um dos possíveis mecanismos de modulação da carga viral e da resposta imune contra os DENV (Mongkolsapaya, Dejnirattisai et al. 2003; Myint, Endy et al. 2006; Silveira, Meyer et al. 2011).

No presente trabalho, amostras de 107 pacientes foram coletadas sendo que destes, 72 pacientes tiveram infecção confirmada pelos DENV mediante diferentes técnicas virológicas. Os 72 pacientes foram classificados clinicamente de acordo com as normas atuais da OMS. No plasma de 67 casos foram dosados níveis circulantes das proteínas anti-apoptótica Survivina e das três pró-apoptóticas, TNF α , FasL e TRAIL. Os resultados destas dosagens foram comparados entre os grupos DSSA, DCSA e DG e entre as fases aguda e convalescente da doença. Além disso, as dosagens das proteínas foram correlacionadas com os dados laboratoriais dos pacientes.

Na confirmação dos 67 casos com febre e suspeita de infecção aguda de DENV o teste sorológico de detecção de IgM anti-dengue confirmara proporcionalmente mais pacientes com esta infecção viral. O método molecular (RT-PCR) foi mais sensível do que o isolamento viral na linhagem de células de mosquitos *Ae. albopictus* C6/36. Observou-se semelhança nos percentuais de confirmação pela pesquisa do antígeno viral NS1 e isolamento dos DENV (**Tabela 5.1**). No geral, resultados similares têm sido observados em outros estudos no Brasil (Nogueira 2005; Guilarde, Turchi et al. 2008; Lima Mda, Nogueira et al. 2010) e em outros países endêmicos da dengue (Binh, Matheus et al. 2009; Duong, Ly et al. 2011). Um destes trabalhos brasileiros demonstrou que de três kits comerciais de detecção de NS1 em soro, o mais sensível resultou ser o Dengue NS1 Ag STRIP (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) (Lima Mda, Nogueira et al. 2010) que foi utilizado em nosso trabalho. Por outro lado, na atualidade existem técnicas moleculares mais sensíveis para a detecção da infecção aguda pelos DENV como o RT-PCR em tempo real (Wang, Sung et al. 2002; Shu, Chang et al. 2003; Chien, Liao et al. 2006) que não foram utilizadas em nosso estudo, porém tem sido já usadas no Brasil (Dos Santos, Poloni et al. 2008; Conceicao, Da Poian et al. 2010).

De acordo com a nova classificação de dengue da OMS de 2009 (World Health Organization 2009), foram agrupados os pacientes confirmados de infecção pelos DENV em 35 casos de DSSA, 17 de DCSA e 15 de DG (**Tabela 5.2**). No entanto, se a classificação tradicional fosse utilizada o número de casos com gravidade seria apenas 5 casos com as formas mais graves da dengue (FHD/SCD) e os demais classificariam como DC. Deste modo, a recente classificação elevou três vezes a quantidade dos casos estudados com manifestações graves da dengue.

Discrepâncias similares entre estas duas classificações foram encontradas em um trabalho muito recente, financiado pelo TDR/OMS, realizado em vários países do sudeste asiático e latino-americanos (incluindo Brasil), porém nesse estudo anterior foram encontrados casos de FHD/SCD que não se incluíram no grupo de DG (Alexander, Balmaseda et al. 2011). A interpretação da diferença entre esse resultado prévio e nosso trabalho é limitada devido ao menor número de pacientes no presente estudo. Nesse mesmo sentido, outro trabalho internacional recente de grande importância indicou que a classificação nova da OMS permite um uso mais prático e fácil das normas para detectar casos de dengue com manifestações clínicas de gravidade (Barniol, Gaczkowski et al. 2011).

As formas graves são caracterizadas pela diminuição na contagem de plaquetas concomitantemente com o aumento do hematócrito (Srikiatkachorn 2009). A contagem de plaquetas foi menor nos casos graves e a presença de leucopenia foi detectada em todos os grupos estudados. A plaquetopenia e leucopenia são achados frequentes nos casos de dengue (Kalayanarooj, Vaughn et al. 1997; Khan, Siddiqui et al. 2007; Binh, Matheus et al. 2009; Srikiatkachorn and Green 2010) e a plaquetopenia tem sido usada como marcador de gravidade da dengue em alguns estudos (Wichmann, Gascon et al. 2007; Ramos, Arguello et al. 2008; Srikiatkachorn and Green 2010).

Neste estudo, somente os pacientes graves (DG) apresentaram extravasamento plasmático (54%) sem, contudo, apresentar aumento significativo da média do hematócrito (**Tabela 5.1**), provavelmente pelo fato das amostras de sangue terem sido obtidas em diferentes dias da doença, ou então pela falta de dados quanto à variação do percentual do hematócrito em diferentes dias da doença ou, por serem pacientes graves, nos quais a estratégia clínica foi a hidratação rápida, o que não permitiu a visualização das alterações no hematócrito (World Health Organization 2009).

A disfunção hepática é uma das características da infecção pelos DENV, normalmente associada à hepatomegalia, elevação branda a moderada das

transaminases hepáticas e menos comumente, icterícia e insuficiência hepática (Kuo, Tai et al. 1992; Nguyen, Nguyen et al. 1997). Dados da literatura demonstram que biópsias do tecido hepático provenientes de cinco casos fatais de SCD apresentaram esteatose microvesicular, necrose hepatocelular, destruição de células de Kupffer e infiltrado inflamatório no trato hepatoportal (Huerre, Lan et al. 2001). Antígenos do DENV, ARN viral e isolamento do DENV no tecido hepático foram demonstrados em alguns casos fatais de dengue (Rosen, Khin et al. 1989; Rosen, Drouet et al. 1999; Huerre, Lan et al. 2001).

Uma vez que amostras de biópsias são contraindicadas nos casos da dengue, a avaliação das enzimas hepáticas no plasma é o parâmetro mais acessível para se avaliar a função do órgão. Na nossa coorte de pacientes, um caso grave evoluiu para o óbito. Esta paciente apresentou hepatomegalia e níveis plasmáticos muito elevados de AST 20618 U/L e de ALT 5598 U/L. A nova classificação de dengue da OMS tem adicionado aos requisitos de DG a elevação das enzimas hepáticas maiores do que 1000 U/L (World Health Organization 2009). De maneira geral, observamos uma elevação dos níveis plasmáticos destas transaminases nos pacientes com maior gravidade (DG) em comparação aos pacientes não graves (DSSA e DCSA), corroborando estudos anteriores (Kalayanarooj, Vaughn et al. 1997; Khan, Siddiqui et al. 2007; Wichmann, Gascon et al. 2007).

Nossos dados são reforçados pela literatura, uma vez que demonstramos uma correlação negativa entre a contagem de plaquetas e os níveis plasmáticos das enzimas hepáticas AST e ALT. Ambas as transaminases foram correlacionadas positivamente com o percentual de linfócitos, indicando que variações na frequência dessas populações celulares estariam relacionadas à gravidade da doença (Mongkolsapaya, Dejvirattisai et al. 2003; Azeredo, Zagne et al. 2006; Avirutnan, Hauhart et al. 2011).

No Brasil co-circulam os sorotipos DENV-1, 2 e 3 e no ano 2010, o DENV-4 reemergiu e foi confirmado nos estados de Roraima, na área norte do Brasil (Temporao, Penna et al. 2011), e mais recentemente no RJ (Nogueira and Eppinghaus 2011). Todavia, em 2011 no Brasil ocorreu predomínio dos isolamentos para o sorotipo DENV-1 (86,1%) (Secretaria de Vigilância em Saúde 2011). DENV-1 e DENV-2 foram detectados em nossos casos estudados. No único caso fatal de nosso estudo foi identificado o DENV-2 e este sorotipo foi detectado anteriormente no sistema nervoso central de um óbito brasileiro (Nogueira, Filippis et al. 2002). Neste sentido, foi observada maior viremia e antigenemia do NS1 nas infecções pelo DENV-2 do que

DENV-1 no Vietnam (Chau, Quyen et al. 2008; Duyen, Ngoc et al. 2011) e outro estudo tailandês sugeriu que infecções pelos sorotipos 2 e 3 dos DENV apresentavam duas vezes mais probabilidade de desenvolver FHD do que com DENV-4 (Fried, Gibbons et al. 2010).

