

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DÉBORA BATISTA DE OLIVEIRA

Estudo das alterações morfológicas e funcionais das plaquetas
na infecção pelo vírus dengue

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

Orientadora: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

RIO DE JANEIRO

2012

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

O48 Oliveira, Débora Batista de

Estudo das alterações morfológicas e funcionais das plaquetas na infecção pelo vírus dengue / Débora Batista de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2012.

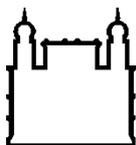
xvi, 101 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.

Bibliografia: f. 102-124

1. Dengue. 2. Plaquetas. 3. Ativação. 4. Pacientes. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: Débora Batista de Oliveira

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DAS
PLAQUETAS NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE**

ORIENTADORA: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

Aprovada em: 29/10/2012

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro
Prof. Dr. Adilson José de Almeida
Profa. Dra. Paula Mello de Luca
Profa. Dra. Flávia Barreto dos Santos
Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Rio de Janeiro

2012

Dedico esta dissertação aos meus pais, meu irmão e minha avó por terem criado em mim a garra por alcançar grandes vitórias.

Agradecimentos

À Deus, por ter me capacitado todos os dias para realizar esse trabalho.

À minha orientadora Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto, pela excelente condução do meu mestrado, me ensinando a ser responsável, a pensar e a alcançar nossos resultados. Obrigada pela paciência, pela dedicação e pelos “puxões de orelha”, me instigando a ser sempre mais!

Aos meus pais Geraldo e Maria Eneida, por terem me dado muito mais do que jamais tiveram, por proverem a melhor educação que eu poderia ter: o exemplo de vocês. Vocês são a minha inspiração e o meu orgulho. Eu os amo muito!

Ao meu irmão Samuel, por ser meu companheiro, amigo e confidente, me apoiando em tudo.

À Silas e Shuma, por buscarem comigo a vontade de Deus para todos os passos da minha vida, me amando incondicionalmente e me ensinando a ser filha. Ao Leo, por ser um irmão maravilhoso e por pegar tanto no meu pé!

Ao meu amado Vitor, por ser meu melhor amigo durante todos esses anos. Obrigada por me incentivar a conquistar essa vitória, pelo amor e carinho crescentes. É uma alegria indescritível ter você na minha vida!

À todos em Monte Sião; obrigada pelo privilégio imenso de ser parte dessa grande família, onde juntos vivemos crendo por fazer diferença.

À Cintia por todo o companheirismo, por ter me recebido com tanto carinho e por me ensinar a ser uma aluna de mestrado! Obrigada pelas longas horas no laboratório para me ajudar!

À equipe do Laboratório de Imunologia Viral: Gladys, Mariana, Raimundo, Luciana, Cíntia Mello, Larissa, Edmar, Márcio por toda a ajuda. É um prazer trabalhar com vocês. Agradeço especialmente à Amanda, por todo o apoio, carinho e ajuda!

À Dra. Elzinandes Leal de Azeredo, pela paciência em me ensinar a citometria de fluxo, contribuindo grandemente para a execução deste trabalho.

À Dra. Claire Fernandes Kubelka por ter me recebido neste laboratório, proporcionando o desenvolvimento deste projeto.

Ao médico Dr. Paulo Vieira Damasco pela colaboração no trabalho realizado com pacientes.

Aos pacientes que concordaram em participar deste projeto; minha enorme gratidão.

Ao Dr. Robson Queiroz de Monteiro pela valiosa revisão deste trabalho; apresentando novas formas de compreender os resultados.

À Dra. Ortrud Monika Barth Schatzmayr, Dra. Débora Ferreira Barreto Vieira e à toda equipe do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral pela realização da microscopia eletrônica de transmissão.

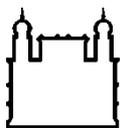
À Dra. Rita Nogueira e à toda equipe do Laboratório de Flavivírus pelo diagnóstico laboratorial dos pacientes.

À Pós-graduação em Biologia Parasitária.

À CAPES pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto, ao CNPq, FAPERJ, IOC/FIOCRUZ pelos recursos financeiros.