Infecções sequenciais por diferentes sorotipos virais constituem fator de risco no agravamento da doença, frequentemente associadas ao fenômeno da ADE. A ADE é caracterizada pela existência de anticorpos não neutralizantes e de reatividade cruzada que facilitariam a entrada do vírus via receptores Fc nas células-alvo, como monócitos, resultando em aumento da replicação e da carga antigênica viral (Halstead and O'Rourke 1977). Por outro lado, monócitos infectados pelo DENV aumentam a expressão de moléculas de ativação (Durbin, Vargas et al. 2008), produção de citocinas e quimiocinas (Bosch, Xhaja et al. 2002) e moléculas com propriedades antivirais, como o óxido nítrico (Neves-Souza, Azeredo et al. 2005), fundamentais para o controle da infecção. Além disso, o agravamento da doença nas infecções secundárias poderia se dar por uma ativação intensa de células T com alta afinidade pelo sorotipo prévio, acompanhada por apoptose massiva das células T com afinidade pelo sorotipo infectante, e geração de células T de baixa afinidade pelo sorotipo infectante que levaria, desta forma, a uma diminuição do controle na eliminação viral (Mongkolsapaya, Dejnirattisai et al. 2003). Ainda, as células T de baixa afinidade foram caracterizadas pela diminuição de sua capacidade de degranulação, e por serem potentes produtoras de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , que atuam diretamente sobre o endotélio vascular (Mongkolsapaya, Dejnirattisai et al. 2003; Mongkolsapaya, Duangchinda et al. 2006).

Considerando a situação epidemiológica do país, procedemos então à classificação da resposta imune dos pacientes. Em nossa casuística, em 86,1% dos pacientes foram detectados altos níveis de anticorpos IgG anti-DENV, sendo por tanto, considerados como infecção secundária. De fato, altos percentuais de infecção secundária têm sido relatados em estudos realizados no país, como em Goiânia em 2005 onde foram relatados 65% dos casos (Guilarde, Turchi et al. 2008) e no RJ esses percentuais variam de 44% na epidemia de 2002 (Nogueira 2005) e de 50 a 77% em 2008 (Honorio, Nogueira et al. 2009). Outro estudo recente observou 24-41,6 % de soroprevalência da infecção pelos DENV no ano 2006 em moradores da cidade brasileira de Recife e sugeriu a transição de reemergência para a hiperendemicidade que ocorre nesta cidade é também no Brasil (Rodriguez-Barraquer, Cordeiro et al.

2011). Na nossa área estudada, a alta proporção de casos infectados de forma sequencial pode estar associada à alta transmissibilidade dos DENV e poderia relacionar-se a um possível agravamento da doença pelo aumento da frequência de infecções secundárias.

Somente um trabalho recente em crianças da Nicarágua avaliou a nova classificação de dengue da OMS e também determinou a infecção secundária pelos DENV (58.9%), contudo não foi realizada uma correlação entre a classificação clínica com o “status” imune (Narvaez, Gutierrez et al. 2011). Portanto, não está definido exatamente ainda se o status imune aos DENV tem alguma relação com os sinais de alerta e manifestações graves da classificação recente de dengue.

O TNF- α é uma das citocinas mais bem estudadas na infecção pelo dengue, embora o impacto de sua produção na imunopatogênese da doença ainda seja bastante discutido. Em relação ao envolvimento do TNF- α na regulação da apoptose durante a infecção pelo dengue, estudo anterior demonstrou que o TNF- α foi capaz de ativar e induzir apoptose em uma linhagem celular humana de endotélio microvascular dermal, contribuindo desta forma para o extravasamento plasmático característico dos casos de FHD/SCD (Cardier, Marino et al. 2005). Entretanto, a adição de TNF- α em culturas da linhagem de células dendríticas foliculares HK induziu proliferação destas células (Park, Park et al. 2003).

Corroborando com este último, mais recentemente Silveira e colaboradores (Silveira, Meyer et al. 2011) propuseram comparar duas cepas de DENV-3, a cepa de DENV-3/290 de um caso não fatal e a cepa DENV-3/5532 de um caso fatal. O caso fatal apresentara a forma grave e visceral enquanto que o outro, a forma clássica da dengue. Desta forma, os autores observaram que a cepa do caso fatal DENV-3/5532 era capaz de induzir maior replicação viral e apoptose nas células dendríticas, assim como produção aumentada de TNF- α . O bloqueio do TNF- α produzido pelas células dendríticas infectadas aumentava a apoptose destas células, em contrapartida, o estímulo com TNF- α diminuía a morte celular. Assim, os autores sugerem que uma replicação viral ativa e fatores/mecanismos “bystander” desconhecidos seriam responsáveis pela morte celular das células dendríticas e ainda, sugerem um papel protetor do TNF- α (Silveira, Meyer et al. 2011).

Estudo em pacientes demonstrou uma alta susceptibilidade a apoptose das células mononucleares do sangue de pacientes com a forma FHD comparados aos pacientes com a forma mais branda da dengue. Além disso, a apoptose observada nos pacientes

FHD foi desencadeada por mecanismos dependentes e independentes de caspases e ainda estava associada à alta produção das citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β e a alta carga viral (Jaiyen, Masrinoul et al. 2009).

A associação de TNF- α com a gravidade da dengue é discutida, uma vez que alguns estudos relacionam o aumento da circulação de TNF- α com casos de FHD e SCD (Hober, Poli et al. 1993; Braga, Moura et al. 2001; Levy, Valero et al. 2010) enquanto outros não encontraram a mesma associação (Laur, Murgue et al. 1998; Bozza, Cruz et al. 2008; Hoang, Lynn et al. 2010; Priyadarshini, Gadia et al. 2010). Nosso estudo detectou níveis elevados de TNF- α nos casos de DSSA, uma tendência ao aumento no grupo DCSA, mas nenhuma diferença no grupo DG comparado aos controles saudáveis. Também não encontramos correlações significativas entre os níveis plasmáticos de TNF- α na nossa coorte de pacientes com quaisquer uns dos parâmetros laboratoriais avaliados.

A controvérsia entre os dados publicados na literatura, incluindo os nossos, poderiam ser entendidos por diversas hipóteses. Autores têm demonstrado a influência do polimorfismo genético de citocinas na produção das mesmas. Por exemplo, o alelo TNF-308A associado a altos níveis de produção de TNF- α foi observado nos pacientes com manifestações hemorrágicas (Fernandez-Mestre, Gendzekhadze et al. 2004; Perez, Sierra et al. 2010) e ainda o genótipo TNF- α (-308) GC e TNF-238^a (Vejbaesya, Luangtrakool et al. 2009), que predispõe o indivíduo a maior produção de TNF- α , foram detectados em pacientes FHD durante infecção secundária.

Outro aspecto a ser discutido é a influência do sorotipo viral na produção do TNF- α . Neste caso, níveis aumentados de TNF- α e outras citocinas de perfil Th1 foram detectados em cultura da linhagem de células endoteliais pulmonares infectadas pelo DENV-2 comparado às infectadas pelo DENV-3 (Azizan, Sweat et al. 2006). Por fim, a cinética de detecção do TNF- α no curso da infecção também parece influenciar. Estudo em crianças infectadas pelo dengue demonstrou que TNF- α foi visto no início da infecção e que diminuiu entre os dias 6 e 10 (Hober, Poli et al. 1993).

A via pró-apoptótica induzida pelo Fas/FasL foi primeiramente demonstrada no modelo da dengue por Gagnon e colaboradores em 1999 (Gagnon, Ennis et al. 1999). Os autores demonstraram que clones de linfócitos T CD4+ citotóxicos específicos ao DENV aumentavam a expressão de ARNm para o FasL e eram capazes de matar células-alvo. A importância da via Fas/FasL neste modelo foi confirmado após bloqueio da via mediada pelo FasL, levando à inibição da lise celular (Gagnon, Ennis et al. 1999).

De forma interessante, outro trabalho demonstrou a capacidade de interação física da proteína do capsídeo do DENV com a proteína humana Daxx, ou proteína associada ao domínio de morte do Fas. Essa interação levou ao desencadeamento da apoptose induzida por anticorpos anti-Fas em hepatócitos infectados pelo DENV (Limjindaporn, Netsawang et al. 2007).

Considerando o impacto da alteração da permeabilidade endotelial na patogênese da dengue, um estudo avaliou o envolvimento do sistema Fas/FasL na apoptose das células endoteliais. Os autores demonstraram que células endoteliais da veia umbilical humana infectadas pelo DENV-2 aumentavam a expressão de Fas tanto em nível do ARNm como da proteína. No caso da proteína FasL não ocorreu modificação na sua expressão, mas o ARNm foi aumentado, sugerindo que estas células seriam aptas a secretar FasL. Assim, a via Fas/FasL participaria da apoptose das células endoteliais durante a infecção pelo DENV (Liao, Xu et al. 2010).

Em modelo de infecção *in vitro* de monócitos humanos infectados pelo DENV-2 desenvolvido no LIV do IOC, se demonstrou diferentes fenômenos ocorrendo simultaneamente: aumento da proporção de monócitos infectados associados ao aumento da expressão de Fas e ao aumento da expressão de fosfatidilserina na superfície dessas células. Assim, a infecção pelo DENV estaria ativando vias de indução de apoptose, como a do Fas, influenciando na imunopatogênese da doença (Torrentes-Carvalho, Azeredo et al. 2009).

Em pacientes, linfócitos T CD8+ apoptóticos foram mais frequentes em crianças tailandesas com a forma FHD na fase de defervescência comparado aquelas com doença branda. Esses resultados foram associados ao aumento plasmático de Fas no grupo FHD. Desta forma, os autores sugerem que a apoptose na infecção natural estaria envolvida com a modulação tanto das imunidades inata como da adquirida (Myint, Endy et al. 2006).

Polimorfismos genéticos dos promotores de FasL ou Fas podem interferir na expressão dessas proteínas, influenciando na susceptibilidade a apoptose mediada por este sistema nos linfócitos T CD4+ de pacientes HIV positivos (Nasi, Pinti et al. 2005) e nos casos infectados pelo vírus de hepatite B (Jung, Kim et al. 2007). Mais recentemente, foi demonstrado na infecção pelo vírus herpes simplex 2 (Chatterjee, Dandara et al. 2010). Deste modo, o polimorfismo genético do sistema Fas/FasL poderia estar relacionado com nossos resultados.

No presente estudo, dosamos o ligante do receptor Fas que se une ao seu receptor específico Fas na membrana celular como parte da via extrínseca da ativação de apoptose (Hotchkiss, Strasser et al. 2009). Estudo tailandês prévio detectou o receptor Fas/CD95 circulante, que é a forma solúvel do receptor, em crianças com dengue (Myint, Endy et al. 2006). Deste modo, nosso estudo aborda pela primeira vez o ligante do Fas, o FasL, na doença causada pelos DENV e sua possível associação com a patogênese da dengue e especialmente da dengue fatal.

Na nossa coorte, apenas pacientes com a forma DSSA apresentaram níveis mais aumentados de FasL comparado aos controles saudáveis e pacientes graves (DG). Além disso, observamos correlação positiva entre FasL e a contagem de plaquetas sugerindo um papel não patológico. Entretanto, o único caso que evoluiu a óbito apresentou o maior nível de FasL detectado, 792,23 pg/mL, diferente das outras proteínas.

Em relação ao envolvimento do TRAIL na infecção e apoptose pelos DENV, existem atualmente poucos estudos, embora promissores, quanto à participação dessa molécula na imunopatogênese da doença. Estudo preliminar em linhagem de célula hepática HepG2 infectada pelo DENV-2 indicou aumento de apoptose nesta célula, com aumento de expressão de TRAIL na sua superfície. Ainda, o bloqueio de TRAIL inibiu a apoptose induzida pelo DENV-2 (Matsuda, Almasan et al. 2005). Da mesma forma que o estudo anterior, o impacto dos DENV na função hepática vem sendo amplamente investigado, uma vez que hepatomegalia, alteração dos níveis de enzimas hepáticas e até mesmo necrose hepatocelular são sinais relativamente frequentes e associados à progressão da doença (Seneviratne, Malavige et al. 2006). Neste contexto, a expressão de TRAIL foi aumentada em hepatócitos primários humanos infectados pelo DENV-2 (Suksanpaisan, Cabrera-Hernandez et al. 2007).

Além da apoptose, estudos mais recentes vem demonstrando o envolvimento do TRAIL na resposta anti-DENV, independente da indução de mecanismos pró-apoptóticos. Assim, autores demonstraram que a infecção pelo DENV aumenta a expressão de TRAIL em células dendríticas, monócitos e linfócitos B e em células endoteliais da veia umbilical humana. A expressão de TRAIL foi condicionada a indução da via de sinalização dos IFN de tipo I e II e ainda, o bloqueio de TRAIL aumentou o ARN viral (Warke, Martin et al. 2008).

Níveis séricos de TRAIL foram detectados previamente em pacientes na fase febril, mas esses níveis decresceram significativamente na fase de defervescência.

Além disso, pacientes com infecção primária tiveram altos níveis de TRAIL comparados aqueles com infecção secundária durante o período febril (Becerra, Warke et al. 2009). Em nossa coorte, pacientes caracterizados por DSSA apresentaram níveis mais aumentados, embora com alta variabilidade de produção da proteína, comparado aos controles saudáveis e pacientes graves (DG). Além disso, observamos correlação positiva entre TRAIL e a contagem de plaquetas e o percentual de hematócrito, indicando que TRAIL teria papel imunoprotetor. Por outro lado, um dado interessante foi a correlação inversa entre TRAIL e o percentual de linfócitos. Fica o questionamento se TRAIL estaria participando como receptor do mecanismo indutor de apoptose dos linfócitos periféricos como foi observado anteriormente em pacientes HIV (Cummins and Badley 2010), crianças com doença bronquial por vírus sincicial respiratório (Roe, Bloxham et al. 2004), indivíduos infectados pelo vírus do síndrome respiratório agudo severo (Law, Cheung et al. 2009) e pacientes com sarampo (Okada, Kobune et al. 2000).

Neste sentido, não podemos descartar que um mecanismo similar, indução da apoptose pelo TRAIL, possa causar a apoptose de monócitos da sangue periférico em pacientes com dengue.

Em relação ao TRAIL e TNF- α , nossos resultados poderiam ser avaliados à luz do sorotipo viral, como demonstrado no artigo de Liao e colaboradores em 2010 que sugeriram que DENV-2 poderia inibir a apoptose mediado pelo TRAIL em células endoteliais infectadas da veia umbilical humana (Liao, Xu et al. 2010).

Por outro lado, não é descartável que diferenças da expressão de TRAIL e seus receptores devido a polimorfismos genéticos possam ter alguma relação com os resultados obtidos. Estes polimorfismos têm sido observados na diferente resposta imune contra uma bactéria intracelular em um modelo animal (Malek and Lamont 2003).

Por fim, avaliamos a Survivina, uma proteína classicamente conhecida como inibidora da apoptose, mas que também regula a divisão celular (Altieri 2010), inclusive de linfócitos T periféricos (Dong, Mei et al. 2008). Survivina vem sendo extensivamente estudada, devido principalmente sua alta expressão em cânceres humanos, enquanto que em tecidos normais de adultos sua expressão é bem menos importante (Dallaglio, Marconi et al. 2012).

Diferente das demais proteínas avaliadas neste estudo, Survivina diminuiu de forma significativa nos pacientes DCSA comparada aos indivíduos saudáveis e pacientes graves (DG). Um dado interessante foi a correlação positiva entre Survivina e

o percentual de leucócitos nos pacientes. De acordo com estudos que vem abordando o impacto da expressão extracelular da survivina em leucócitos, survivina mediará a ativação das cadeias alfa das β -integrinas e portanto, participará ativamente da migração das células inflamatórias (Mera, Magnusson et al. 2008)

Os níveis plasmáticos das moléculas FasL, TRAIL e Survivina foram dosados na fase convalescente, observando-se que os níveis da proteína FasL e TRAIL diminuiram aproximadamente na metade dos casos estudados. No entanto, o nível de Survivina só diminuiu em 28% dos pacientes estudados. Estas diferenças poderiam estar relacionadas aos diferentes dias da fase de convalescência que variaram de 17 a 44 dias após infecção.

Desta forma, o envolvimento da apoptose na imunopatogênese da infecção vem sendo bastante discutida. Estudo anterior do grupo de LIV do IOC demonstrou maior susceptibilidade a apoptose dos linfócitos T CD8+ de pacientes infectados pelo DENV, em parte devido uma menor expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Azeredo, Zagne et al. 2006). Em seguida, Limonta e colaboradores em 2007 (Limonta, Capo et al. 2007) demonstraram a presença de leucócitos apoptóticos no sangue e diferentes células apoptóticas em vários tecidos, incluindo cérebro, intestino, pulmão de casos fatais de FHD/SCD.

A avaliação do potencial pró- ou anti-apoptótico das proteínas avaliadas neste estudo precisa ser ainda investigada. Nossos resultados são ainda preliminares e todas as hipóteses formuladas serão futuramente investigadas. Assim, o TRAIL solúvel seria indicador de bom prognóstico da doença, uma vez que estava aumentado nos casos brandos e correlacionado positivamente com a contagem de plaquetas. No caso específico do TRAIL, a correlação inversa com a contagem dos linfócitos poderia sugerir maior susceptibilidade dessas células à morte. No caso da Survivina, a diminuição nos casos de DCSA poderia indicar uma menor proteção às células desse grupo de pacientes. Por outro lado, Survivina poderia estar participando da proliferação e/ou migração dos leucócitos, já que observamos correlação positiva entre Survivina e a contagem de leucócitos.