*"Coragem! Vocês pertencem à
geração do futuro. Vocês
realizarão grandes feitos."*

Victor Hugo (1802 – 1885)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

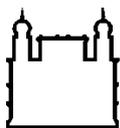
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo das alterações morfológicas e funcionais das plaquetas na infecção pelo vírus dengue

RESUMO

Débora Batista de Oliveira

As plaquetas são fragmentos celulares derivados do precursor hematopoiético megacariócito, que desempenham um importante papel na hemostasia, inflamação e resposta imune. Na dengue, as plaquetas constituem uma das populações celulares mais afetadas por mecanismos diretos ou indiretos da infecção. Desta forma, estudos que possam contribuir na compreensão da plaquetopenia, assim como nas alterações funcionais das plaquetas na dengue são de extrema importância para o entendimento da patogenia e no avanço de esquemas terapêuticos durante a infecção humana pelo dengue. O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações nas plaquetas durante a infecção humana e *ex vivo* pelo DENV, observando sua morfologia, perfil de ativação e expressão de receptores do tipo Toll TLR2 e TLR4, interação com o vírus e relação com proteínas plasmáticas associadas à sua ativação e funcionalidade. Para isto, foram utilizadas metodologias de citometria de fluxo, microscopia eletrônica de transmissão e ensaios imunoenzimáticos. Utilizando modelo *in vitro* de ativação em que plaquetas de doadores foram estimuladas com trombina, confirmamos a ativação dessas subpopulações celulares, sem detectar alteração da expressão dos TLR2 e TLR4. Ao avaliarmos o efeito da interação do DENV-2 com plaquetas de doadores, demonstramos evidências morfológicas de ativação e detectamos partículas virais em vesículas citoplasmáticas por microscopia eletrônica. Contudo, nas mesmas condições acima, não detectamos modulação da expressão de marcadores de ativação plaquetária, como CD62P e fibrinogênio, nem de TLR2 ou TLR4 por citometria de fluxo. A análise das plaquetas isoladas de pacientes DENV⁺ demonstrou maior expressão de CD62P e menor expressão de TLR4 comparado a pacientes com outras doenças febris e controles saudáveis por citometria de fluxo. Não detectamos diferença na expressão de CD40L e TLR2. Morfológicamente, a ativação das plaquetas de pacientes DENV⁺ foi confirmada. Brevemente, a quantificação de mediadores plasmáticos por ensaios imunoenzimáticos relacionados direta ou indiretamente com a ativação e função plaquetária indicou: (i) níveis aumentados da relação sCD62P/contagem de plaquetas com a gravidade da doença; (ii) envolvimento menor da quantidade de NO_x plasmático nos pacientes; (iii) diminuição dos níveis do vasoconstritor TXB₂ em pacientes com FD Sem SA comparado aos controles e pacientes Graves; (iv) níveis aumentados de TFPI com a gravidade da doença; (v) níveis diminuídos de CCL5 mas (vi) aumentados de CCL2 com a gravidade da doença. As análises de correlação demonstraram que enquanto os níveis de CCL5 estavam diretamente relacionados com a quantidade de plaquetas, a correlação foi inversa entre TFPI e plaquetas. De forma interessante, níveis aumentados de TXB₂ foram vistos em pacientes com extravasamento plasmático comparados aos pacientes sem extravasamento. Nossos resultados confirmaram a capacidade de interação *in vitro* do DENV e plaquetas, com subsequentes modificações morfológicas. Na infecção natural, plaquetas de pacientes DENV⁺ são ativadas, inclusive com confirmação do perfil morfológico de ativação. Nós supomos que a diminuição da expressão de TLR4 nas plaquetas da nossa coorte de pacientes poderia estar (i) diretamente relacionado a ativação das plaquetas e/ou (ii) a uma coorte de pacientes clinicamente branda, caracterizada por uma evolução clínica e plaquetopenia pouco agravantes. A relação entre sCD62P/contagem de plaquetas e os níveis de TFPI confirmam a ativação plaquetária e seriam bons marcadores de prognóstico da doença. Além disso, CCL5 e TFPI participariam direta ou indiretamente da plaquetopenia ou da funcionalidade plaquetária.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Study of morphological and functional changes of platelets in dengue virus infection