7. CONCLUSÕES

- O método diagnóstico que detecta IgM anti-dengue permitiu confirmar um maior número de casos suspeitos da dengue.
- A frequência de infecção secundária pelos DENV foi maior comparado à infecção primária nesta casuística devida possivelmente à elevada transmissão viral na área estudada.
- A nova classificação clínica da dengue da OMS (2009) permitiu agrupar três vezes mais pacientes com manifestações clínicas graves da dengue em relação à classificação tradicional (1994).
- Não encontramos correlações importantes entre os níveis de TNF- α com parâmetros associados à gravidade da dengue provavelmente a causa de diferentes fatores virais e do hospedeiro.
- Os níveis mais aumentados de TRAIL plasmático encontrados nos pacientes com a forma clínica branda da dengue corroboram as correlações diretas desta molécula com plaquetas e demonstram um possível envolvimento com um bom prognóstico da doença.
- A correlação inversa do TRAIL com o percentual de linfócitos periféricos mostra por primeira vez que poderia participar como indutor de apoptose linfocitária na dengue.
- Apesar que o único caso que evoluiu a óbito apresentou o maior nível de FasL, os pacientes com a forma DSSA apresentaram níveis mais aumentados de FasL e além disso com correlação positiva com a contagem de plaquetas indicando que FasL poderia ter um papel imunoregulador na dengue.
- Os níveis de Survivina foram correlacionados positivamente com o percentual de leucócitos, sugerindo maior proteção das células periféricas a apoptose e/ou diminuição da proliferação e/ou migração celular nos pacientes com dengue.
- Este é o primeiro estudo de dosagem de FasL e Survivina circulantes em pacientes infectados pelos DENV.
- Este é o único trabalho que tem avaliado mediadores circulantes apoptóticos segundo a nova classificação clínica da dengue da OMS (2009).

8. Perspectivas

Neste trabalho foram encontrados pela primeira vez diferenças estatísticas entre os níveis de proteínas reguladoras da apoptose TNF- α , FasL, TRAIL e survivina em pacientes infectados pelo dengue, que foram classificados clinicamente de acordo com a nova norma da OMS de 2009. O papel potencial destas proteínas reguladoras da apoptose como marcadores de gravidade da dengue precisam ser ainda esclarecidos, por exemplo, observando-se a cinética de produção dessas moléculas em diferentes dias de doença.

Além disso, temos como perspectiva correlacionar a quantificação dessas moléculas associadas a apoptose com a frequência de comorbidades, sorotipo viral infectante, viremia e status imune. Dessa forma, procurar discernir como fatores virais e do hospedeiro estariam interferindo na regulação da apoptose e evolução clínica da dengue.

Desta forma, estudos adicionais deverão ser realizados para avaliar mais profundamente a complexa regulação dos mecanismos anti e pró-apoptóticos e a importância deles nas diferentes fases clínicas da doença.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (2011). *Cellular and molecular immunology*, Elsevier Saunders
- Alcon, S., A. Talarmin, et al. (2002). "Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections." *J Clin Microbiol* **40**(2): 376-381.
- Alexander, N., A. Balmaseda, et al. (2011). "Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries." *Trop Med Int Health*.
- Altieri, D. C. (2010). "Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms." *Biochem J* **430**(2): 199-205.
- Anders, K. L., N. M. Nguyet, et al. (2011). "Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam." *Am J Trop Med Hyg* **84**(1): 127-134.
- Anderson, R., S. Wang, et al. (1997). "Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes." *J Virol* **71**(6): 4226-4232.
- Araujo, F. M., R. S. Brilhante, et al. (2011). "Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay." *J Virol Methods* **177**(1): 128-131.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." *Nat Rev Cancer* **2**(6): 420-430.
- Avirutnan, P., A. Fuchs, et al. (2010). "Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1." *J Exp Med* **207**(4): 793-806.
- Avirutnan, P., R. E. Hauhart, et al. (2011). "Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation." *J Immunol* **187**(1): 424-433.
- Avirutnan, P., P. Malasit, et al. (1998). "Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis." *J Immunol* **161**(11): 6338-6346.
- Avirutnan, P., N. Punyadee, et al. (2006). "Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: a Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement." *J Infect Dis* **193**(8): 1078-1088.
- Azeredo, E. L., S. M. Zagne, et al. (2006). "Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**(4): 437-449.
- Azizan, A., J. Sweat, et al. (2006). "Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus." *J Virol Methods* **138**(1-2): 211-217.
- Balmaseda, A., S. N. Hammond, et al. (2005). "Assessment of the World Health Organization Scheme for Classification of Dengue Severity in Nicaragua." *Am J Trop Med Hyg* **73**(6): 1059-1062.
- Balsitis, S. J., K. L. Williams, et al. (2010). "Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by fc modification." *PLoS Pathog* **6**(2): e1000790.
- Bandyopadhyay, S., L. C. Lum, et al. (2006). "Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever." *Trop Med Int Health* **11**(8): 1238-1255.
- Barniol, J., R. Gaczkowski, et al. (2011). "Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries." *BMC Infect Dis* **11**: 106.
- Basu, A. and U. C. Chaturvedi (2008). "Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses." *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**(3): 287-299.
- Basu, A., P. Jain, et al. (2008). "Dengue 2 virus inhibits in vitro megakaryocytic colony formation and induces apoptosis in thrombopoietin-inducible megakaryocytic differentiation from cord blood CD34+ cells." *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**(1): 46-51.
- Becerra, A., R. V. Warke, et al. (2009). "Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo." *J Med Virol* **81**(8): 1403-1411.
- Binh, P. T., S. Matheus, et al. (2009). "Early clinical and biological features of severe clinical manifestations of dengue in Vietnamese adults." *J Clin Virol* **45**(4): 276-280.
- Bosch, I., K. Khaja, et al. (2002). "Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge." *J Virol* **76**(11): 5588-5597.
- Bozza, F. A., O. G. Cruz, et al. (2008). "Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity." *BMC Infect Dis* **8**: 86.
- Braga, E. L., P. Moura, et al. (2001). "Detection of circulating tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**(2): 229-232.

- Bravo, J. R., M. G. Guzman, et al. (1987). "Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS)." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81**(5): 816-820.
- Brown, M. G., Y. Y. Huang, et al. (2009). "Dramatic caspase-dependent apoptosis in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells." *J Leukoc Biol* **85**(1): 71-80.
- Brunkard, J. M., J. L. Robles Lopez, et al. (2007). "Dengue fever seroprevalence and risk factors, Texas-Mexico border, 2004." *Emerg Infect Dis* **13**(10): 1477-1483.
- Cardier, J. E., E. Marino, et al. (2005). "Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue." *Cytokine* **30**(6): 359-365.
- Carey, D. E. (1971). "Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity?" *J Hist Med Allied Sci* **26**(3): 243-262.
- Carvalho de Macedo, F., A. F. Nicol, et al. (2006). "Histologic, Viral, and Molecular Correlates of Dengue Fever Infection of the Liver Using Highly Sensitive Immunohistochemistry." *Diagn Mol Pathol* **15**(4): 223-228.
- Castro-Jorge, L. A., P. R. Machado, et al. (2010). "Clinical evaluation of the NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of dengue virus infection in Brazil." *J Med Virol* **82**(8): 1400-1405.
- Catteau, A., O. Kalinina, et al. (2003). "Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM." *J Gen Virol* **84**(Pt 10): 2781-2793.
- Catteau, A., G. Roue, et al. (2003). "Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation." *Biochimie* **85**(8): 789-793.
- Chai, J., C. Du, et al. (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." *Nature* **406**(6798): 855-862.
- Chakravarti, A. and R. Kumaria (2006). "Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma; in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak." *Indian J Med Res* **123**(1): 25-30.
- Chatterjee, K., C. Dandara, et al. (2010). "A Fas gene polymorphism influences herpes simplex virus type 2 infection in South African women." *J Med Virol* **82**(12): 2082-2086.
- Chaturvedi, U. C., R. Agarwal, et al. (2000). "Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis." *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**(3): 183-188.
- Chau, T. N., N. T. Hieu, et al. (2009). "Dengue virus infections and maternal antibody decay in a prospective birth cohort study of Vietnamese infants." *J Infect Dis* **200**(12): 1893-1900.
- Chau, T. N., N. T. Quyen, et al. (2008). "Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity." *J Infect Dis* **198**(4): 516-524.
- Chen, H. C., F. M. Hofman, et al. (2007). "Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage." *J Virol* **81**(11): 5518-5526.
- Cheung, C. H., L. Cheng, et al. (2011). "Investigations of survivin: the past, present and future." *Front Biosci* **16**: 952-961.
- Chien, L. J., T. L. Liao, et al. (2006). "Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses." *J Clin Microbiol* **44**(4): 1295-1304.
- Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, et al. (2010). "The BCL-2 family reunion." *Mol Cell* **37**(3): 299-310.
- Coffey, L. L., E. Mertens, et al. (2009). "Human genetic determinants of dengue virus susceptibility." *Microbes Infect* **11**(2): 143-156.
- Conceicao, T. M., A. T. Da Poian, et al. (2010). "A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples." *J Virol Methods* **163**(1): 1-9.
- Courageot, M. P., A. Catteau, et al. (2003). "Mechanisms of dengue virus-induced cell death." *Adv Virus Res* **60**: 157-186.
- Couvelard, A., P. Marianneau, et al. (1999). "Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis." *Hum Pathol* **30**(9): 1106-1110.
- Creagh, E. M., H. Conroy, et al. (2003). "Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity." *Immunol Rev* **193**: 10-21.
- Cummings, D. A., S. Iamsirithaworn, et al. (2009). "The impact of the demographic transition on dengue in Thailand: insights from a statistical analysis and mathematical modeling." *PLoS Med* **6**(9): e1000139.
- Cummins, N. W. and A. D. Badley (2010). "Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010." *Cell Death Dis* **1**: e99.
- Dallaglio, K., A. Marconi, et al. (2012). "Survivin: a dual player in healthy and diseased skin." *J Invest Dermatol* **132**(1): 18-27.

- de Araujo, J. M., G. Bello, et al. (2009). "Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(3): 526-529.
- de Araujo, J. M., H. G. Schatzmayr, et al. (2009). "A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil." *J Virol Methods* **155**(1): 34-38.
- de Souza, R. P., I. M. Rocco, et al. (2011). "Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(12): e1439.
- Deen, J. L., E. Harris, et al. (2006). "The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment." *Lancet* **368**: 170-173.
- Despres, P., M. Flamand, et al. (1996). "Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells." *J Virol* **70**(6): 4090-4096.
- Despres, P., M. P. Frenkiel, et al. (1998). "Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses." *J Virol* **72**(1): 823-829.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-252.
- Devignot, S., C. Sapet, et al. (2010). "Genome-Wide Expression Profiling Deciphers Host Responses Altered during Dengue Shock Syndrome and Reveals the Role of Innate Immunity in Severe Dengue." *PLoS One* **5**(7): e11671.
- Dong, Y., Z. Z. Mei, et al. (2008). "[The molecular mechanism of survivin expression in activated human peripheral lymphocytes]." *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **24**(1): 16-19.
- dos Santos, F. B., F. B. Nogueira, et al. (2011). "First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil." *Virology* **422**(2): 387.
- Dos Santos, H. W., T. R. Poloni, et al. (2008). "A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection." *J Med Virol* **80**(8): 1426-1433.
- Duong, V., S. Ly, et al. (2011). "Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(7): e1244.
- Durbin, A. P., M. J. Vargas, et al. (2008). "Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever." *Virology* **376**(2): 429-435.
- Duyen, H. T., T. V. Ngoc, et al. (2011). "Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status." *J Infect Dis* **203**(9): 1292-1300.
- Effler, P. V. (2005). "Dengue Fever, hawaii, 2001-2002." *Emerg Infect Dis* **11**(5): 742-749.
- Fernandez-Mestre, M. T., K. Gendzekhadze, et al. (2004). "TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients." *Tissue Antigens* **64**(4): 469-472.
- Fernandez, R. J. and S. Vazquez (1990). "Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM)." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **85**(3): 347-351.
- Figueiredo, M. A., L. C. Rodrigues, et al. (2010). "Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: results of a case control study." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(6): e699.
- Friebe, P., J. Pena, et al. (2012). "Composition of the sequence downstream of the dengue virus 5' cyclization sequence (dCS) affects viral RNA replication." *Virology* **422**(2): 346-356.
- Fried, J. R., R. V. Gibbons, et al. (2010). "Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic Fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(3): e617.
- Gagnon, S. J., F. A. Ennis, et al. (1999). "Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones." *J Virol* **73**(5): 3623-3629.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* **19**(1): 107-120.
- Gamble, J., D. Bethell, et al. (2000). "Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock?" *Clin Sci (Lond)* **98**(2): 211-216.
- Gonzalez, D., D. Limonta, et al. (2009). "Dual infection with dengue virus 3 and human immunodeficiency virus 1 in Havana, Cuba." *J Infect Dev Ctries* **3**(4): 318-320.
- Gubler, D. J. (1998). "Dengue and dengue hemorrhagic fever." *Clin Microbiol Rev* **11**(3): 480-496.
- Gubler, D. J., G. Kuno, et al. (1984). "Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses." *Am J Trop Med Hyg* **33**(1): 158-165.
- Guilarde, A. O., M. D. Turchi, et al. (2008). "Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response." *J Infect Dis* **197**(6): 817-824.
- Guy, B., B. Barrere, et al. (2011). "From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine." *Vaccine* **29**(42): 7229-7241.

- Guzman, M. G., M. Alvarez, et al. (1999). "Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997." *Int J Infect Dis* **3**(3): 130-135.
- Guzman, M. G., S. B. Halstead, et al. (2010). "Dengue: a continuing global threat." *Nat Rev Microbiol* **8**(12 Suppl): S7-S16.
- Guzman, M. G. and G. Kouri (2002). "Dengue: an update." *Lancet Infect Dis* **2**(1): 33-42.
- Guzman, M. G., G. Kouri, et al. (2002). "Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections." *Int J Infect Dis* **6**(2): 118-124.
- Guzman, M. G., G. Kouri, et al. (2000). "Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997." *Am J Epidemiol* **152**(9): 793-799.
- Guzman, M. G., G. P. Kouri, et al. (1990). "Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study." *Am J Trop Med Hyg* **42**(2): 179-184.
- Ha, T. T., N. T. Huy, et al. (2011). "Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection." *PLoS One* **6**(10): e25969.
- Hall, W. C., T. P. Crowell, et al. (1991). "Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis." *Am J Trop Med Hyg* **45**(4): 408-417.
- Halstead, S. B. (2006). "Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ?" *Rev Panam Salud Publica* **20**(6): 407-415.
- Halstead, S. B. and E. J. O'Rourke (1977). "Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes." *Nature* **265**(5596): 739-741.
- Halstead, S. B. and E. J. O'Rourke (1977). "Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody." *J Exp Med* **146**(1): 201-217.
- Halstead, S. B., S. Rojanasuphot, et al. (1983). "Original antigenic sin in dengue." *Am J Trop Med Hyg* **32**(1): 154-156.
- Halstead, S. B., T. G. Streit, et al. (2001). "Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission." *Am J Trop Med Hyg* **65**(3): 180-183.
- Hammon, W. M., A. Rudnick, et al. (1960). "New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand." *Trans Assoc Am Physicians* **73**: 140-155.
- Hammon, W. M. and G. E. Sather (1964). "Virological Findings in the 1960 Hemorrhagic Fever Epidemic (Dengue) in Thailand." *Am J Trop Med Hyg* **13**: 629-641.
- Hang, V. T., N. M. Nguyen, et al. (2009). "Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(1): e360.
- Harris, E., T. G. Roberts, et al. (1998). "Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR." *J Clin Microbiol* **36**(9): 2634-2639.
- Hatch, S., T. P. Endy, et al. (2011). "Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection." *J Infect Dis* **203**(9): 1282-1291.
- Hoang, L. T., D. J. Lynn, et al. (2010). "The early whole-blood transcriptional signature of dengue virus and features associated with progression to dengue shock syndrome in Vietnamese children and young adults." *J Virol* **84**(24): 12982-12994.
- Hober, D., L. Poli, et al. (1993). "Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients." *Am J Trop Med Hyg* **48**(3): 324-331.
- Honorio, N. A., R. M. Nogueira, et al. (2009). "Spatial evaluation and modeling of Dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(11): e545.
- Horvitz, H. R., S. Shaham, et al. (1994). "The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 377-385.
- Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009). "Cell death." *N Engl J Med* **361**(16): 1570-1583.
- Hotta, S. (1952). "Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus." *J Infect Dis* **90**(1): 1-9.
- Hrobowski, Y. M., R. F. Garry, et al. (2005). "Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity." *Virology* **2**(1): 49.
- Huerre, M. R., N. T. Lan, et al. (2001). "Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children." *Virchows Arch* **438**(2): 107-115.
- Huhtamo, E., S. Vuorinen, et al. (2006). "Fatal dengue virus infection in a Finnish traveler." *J Clin Virol* **37**(4): 323-326.
- Hunsperger, E. A., S. Yoksan, et al. (2009). "Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests." *Emerg Infect Dis* **15**(3): 436-440.
- Innis, B. L., A. Nisalak, et al. (1989). "An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate." *Am J Trop Med Hyg* **40**(4): 418-427.