ABSTRACT

Débora Batista de Oliveira

Platelets are cell fragments derived from the hematopoietic precursor megacaryocyte, which play an important role in hemostasis, inflammation and immune response. In dengue, platelets constitute one of the cell populations most affected by direct or indirect mechanisms of infection. Therefore, studies that may contribute to the understanding of thrombocytopenia, as well as functional changes of platelets in dengue are extremely important for the understanding of the pathogenesis and progress of therapeutics during human infection by dengue. The aim of this study was to evaluate changes in platelets during human and *ex vivo* infection by DENV, observing its morphology, activation profile and expression of Toll-like receptors TLR2 and TLR4, interaction with the virus and relation with plasma proteins associated to its activation and functionality. To do so, flow cytometry methods, transmission electron microscopy and immunoassays were used. Using *in vitro* model of platelet activation in which platelets from donors were stimulated with thrombin, we confirmed the activation of these cellular subpopulations without detecting altered expression of TLR2 and TLR4. When evaluating the effect of the interaction of DENV-2 with donor platelets, we demonstrated morphological evidences of activation and detected viral particles in cytoplasmic vesicles by electron microscopy. However, under the same conditions above, we have not detected modulation of the expression of platelet activation markers such as fibrinogen and CD62P or TLR2 or TLR4 by flow cytometry. Analysis of platelets isolated from patients DENV⁺ demonstrated greater expression of CD62P and lower TLR4 expression compared to patients with other febrile illness and healthy controls by flow cytometry. We did not detect differences in the expression of CD40L and TLR2. Morphologically, the activation of platelet from patients DENV⁺ was confirmed. Briefly, quantification of plasma mediators by immunoassays related directly or indirectly with activation and platelet function indicated: (i) Increased levels of the relation sCD62P/platelet count in the severity of the disease, (ii) lesser involvement of plasmatic NO_x in patients, (iii) decreased levels of vasoconstrictor TXB₂ in patients with DF without WS compared to controls and severe patients, (iv) increased levels of TFPI according to the severity of the disease, (v) reduced levels of CCL5 (vi) but increased levels of CCL2 with increased disease severity. Correlation analysis showed that while the CCL5 levels were directly related to the platelet count, inverse correlation between TFPI and platelets occurred. Interestingly, increased levels of TXB₂ were seen in patients with plasma leakage compared to patients without leakage. Our results confirmed the ability of *in vitro* interaction of DENV and platelets, with subsequent morphological changes. In natural infection, platelets from patients DENV⁺ are activated, even confirming the profile of morphological activation. We hypothesize that the decreased expression of TLR4 in platelets from our cohort of patients could be (i) directly related to platelet activation and/or (ii) to a cohort of patients clinically mild, characterized by clinical progression and thrombocytopenia not aggravated. The relationship between sCD62P/platelet count and levels of TFPI confirm platelet activation and would be good prognostic markers of the disease. Furthermore, CCL5 and TFPI could participate directly or indirectly in thrombocytopenia or in platelet function.

Lista de abreviaturas

ACD: ácido citrato dextrose
ADE: aumento da infecção dependente de anticorpo
ADP: difosfato de adenosina
APC: célula apresentadora de antígeno
Arg: Arginina
Asp: Asparagina
ATP: adenosina trifosfato
C: proteína do capsídeo do vírus dengue
CCL17/TARC: ligante 17 de CC quimiocina/ quimiocina do timo regulada por ativação
CCL2/MCP-1: ligante 2 de CC quimiocina/ proteína quimiotática de monócitos-1
CCL3/MIP-1 α : ligante 3 de CC quimiocina/ proteína 1 α inflamatória de macrófagos
CCL5/RANTES: ligante 5 de CC quimiocina/ regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais
CCL7/MCP-3: ligante 7 de CC quimiocina/ proteína quimiotática de monócitos-3
CD62E: E-selectina
CD62P: P-selectina
CE: célula endotelial
CLEC/ MDL-1: membro da família dos domínios da lectina do tipo C
CLR: receptor de lectina do tipo C
c-MLP: oncogene viral da leucemia mieloproliferativa
CXCL1/GRO- α : ligante 1 de CXC quimiocina/ oncogene relacionado ao crescimento 1
CXCL1/KC: ligante 1 de CXC quimiocina/ quimiocina derivada de queratinócito
CXCL10/IP-10: ligante 10 de CXC quimiocina/ proteína 10 induzida por interferon
CXCL12/SDF: ligante 12 de CXC quimiocina/ fator derivado de células estromais
CXCL4/PF4: ligante 4 de CXC quimiocina/ fator plaquetário 4
CXCL5/ENA-78: ligante 5 de CXC quimiocina/ ativador neutrofílico derivado do epitélio 78
CXCL7/NAP2: ligante 7 de CXC quimiocina/ peptídeo ativador de neutrófilo
CXCL8/IL-8: ligante 8 de CXC quimiocina/ interleucina 8
CXCL9/MIG: ligante 9 de CXC quimiocina/ monocina induzida por interferon gama
DC: célula dendrítica
DC-SIGN: molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intracelular 3 específica de células dendríticas
DENV: vírus da dengue
DIC: coagulação intravascular disseminada
DNA: ácido desoxirribonucleico
E: proteína do envelope do vírus dengue