- Jaiyen, Y., P. Masrinoul, et al. (2009). "Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness." *Microbiol Immunol* **53**(8): 442-450.
- Jan, J. T., B. H. Chen, et al. (2000). "Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved." *J Virol* **74**(18): 8680-8691.
- Jessie, K., M. Y. Fong, et al. (2004). "Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization." *J Infect Dis* **189**(8): 1411-1418.
- Jung, Y. J., Y. J. Kim, et al. (2007). "Putative association of Fas and FasL gene polymorphisms with clinical outcomes of hepatitis B virus infection." *Intervirol* **50**(5): 369-376.
- Kabra, S. K., Y. Jain, et al. (1999). "Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**(3): 294-298.
- Kalayanarooj, S., D. W. Vaughn, et al. (1997). "Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness." *J Infect Dis* **176**(2): 313-321.
- Kalayanarooj, S., D. W. Vaughn, et al. (1997). "Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness." *J Infect Dis* **176**(2): 313-321.
- Kanakaratne, N., W. M. Wahala, et al. (2009). "Severe dengue epidemics in Sri Lanka, 2003-2006." *Emerg Infect Dis* **15**(2): 192-199.
- Kerr, J., A. Willie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.
- Khan, E., J. Siddiqui, et al. (2007). "Dengue outbreak in Karachi, Pakistan, 2006: experience at a tertiary care center." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**(11): 1114-1119.
- Kinney, R. M., C. Y. Huang, et al. (2005). "Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers." *J Virol* **79**(8): 5116-5128.
- Kliks, S. C., S. Nimmanitya, et al. (1988). "Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants." *Am J Trop Med Hyg* **38**(2): 411-419.
- Klomporn, P., M. Panyasrivanit, et al. (2011). "Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways." *Virology* **409**(2): 189-197.
- Kouri, G., P. Mas, et al. (1983). "Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent." *Bull Pan Am Health Organ* **17**(2): 126-132.
- Kuno, G., I. Gomez, et al. (1991). "An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections." *J Virol Methods* **33**(1-2): 101-113.
- Kuo, C. H., D. I. Tai, et al. (1992). "Liver biochemical tests and dengue fever." *Am J Trop Med Hyg* **47**(3): 265-270.
- Kyle, J. L. and E. Harris (2008). "Global spread and persistence of dengue." *Annu Rev Microbiol* **62**: 71-92.
- LaFleur, C., J. Granados, et al. (2002). "HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever." *Hum Immunol* **63**(11): 1039-1044.
- Lahiri, M., D. Fisher, et al. (2008). "Dengue mortality: reassessing the risks in transition countries." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**(10): 1011-1016.
- Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, et al. (1992). "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol* **30**(3): 545-551.
- Lateef, A., D. A. Fisher, et al. (2007). "Dengue and relative bradycardia." *Emerg Infect Dis* **13**(4): 650-651.
- Latour, D. R., A. Jekle, et al. (2010). "Biochemical characterization of the inhibition of the dengue virus RNA polymerase by beta-d-2'-ethynyl-7-deaza-adenosine triphosphate." *Antiviral Res* **87**(2): 213-222.
- Laur, F., B. Murgue, et al. (1998). "Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**(6): 654-656.
- Law, H. K., C. Y. Cheung, et al. (2009). "Toll-like receptors, chemokine receptors and death receptor ligands responses in SARS coronavirus infected human monocyte derived dendritic cells." *BMC Immunol* **10**: 35.
- Lazo, L., L. Gil, et al. (2010). "Nucleocapsid-like particles of dengue-2 virus enhance the immune response against a recombinant protein of dengue-4 virus." *Arch Virol* **155**(10): 1587-1595.
- Lee, I. K., J. W. Liu, et al. (2005). "Clinical characteristics and risk factors for concurrent bacteremia in adults with dengue hemorrhagic fever." *Am J Trop Med Hyg* **72**(2): 221-226.
- Lee, I. K., J. W. Liu, et al. (2008). "Clinical and laboratory characteristics and risk factors for fatality in elderly patients with dengue hemorrhagic fever." *Am J Trop Med Hyg* **79**(2): 149-153.
- Lee, Y. R., M. T. Liu, et al. (2006). "MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells." *J Gen Virol* **87**(12): 3623-3630.

- Levy, A., N. Valero, et al. (2010). "Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **104**(1): 16-23.
- Liao, H., J. Xu, et al. (2010). "FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells." *J Med Virol* **82**(8): 1392-1399.
- Libraty, D. H., T. P. Endy, et al. (2002). "Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections." *J Infect Dis* **185**(9): 1213-1221.
- Liew, K. J. and V. T. Chow (2004). "Differential display RT-PCR analysis of ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2 reveals messenger RNA expression profiles of multiple human genes involved in known and novel roles." *J Med Virol* **72**(4): 597-609.
- Lima Mda, R., R. M. Nogueira, et al. (2011). "A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(5): e1147.
- Lima Mda, R., R. M. Nogueira, et al. (2010). "Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(7): e738.
- Limjindaporn, T., J. Netsawang, et al. (2007). "Sensitization to Fas-mediated apoptosis by dengue virus capsid protein." *Biochem Biophys Res Commun* **362**(2): 334-339.
- Limonta, D., V. Capo, et al. (2007). "Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome." *J Clin Virol* **40**(1): 50-54.
- Limonta, D., D. Gonzalez, et al. (2009). "Fatal severe dengue and cell death in sickle cell disease during the 2001-2002 Havana dengue epidemic." *Int J Infect Dis* **13**(2): e77-78.
- Limonta, D., G. Torres, et al. (2008). "Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient." *Diab Vasc Dis Res* **5**(3): 213-214.
- Lin, C. F., H. Y. Lei, et al. (2003). "Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage." *J Med Virol* **69**(1): 82-90.
- Lin, C. F., H. Y. Lei, et al. (2002). "Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide." *J Immunol* **169**(2): 657-664.
- Lin, Y. S., C. F. Lin, et al. (2004). "Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide." *Curr Pharm Des* **10**(2): 213-221.
- Lindebach, B. D., H.-J. Thiel, et al. (2006). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology. D. M. Knippe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(7): 545-550.
- Loke, H., D. Bethell, et al. (2002). "Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes." *Am J Trop Med Hyg* **67**(1): 102-106.
- Long, H. T., M. L. Hibberd, et al. (2009). "Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection." *J Infect Dis* **199**(4): 537-546.
- Lowe, S. W., E. Cepero, et al. (2004). "Intrinsic tumour suppression." *Nature* **432**(7015): 307-315.
- Malasit, P. (1987). "Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **18**(3): 316-320.
- Malek, M. and S. J. Lamont (2003). "Association of INOS, TRAIL, TGF-beta2, TGF-beta3, and IgL genes with response to Salmonella enteritidis in poultry." *Genet Sel Evol* **35 Suppl 1**: S99-111.
- Mangada, M. M., T. P. Endy, et al. (2002). "Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren." *J Infect Dis* **185**(12): 1697-1703.
- Marianneau, P., A. Cardona, et al. (1997). "Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death." *J Virol* **71**(4): 3244-3249.
- Marsden, V. S. and A. Strasser (2003). "Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more." *Annu Rev Immunol* **21**: 71-105.
- Martin, S. J., D. M. Finucane, et al. (1996). "Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity." *J Biol Chem* **271**(46): 28753-28756.
- Martinez-Gutierrez, M., J. E. Castellanos, et al. (2011). "Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly." *Intervirology* **54**(4): 202-216.
- Matsuda, T., A. Almasan, et al. (2005). "Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *J Gen Virol* **86**(Pt 4): 1055-1065.
- McSherry, J. A. (1982). "Some medical aspects of the Darien scheme: was it dengue?" *Scott Med J* **27**(2): 183-184.
- Melino, G. (2001). "The Sirens' song." *Nature* **412**(6842): 23.