FcR: receptor Fc
FD com SA: dengue com sinais de alarme
FD sem SA: dengue sem sinais de alarme
FD: febre do dengue
FHD: febre hemorrágica do dengue
Gli: Glicina
GM-CSF: fator estimulador de colônia granulócitos-macrófago
GP: glicoproteína
GTP: trifosfato de guanosina
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HMGB1: proteína box de alta motilidade de grupo 1
HUVEC: célula endotelial de veia umbilical humana
ICAM: molécula de adesão intercelular
IFN: interferon
IgG: imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
IL: interleucina
ITAM: imunorreceptor baseado em tirosina
JAM: molécula de adesão juncional
LAMP: proteína de membrana lisossomal
M: proteína da membrana do vírus dengue
ME: microscopia eletrônica
MR: receptor de manose
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
NK: célula T *natural killer*
NO: óxido nítrico
NO_x: nitrito e nitrato
NS: proteína não estrutural do vírus dengue
ODF: outras doenças febris
OMS: Organização Mundial de Saúde
PAF: fator de ativação plaquetária
PAFR: receptor de fator de ativação plaquetária
PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1
PAIgG: imunoglobulina G associada à plaquetas
PAIgM: imunoglobulina M associada à plaquetas
PAMP: padrão molecular associado a patógeno
PAR: receptor ativado por protease
PBS: tampão salina fostato
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE₂: prostaglandina E₂
PGI₂: prostaciclina I₂
PMN: célula polimorfonuclear
prM: proteína precursora de membrana do vírus dengue
PRP: plasma rico em plaquetas
PSGL-1: ligante 1 da glicoproteína P-selectina
PT: tempo de protrombina
PTT: tempo de tromboplastina
RE: retículo endoplasmático
RGD: sequência peptídica Arginina-Glicina-Asparagina

RJ: Rio de Janeiro
RNA: ácido ribonucleico
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SCA: sistema canicular aberto
SCD: síndrome do choque do dengue
SDM: sistema de demarcação de membranas
Sec1-Munc: homólogo mamífero da proteína Sec 1 de levedura
SFB: soro fetal bovino
SINAN: Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SNAP: proteína associada ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida
SNARE: receptor de ligação ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida
TF: fator tecidual
TFPI: inibidor da via do fator tecidual
TGF: fator de crescimento tumoral
TLR: receptor do tipo Toll
TM: trombomodulina
TNF: fator de necrose tumoral
TP: receptor de tromboxano A₂
t-PA: ativador do plasminogênio tecidual
TPO: trombopoietina
TXA₂: tromboxano A₂
TXB₂: tromboxano B₂
VAMP: proteína de membrana associada a vesícula
VCAM: molécula de adesão vascular
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
vWF: fator de von Willebrand

Sumário

1. Estudo das plaquetas na dengue	1
1.1. O vírus dengue	1
1.1.1. Estrutura e proteínas virais	1
1.1.2. Replicação viral em células-alvo e interação com outras populações celulares	3
1.2. Aspectos da infecção pelo vírus	6
1.2.1. Epidemiologia da dengue no Brasil	6
1.2.2. Manifestações clínicas e a nova classificação dos casos de dengue pela Organização Mundial de Saúde em 2009	7
1.3. Imunopatogenia da dengue	10
1.3.1. Anticorpos neutralizantes <i>versus</i> anticorpos facilitadores da infecção na dengue	10
1.3.2. Teoria do pecado original e produção desregulada de citocinas.....	12
2. Plaquetas	14
2.1. Características gerais da plaquetas	14
2.2. Biologia das plaquetas	15
2.2.1. Origem, formação e estrutura das plaquetas	15
2.2.2. Morfologia das plaquetas	16
2.3. Síntese e secreção de mediadores de coagulação e imunológicos.....	18
2.4. Receptores na fisiologia das plaquetas	21
2.5. O papel das plaquetas na hemostasia e coagulação e alteração desses mecanismos na dengue	26
2.6. O papel das plaquetas na resposta imunológica	29
2.7. Plaquetas e viroses	30
2.7.1. Na dengue	32
3. Objetivos	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. Materiais e Métodos	37
4.1. Obtenção de plaquetas do sangue periférico de controles saudáveis.....	37
4.2. Isolamento de plaquetas em barreira de iodixanol - Optiprep a partir do sangue periférico de pacientes suspeitos de infecção pelo DENV.....	38
4.3. Preparação de estoque viral e titulação viral	38
4.4. Ativação das plaquetas com trombina e interação com o DENV-2 <i>in vitro</i>	40