- Mendes Wda, S., R. Branco Mdos, et al. (2006). "Clinical case report: Dengue hemorrhagic fever in a patient with acquired immunodeficiency syndrome." *Am J Trop Med Hyg* **74**(5): 905-907.
- Mera, S., M. Magnusson, et al. (2008). "Extracellular survivin up-regulates adhesion molecules on the surface of leukocytes changing their reactivity pattern." *J Leukoc Biol* **83**(1): 149-155.
- Miagostovich, M. P., R. M. Nogueira, et al. (1999). "Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis." *J Clin Virol* **14**(3): 183-189.
- Miagostovich, M. P., R. G. Ramos, et al. (1997). "Retrospective study on dengue fatal cases." *Clin Neuropathol* **16**(4): 204-208.
- Midgley, C. M., M. Bajwa-Joseph, et al. (2011). "An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection." *J Virol* **85**(1): 410-421.
- Mongkolsapaya, J., W. Dejnirattisai, et al. (2003). "Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever." *Nat Med* **9**(7): 921-927.
- Mongkolsapaya, J., T. Duangchinda, et al. (2006). "T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal?" *J Immunol* **176**(6): 3821-3829.
- Morchang, A., U. Yasamut, et al. (2011). "Cell death gene expression profile: role of RIPK2 in dengue virus-mediated apoptosis." *Virus Res* **156**(1-2): 25-34.
- Morita, K., T. Maemoto, et al. (1994). "Rapid detection of virus genome from imported dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction." *J Med Virol* **44**(1): 54-58.
- Myint, K. S., T. P. Endy, et al. (2006). "Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis." *J Infect Dis* **194**(5): 600-607.
- Narvaez, F., G. Gutierrez, et al. (2011). "Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(11): e1397.
- Nascimento, E. J., U. Braga-Neto, et al. (2009). "Gene expression profiling during early acute febrile stage of dengue infection can predict the disease outcome." *PLoS One* **4**(11): e7892.
- Nasi, M., M. Pinti, et al. (2005). "Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and Fas ligand (CD178) influence the rise in CD4+ T cell count after antiretroviral therapy in drug-naive HIV-positive patients." *Immunogenetics* **57**(9): 628-635.
- Nasirudeen, A. M., L. Wang, et al. (2008). "Induction of p53-dependent and mitochondria-mediated cell death pathway by dengue virus infection of human and animal cells." *Microbes Infect* **10**(10-11): 1124-1132.
- Neves-Souza, P. C., E. L. Azeredo, et al. (2005). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection." *BMC Infect Dis* **5**: 64.
- Nguyen, T. H., T. L. Nguyen, et al. (2005). "Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever." *Am J Trop Med Hyg* **72**(4): 370-374.
- Nguyen, T. L., T. H. Nguyen, et al. (1997). "The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function." *Res Virol* **148**(4): 273-277.
- Nguyen, T. P., M. Kikuchi, et al. (2008). "Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome." *PLoS Negl Trop Dis* **2**(10): e304.
- Nobuchi, H. (1979). "The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia." *Kanpo Rinsho* **26**: 422-425.
- Nogueira, R. M. (2005). "Dengue virus type 3, Brazil, 2002." *Emerg Infect Dis* **11**(9): 1376-1381.
- Nogueira, R. M., J. M. de Araujo, et al. (2007). "Dengue viruses in Brazil, 1986-2006." *Rev Panam Salud Publica* **22**(5): 358-363.
- Nogueira, R. M. and A. L. Eppinghaus (2011). "Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106**(3): 255-256.
- Nogueira, R. M., A. M. Filippis, et al. (2002). "Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **33**(1): 68-71.
- Nogueira, R. M., M. P. Miagostovich, et al. (1992). "Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil." *Res Virol* **143**(6): 423-427.
- Nogueira, R. M., M. P. Miagostovich, et al. (1993). "Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes." *Epidemiol Infect* **111**(1): 163-170.
- Nogueira, R. M., M. P. Miagostovich, et al. (1995). "Dengue type 2 outbreak in the south of the state of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **37**(6): 507-510.
- Nogueira, R. M., H. G. Schatzmayr, et al. (1988). "Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **83**(2): 219-225.
- Ocazonez, R. E., R. Meneses, et al. (2010). "Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**(3): 304-309.

- OhAinle, M., A. Balmaseda, et al. (2011). "Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity." *Sci Transl Med* **3**: 114-128.
- Okada, H., F. Kobune, et al. (2000). "Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients." *Arch Virol* **145**(5): 905-920.
- Osanaï, C. H., A. P. Travassos da Rosa, et al. (1983). "[Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **25**(1): 53-54.
- PAHO (1994). "Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Washington, DC:PAHO."
- Palmer, D. R., P. Sun, et al. (2005). "Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells." *J Virol* **79**(4): 2432-2439.
- Paranjape, S. M. and E. Harris (2010). "Control of dengue virus translation and replication." *Curr Top Microbiol Immunol* **338**: 15-34.
- Park, S. M., H. Y. Park, et al. (2003). "Functional effects of TNF-alpha on a human follicular dendritic cell line: persistent NF-kappa B activation and sensitization for Fas-mediated apoptosis." *J Immunol* **171**(8): 3955-3962.
- Parsons, M. J. and D. R. Green (2010). "Mitochondria in cell death." *Essays Biochem* **47**: 99-114.
- Pereira, W. O. and G. P. Amarante-Mendes (2011). "Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal?" *Scand J Immunol* **73**(5): 401-407.
- Perez, A. B., G. Garcia, et al. (2004). "IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba." *J Med Virol* **73**(2): 230-234.
- Perez, A. B., B. Sierra, et al. (2010). "Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever." *Hum Immunol* **71**(11): 1135-1140.
- Phuong, C. X., N. T. Nhan, et al. (2004). "Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful?" *Am J Trop Med Hyg* **70**(2): 172-179.
- Poloni, T. R., A. S. Oliveira, et al. (2010). "Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR." *Virology* **7**(1): 22.
- Poon, I. K., M. D. Hulett, et al. (2010). "Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance." *Cell Death Differ* **17**(3): 381-397.
- Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." *J Biol Chem* **284**(33): 21777-21781.
- Priyadarshini, D., R. R. Gadia, et al. (2010). "Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study." *PLoS One* **5**(1): e8709.
- Rabaa, M. A., V. T. Ty Hang, et al. (2010). "Phylogeography of recently emerged DENV-2 in southern Viet Nam." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(7): e766.
- Ramos, M. M., D. F. Arguello, et al. (2008). "Epidemiological and clinical observations on patients with dengue in Puerto Rico: results from the first year of enhanced surveillance--June 2005-May 2006." *Am J Trop Med Hyg* **79**(1): 123-127.
- Ranganath, R. M. and N. R. Nagashree (2001). "Role of programmed cell death in development." *Int Rev Cytol* **202**: 159-242.
- Reis, S. R., L. M. Valente, et al. (2008). "Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2." *Int Immunopharmacol* **8**(3): 468-476.
- Ribeiro, C. F., V. G. Silami, et al. (2012). "Sickle-cell erythrocytes in the placentas of dengue-infected women." *Int J Infect Dis* **16**(1): e72.
- Rico Hesse, R., L. M. Harrison, et al. (1997). "Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas." *Virology* **230**(2): 244-251.
- Rigau-Perez, J. G. (1998). "The early use of break-bone fever (*Quebranta huesos*, 1771) and dengue (1801) in Spanish." *Am J Trop Med Hyg* **59**(2): 272-274.
- Rigau-Perez, J. G. and M. K. Laufer (2006). "Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals." *Clin Infect Dis* **42**(9): 1241-1246.
- Rodriguez-Barraquer, I., M. T. Cordeiro, et al. (2011). "From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(1): e935.
- Roe, M. F., D. M. Bloxham, et al. (2004). "Lymphocyte apoptosis in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis." *Clin Exp Immunol* **137**(1): 139-145.
- Roehrig, J. T., J. Hombach, et al. (2008). "Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses." *Viral Immunol* **21**(2): 123-132.

- Rosen, L., M. T. Drouet, et al. (1999). "Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection." *Am J Trop Med Hyg* **61**(5): 720-724.
- Rosen, L., M. M. Khin, et al. (1989). "Recovery of virus from the liver of children with fatal dengue: reflections on the pathogenesis of the disease and its possible analogy with that of yellow fever." *Res Virol* **140**(4): 351-360.
- Rothman, A. L. (2011). "Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms." *Nat Rev Immunol* **11**(8): 532-543.
- Sabin, A. B. (1950). "The dengue group of viruses and its family relationships." *Bacteriol Rev* **14**(3): 225-232.
- Sabin, A. B. and M. C. Schelesinger (1945). "Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice." *Science* **101**: 640-642.
- Sakuntabhai, A., C. Turbpaiboon, et al. (2005). "A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease." *Nat Genet* **37**(5): 507-513.
- San Martin, J. L., O. Brathwaite, et al. (2010). "The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality." *Am J Trop Med Hyg* **82**(1): 128-135.
- Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." *Cardiovasc Res* **45**(3): 528-537.
- Schatzmayr, H. G. (2000). "Dengue situation in Brazil by year 2000." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95** Suppl 1: 179-181.
- Schatzmayr, H. G. and M. Curie Cabral (2009). Epidemias de dengue e AIDS. *A virologia no estado de Rio de Janeiro: uma visão global*. Rio de Janeiro, FIOCRUZ: 37-44.
- Schatzmayr, H. G., R. M. Nogueira, et al. (1986). "An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **81**(2): 245-246.
- Schmidt, A. G., P. L. Yang, et al. (2010). "Peptide inhibitors of dengue-virus entry target a late-stage fusion intermediate." *PLoS Pathog* **6**(4): e1000851.
- Schmitz, J., J. Roehrig, et al. (2011). "Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development." *Vaccine* **29**(42): 7276-7284.
- Schul, W., W. Liu, et al. (2007). "A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs." *J Infect Dis* **195**(5): 665-674.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, M. d. S., Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue (2011). Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 391 de 2011
Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Edifício Sede, sala 148, Brasília - DF: 1-12.
- Seneviratne, S. L., G. N. Malavige, et al. (2006). "Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections." *Trans R Soc Trop Med Hyg*.
- Setiati, T. E., A. T. Mairuhu, et al. (2007). "Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system." *BMC Infect Dis* **7**(1): 22.
- Shafee, N. and S. AbuBakar (2003). "Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis." *J Gen Virol* **84**(Pt 8): 2191-2195.
- Shu, P. Y., S. F. Chang, et al. (2003). "Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus." *J Clin Microbiol* **41**(6): 2408-2416.
- Shu, P. Y., L. K. Chen, et al. (2003). "Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections." *Clin Diagn Lab Immunol* **10**(4): 622-630.
- Sierra, B., R. Alegre, et al. (2007). "HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: Advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection." *Hum Immunol* **68**(6): 531-540.
- Sierra, B., A. B. Perez, et al. (2010). "MCP-1 and MIP-1alpha expression in a model resembling early immune response to dengue." *Cytokine* **52**(3): 175-183.
- Sierra Bde, L., G. Kouri, et al. (2007). "Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever." *Arch Virol* **152**(3): 533-542.
- Silveira, G. F., F. Meyer, et al. (2011). "Dengue virus type 3 isolated from a fatal case with visceral complications induces enhanced proinflammatory responses and apoptosis of human dendritic cells." *J Virol* **85**(11): 5374-5383.
- Simmons, C. P., S. Popper, et al. (2007). "Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever." *J Infect Dis* **195**(8): 1097-1107.