4.5. Detecção de antígeno viral, marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas de doadores e pacientes por citometria de fluxo	41
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão para avaliação morfológica e detecção de partículas virais em plaquetas de doadores e pacientes.....	44
4.7. Estudo populacional dos pacientes	45
4.8. Diagnóstico clínico e laboratorial dos casos de dengue	45
4.9. Quantificação das moléculas plasmáticas CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, TXB ₂ , NO _x , CD62P solúvel e TFPI por ELISA	46
4.10. Análise Estatística	50
5. Resultados	51
5.1. Identificação, avaliação da expressão de marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas isoladas de doadores saudáveis	51
5.2. Impacto da interação do DENV-2 em plaquetas de doadores sadios: detecção de proteínas ou partículas virais, marcadores de ativação plaquetária e expressão de receptores do tipo Toll	53
5.3. Caracterização demográfica, clínica e laboratorial dos pacientes infectados pelo vírus Dengue	58
5.4. Identificação das plaquetas, avaliação da expressão de marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas isoladas de pacientes infectados pelo vírus Dengue	61
5.5. Alteração morfológica e detecção viral em plaquetas de pacientes infectados pelo DENV	68
5.6. Dosagem de moléculas plasmáticas associadas à ativação e funcionalidade plaquetária em pacientes infectados pelo vírus Dengue da epidemia de 2011.....	70
5.7. Correlação entre marcadores de ativação plaquetária e expressão de receptores do tipo Toll com a dosagem de moléculas plasmáticas associadas à ativação e funcionalidade plaquetária em pacientes infectados pelo vírus Dengue	71
5.8. Quantificação de moléculas plasmáticas associadas à ativação e funcionalidade plaquetária em pacientes infectados pelo vírus Dengue da epidemia de 2010	72
5.9. Relação entre a dosagem de moléculas plasmáticas associadas à ativação e funcionalidade plaquetária e parâmetros clínico-laboratoriais de pacientes infectados pelo vírus Dengue	76
6. Discussão	79
6.1. Aumento da ativação pelo CD62P e diminuição da expressão de TLR4 em plaquetas de pacientes infectados pelo DENV	79
6.2. DENV-2 interage <i>in vitro</i> com plaquetas de doadores	85

6.3. Plaquetopenia na infecção natural pelo DENV: possíveis causas e efeitos	87
6.4. Mediadores plasmáticos associados à ativação plaquetária e inibição do sistema de coagulação estão correlacionados a gravidade da dengue	91
7. Conclusões e perspectivas	100
8. Referências bibliográficas	102

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do vírus dengue	2
Figura 2. O genoma do vírus dengue	2
Figura 3. Morfologia da ativação de plaquetas <i>in vitro</i> pelo DENV-2	5
Figura 4. Classificação de dengue revisada em 2009 pela Organização Mundial de Saúde	10
Figura 5. Níveis de citocinas, quimiocinas e receptores solúveis em pacientes com dengue e controles normais	14
Figura 6. Morfologia de plaquetas	16
Figura 7. Ativação de plaquetas por agonistas	19
Figura 8. Reconhecimento de PAMPs por TLRs e vias de sinalização	24
Figura 9. Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares	27
Figura 10. Papel das plaquetas na hemostasia	28
Figura 11. Microscopia eletrônica de plaquetas incubadas com HIV	31
Figura 12. Partículas DENV-like em plaquetas	33
Figura 13. Partículas DENV-like em plaquetas isoladas de paciente DENV ⁺	35
Figura 14. Desenho experimental e fluxograma dos experimentos realizados com amostras de pacientes com infecção aguda pelo vírus Dengue	46
Figura 15. Identificação das plaquetas de doadores	52
Figura 16. Marcação intracelular de antígenos virais em plaquetas por citometria de fluxo	55
Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão de cultura de plaquetas em contato com DENV-2	56
Figura 18. Expressão dos marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas estimuladas com DENV	57
Figura 19. Modulação de marcadores de ativação em plaquetas na infecção aguda pelo DENV	63
Figura 20. Modulação de receptores do tipo Toll em plaquetas na infecção aguda pelo DENV	66
Figura 21. Análise ultra-estrutural de plaquetas de pacientes infectados pelo vírus DENV	69
Figura 22. Dosagem de mediadores plasmáticos em pacientes infectados pelo DENV na epidemia de 2011	75
Figura 23. Dosagem de mediadores plasmáticos em pacientes infectados pelo DENV na epidemia de 2010	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mediadores imunológicos, inflamatórios e anti-microbianos liberados por plaquetas ativadas.....	20
Tabela 2. Anticorpos monoclonais, anticorpos secundários e moléculas conjugadas utilizados	43
Tabela 3. Referências dos kits de ELISA e diluições das amostras de plasma de pacientes e controles	50
Tabela 4. Expressão dos marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas de doadores saudáveis	53
Tabela 5. Expressão dos marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas de doadores na presença do DENV-2 ultra	58
Tabela 6. Perfil demográfico e laboratorial dos pacientes infectados pelo DENV	60
Tabela 7. Correlação entre a expressão de marcadores de ativação, receptores do tipo Toll e mediadores plasmáticos em pacientes infectados pelo DENV	72
Tabela 8. Razão sCD62P/contagem de plaquetas e quantificação de quimiocinas plasmáticas nos pacientes infectados pelo dengue durante epidemia de 2010	76
Tabela 9. Correlação das moléculas plasmáticas com os dados laboratoriais indicadores de gravidade	77
Tabela 10. Comparações das dosagens de moléculas plasmáticas entre grupos com manifestações clínicas importantes	78

1. Introdução

1. Estudo das plaquetas na dengue

Em 1964, Nelson e Bierman questionaram se a dengue seria considerada uma doença plaquetopênica (1). De fato, plaquetopenia, coagulopatia, e vasculopatia são alterações hematológicas relacionadas às disfunções plaquetária e endotelial características da forma grave da infecção pelo vírus dengue (DENV) (2-4). Além disso, a plaquetopenia é um critério importante para a definição de casos clínicos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (5), porém os mecanismos responsáveis pela hemorragia na dengue ainda são pouco compreendidos.

1.1 O vírus dengue

1.1.1 Estrutura e proteínas virais

O DENV é membro da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*, que possui 4 sorotipos antigenicamente distintos, DENV-1, -2, -3 e -4 que demonstram cerca de 60% de identidade na sequência genômica (6). As partículas virais dos Flavivírus compartilham um tamanho comum (40-65 nm), possuem diâmetro de aproximadamente 500 Å e capsídeo elétron denso icosaédrico envolto por uma bicamada lipídica (Figura 1). O material genético é composto por uma fita simples de RNA senso positiva, contendo 10.700 nucleotídeos, que codifica três proteínas estruturais, capsídeo (C), membrana (M, transcrita como precursor prM) e envelope (E), e sete proteínas não estruturais, (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) importantes para a replicação viral (7) (Figura 2).

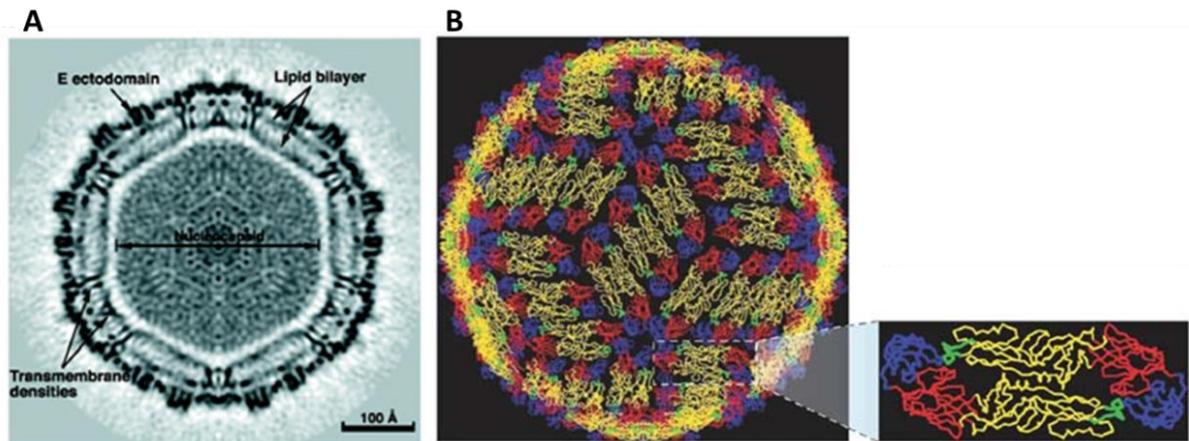


Figura 1. Estrutura do vírus dengue. (A) Corte longitudinal do vírus, mostrando o nucleocapsídeo icosaédrico e a membrana poligonal. As áreas escuras são proporcionais à densidade das moléculas por crio-microscopia eletrônica de partículas. Figura extraída de Zhang e colaboradores, 2003 (8). (B) Estrutura da partícula viral madura; em destaque os domínios estruturais da proteína E: domínio central em vermelho, domínio de dimerização em amarelo, domínio de ligação ao receptor celular em azul, peptídeo de fusão em verde. Figura de Whitehead e colaboradores, 2007 (9).

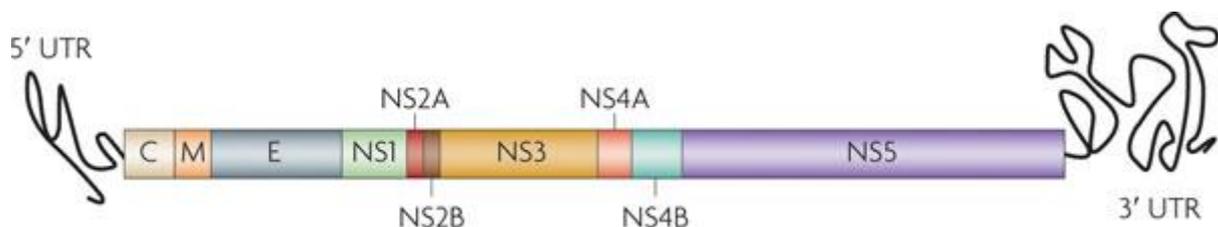


Figura 2. O genoma do vírus dengue. O genoma viral codifica as proteínas estruturais C, M e E e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Extraído de Guzman e colaboradores, 2010 (10).