- Simoes, L. R., G. M. Maciel, et al. (2011). "Antiviral activity of *Distictella elongata* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae), a potentially useful source of anti-dengue drugs from the state of Minas Gerais, Brazil." *Lett Appl Microbiol* **53**(6): 602-607.
- Siong, W. C., T. H. Ching, et al. (2008). "Dengue infections in HIV patients." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **39**(2): 260-265.
- Smit, J. M., B. Moesker, et al. (2011). "Flavivirus cell entry and membrane fusion." *Viruses* **3**(2): 160-171.
- Smith, C. E. (2005). "Dengue Risk among Visitors to Hawaii during an Outbreak." *Emerg Infect Dis* **11**(5): 750-756.
- Soundravally, R. and S. L. Hoti (2007). "Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism." *Hum Immunol* **68**(12): 973-979.
- Srikiatkachorn, A. (2009). "Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever." *Thromb Haemost* **102**(6): 1042-1049.
- Srikiatkachorn, A. and S. Green (2010). "Markers of dengue disease severity." *Curr Top Microbiol Immunol* **338**: 67-82.
- Srikiatkachorn, A., A. Krautrachue, et al. (2007). "Natural History of Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever: A Serial Ultrasonographic Study." *Pediatr Infect Dis J* **26**(4): 283-290.
- Srikiatkachorn, A., A. L. Rothman, et al. (2011). "Dengue--how best to classify it." *Clin Infect Dis* **53**(6): 563-567.
- Stapleton, J. T., S. Fong, et al. (2011). "The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae." *J Gen Virol* **92**(Pt 2): 233-246.
- Stein, D. A., S. T. Perry, et al. (2011). "Inhibition of dengue virus infections in cell cultures and in AG129 mice by a small interfering RNA targeting a highly conserved sequence." *J Virol* **85**(19): 10154-10166.
- Stiasny, K., R. Fritz, et al. (2011). "Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion." *Amino Acids* **41**(5): 1159-1163.
- Su, H. L., Y. L. Lin, et al. (2001). "The effect of human bcl-2 and bcl-X genes on dengue virus-induced apoptosis in cultured cells." *Virology* **282**(1): 141-153.
- Subramanya, S., S. S. Kim, et al. (2010). "Targeted delivery of small interfering RNA to human dendritic cells to suppress dengue virus infection and associated proinflammatory cytokine production." *J Virol* **84**(5): 2490-2501.
- Suksanpaisan, L., A. Cabrera-Hernandez, et al. (2007). "Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2." *J Med Virol* **79**(3): 300-307.
- Sukupolvi-Petty, S., S. K. Austin, et al. (2010). "Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2." *J Virol* **84**(18): 9227-9239.
- Takhampunya, R., S. Ubol, et al. (2006). "Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin." *J Gen Virol* **87**(Pt 7): 1947-1952.
- Teixeira, M. D., M. D. Costa, et al. (2005). "Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?" *Cad Saude Publica* **21**(5): 1307-1315.
- Teixeira, M. G., M. C. Costa, et al. (2008). "Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil." *Emerg Infect Dis* **14**(10): 1663.
- Teixeira, M. G., C. Costa Mda, et al. (2009). "Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil." *Cad Saude Publica* **25** Suppl 1: S7-18.
- Temporao, J. G., G. O. Penna, et al. (2011). "Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil." *Emerg Infect Dis* **17**(5): 938-940.
- Thongtan, T., S. Panyim, et al. (2004). "Apoptosis in dengue virus infected liver cell lines HepG2 and Hep3B." *J Med Virol* **72**(3): 436-444.
- Torrentes-Carvalho, A., E. L. Azeredo, et al. (2009). "Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(8): 1091-1099.
- Tricou, V., N. N. Minh, et al. (2010). "A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(8): e785.
- Tuiskunen, A., V. Monteil, et al. (2011). "Phenotypic and genotypic characterization of dengue virus isolates differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome." *Arch Virol* **156**(11): 2023-2032.
- Ubol, S., P. Masrinoul, et al. (2008). "Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever." *J Infect Dis* **197**(10): 1459-1467.
- Vasquez Ochoa, M., J. Garcia Cordero, et al. (2009). "A clinical isolate of dengue virus and its proteins induce apoptosis in HMEC-1 cells: a possible implication in pathogenesis." *Arch Virol* **154**(6): 919-928.

- Vazquez, S., N. Acosta, et al. (2009). "Immunoglobulin G antibody response in children and adults with acute dengue 3 infection." *J Virol Methods* **159**(1): 6-9.
- Vazquez, S., G. Hafner, et al. (2007). "Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections." *J Clin Virol* **39**(3): 194-198.
- Vejbagesya, S., P. Luangtrakool, et al. (2009). "TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais." *J Infect Dis* **199**(10): 1442-1448.
- Wang, H. L., K. H. Lin, et al. (2000). "Efficient diagnosis of dengue infections using patients' peripheral blood leukocytes and serum/plasma." *Intervirology* **43**(2): 107-111.
- Wang, W. K., T. L. Sung, et al. (2002). "Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay." *J Clin Microbiol* **40**(12): 4472-4478.
- Warke, R. V., K. J. Martin, et al. (2008). "TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus." *J Virol* **82**(1): 555-564.
- Whitby, K., T. C. Pierson, et al. (2005). "Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo." *J Virol* **79**(14): 8698-8706.
- Whitehorn, J. and C. P. Simmons (2011). "The pathogenesis of dengue." *Vaccine* **29**(42): 7221-7228.
- Wichmann, O., J. Gascon, et al. (2007). "Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators." *J Infect Dis* **195**(8): 1089-1096.
- Wichmann, O., S. Hongsiriwon, et al. (2004). "Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand." *Trop Med Int Health* **9**(9): 1022-1029.
- Wilder-Smith, A., E. E. Ooi, et al. (2010). "Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development." *Curr Infect Dis Rep* **12**(3): 157-164.
- Wilson, N. S., V. Dixit, et al. (2009). "Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks." *Nat Immunol* **10**(4): 348-355.
- World Health Organization (1997). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. WHO, Geneva.
- World Health Organization (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control World Health Organization.
- Xu, H., B. Di, et al. (2006). "Serotype 1-Specific Monoclonal Antibody-Based Antigen Capture Immunoassay for Detection of Circulating Nonstructural Protein NS1: Implications for Early Diagnosis and Serotyping of Dengue Virus Infections." *J Clin Microbiol* **44**(8): 2872-2878.
- Yauch, L. E., R. M. Zellweger, et al. (2009). "A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells." *J Immunol* **182**(8): 4865-4873.
- Yen, Y. T., H. C. Chen, et al. (2008). "Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development." *J ViroL* **82**(24): 12312-12324.
- Yin, Z., Y. L. Chen, et al. (2009). "An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20435-20439.
- Zhang, W., R. Singam, et al. (2004). "Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery." *Genet Vaccines Ther* **2**(1): 8.
- Ziegler, U. and P. Groscurth (2004). "Morphological features of cell death." *News Physiol Sci* **19**: 124-128.