A proteína do capsídeo (C) está envolvida na montagem do capsídeo ao redor do RNA viral (11) e as proteínas de membrana (prM/M) e de envelope (E) possuem diferentes conformações dependendo do grau de maturação do vírus. O peptídeo "pr" é clivado da prM pela protease furina e durante a maturação do vírus, a proteína M permanece na partícula madura como uma proteína transmembranar. O processo de maturação do vírus ocorre na rede trans-Golgi e é guiada pela proteína E (12), que sofre modificações ativadas por pH baixo (5,8 - 6,0) no interior do lisossomo (13). A proteína E é composta por três domínios (I, II e III) e é a principal glicoproteína exposta na superfície viral, sendo o primeiro ponto de contato entre o vírus e a célula do hospedeiro. A proteína E participa da montagem da partícula viral (12, 14, 15) e ainda apresenta

determinantes antigênicos envolvidos na resposta imunológica, induzindo, por exemplo, a produção de anticorpos neutralizantes (15, 16).

Dentre as proteínas não estruturais (NS), a NS1 é glicoproteica e está presente em três diferentes formas: (i) associada a organelas intracelulares sendo nesta forma importante para a replicação viral; (ii) ancorada à membrana ou (iii) secretada de células infectadas de mamíferos (sNS1) (17). A sNS1 é encontrada no plasma de pacientes infectados pelo DENV durante a fase inicial da infecção, sendo utilizada como ferramenta de diagnóstico (18). As proteínas não estruturais NS2A, NS4A e NS4B parecem funcionar como antagonistas da transdução de sinais do IFN do tipo 1, citocina envolvida no controle de infecções virais (19). A NS2B é uma proteína associada à membrana que funciona como cofator para a ativação da protease NS3 (20). NS3 é uma proteína multifuncional que possui atividades enzimáticas envolvida na replicação do RNA (21, 22). NS4A está envolvida na replicação viral, promovendo sinalização por meio da região C-terminal para a translocação da NS4B no retículo endoplasmático (23), que auxilia a NS3 durante o processo de replicação do RNA viral (24). Finalmente, a NS5 é uma proteína multifuncional, bem conservada, envolvida na síntese do RNA viral (25).

1.1.2 Replicação viral em células-alvo e interação com outras populações celulares, incluindo plaquetas

A infecção pelo DENV se inicia com a picada dos mosquitos vetores *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* infectados, introduzindo o vírus no hospedeiro via rota subcutânea, de acordo com um consenso mais geral, dentro da epiderme ou derme. As células localizadas no epitélio, como células de Langerhans epidermais (26) ou células dendríticas (DCs) imaturas dérmicas, são as primeiras e importantes alvos da replicação viral.

O DENV também é capaz de infectar várias linhagens celulares: humanas (K652, U937, THP-1, HepG2, HUVEC, ECV304, Raji, HSB-2, Jurkat, LoVo, KU812), de mosquito (C6/36), de macaco (Vero, BS-C-1,

CV-1, LLC-MK2), de hamster (BHK) e macrófagos murinos (Raw, P388D1, J774) (Revisado por Rodenhuis-Zybert e colaboradores, 2010) (27). A grande variedade de células permissivas ao DENV indica que o vírus se liga a uma molécula de superfície ubíqua ou explora vários receptores para realizar a infecção. Em células de mamíferos, o DENV pode interagir com Heparan sulfato, HSP90 (proteínas de choque térmico), CD14, GRP78/BiP (proteína regulada por glicose) e com receptor de laminina de alta afinidade 37/67-kDa. Além disso, os receptores de lectina do tipo C (CLR) estão envolvidos na interação das partículas do DENV com células mielóides e incluem a molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intracelular 3 específica de células dendríticas (DC-SIGN/CD209), receptores de manose (MR) e o membro da família dos domínios da lectina do tipo C (CLEC/MDL-1) (27).

O DENV, assim como outros Flavivírus, utiliza a endocitose mediada pela clatrina para sua entrada na célula (28). Em seguida, a acidificação da vesícula endocítica leva ao rearranjo da glicoproteína de superfície E, fusão das membranas virais e do hospedeiro e liberação do RNA viral no citoplasma. O RNA genômico viral é em seguida traduzido para produzir proteínas virais nas estruturas membranares derivadas do retículo endoplasmático (RE), onde as proteínas virais e o RNA recém-sintetizado montam o virion imaturo no lúmen do RE. A proteólise da membrana precursora viral (prM) ocorre na rede trans-Golgi e é mediada pela enzima furina do hospedeiro (29), ativando o rearranjo da homodimerização das proteínas do envelope e a formação de novas partículas virais maduras que são secretados da célula do hospedeiro (30). Algumas proteínas não-estruturais NS1 sintetizadas são expressas na membrana plasmática da célula ou secretadas, e alguns vírions são secretados na forma imatura. Além disso, complexos imunes com o vírus podem ser internalizados por células que possuem receptores Fc (FcR), incluindo células dendríticas e macrófagos. Este processo de adsorção mediado por FcR pode, portanto resultar na internalização do vírus em compartimentos ácidos da via endocítica e fagocítica, de forma bastante similar à adsorção do DENV através de seu receptor natural (31).

Amostras de autópsia de pacientes infectados pelo DENV sugerem que uma fração de células endoteliais (CE) são infectadas (32). Recentemente, autores demonstraram que o DENV infecta eficiente e produtivamente CE humanas via interação com receptores de superfície celular contendo heparan-sulfato, sugerindo que CE infectadas estariam contribuindo à viremia e disseminação viral (33).

Na infecção pelo DENV, a detecção de antígenos virais na superfície de plaquetas, bem como plaquetas contendo complexos imunes em biópsias de pele já foram documentados (34-36). De fato, vários receptores relacionados à entrada do DENV em células, tais como DC-SIGN ou FcγRII, podem ser encontrados na superfície de plaquetas (37). Estudos já demonstraram que plaquetas expostas experimentalmente ao DENV são capazes de interagir com o vírus, exibindo características morfológicas de ativação (Figura 3) como degranulação, presença de filopódios, dilatação do sistema canicular aberto (SCA) e aumento da expressão de P-selectina (CD62P) (38).

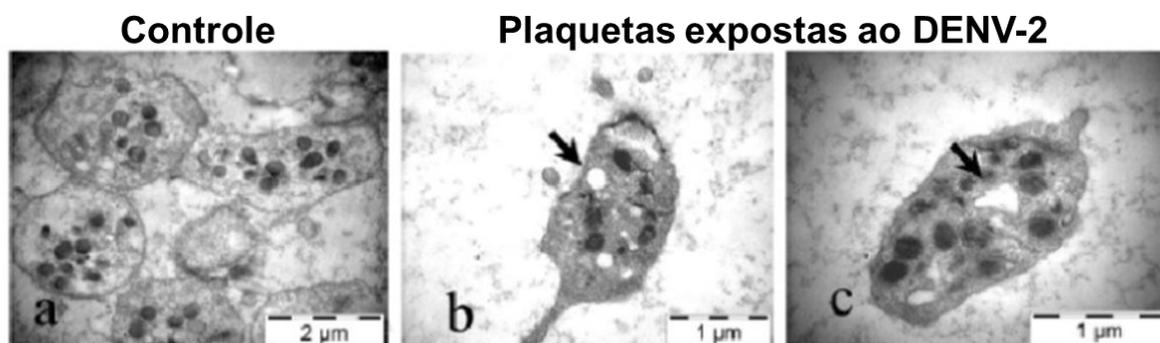


Figura 3. Morfologia da ativação de plaquetas *in vitro* pelo DENV-2. Microscopia eletrônica de transmissão representativas de plaquetas em repouso (a) e expostas ao DENV-2 (b, c) demonstrando perfil de ativação como emissão de filopódios. As setas indicam zonas de degranulação. Figura modificada de Ghosh e colaboradores, 2008 (38).

Ainda, RNA do DENV já foi detectado em plaquetas e plasma por RT-PCR e por microscopia eletrônica de transmissão, confirmando a presença de partículas semelhantes ao DENV no interior de plaquetas isoladas de crianças infectadas pelo DENV (39). Entretanto, a replicação eficiente do DENV ainda não foi demonstrada em plaquetas isoladas de pacientes infectados (40). Porém, a infecção de células de medula óssea

in vivo pelo DENV já foi demonstrada (41), o que pode contribuir para a supressão de medula óssea, característica da infecção pelo vírus.

1.2 Aspectos da infecção pelo vírus

1.2.1 Epidemiologia da dengue no Brasil

Os primeiros relatos de doença similar à dengue foram documentados entre os anos de 1779 e 1788 (42). A primeira epidemia de dengue no Brasil aconteceu em 1981 no estado de Roraima, com o isolamento do DENV-1 e DENV-4 (43). Logo após um período sem relatos de surtos, em 1986 o DENV-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro (RJ), se tornando um problema nacional de saúde pública em consequência da rápida disseminação do vírus em vários estados (43). Já em 1990, a situação se agravou com o aparecimento do DENV-2 também no RJ (44), quando também foram registrados os primeiros casos fatais devido às infecções secundárias. Em 1994, o vírus já circulava por várias regiões do país, causando um aumento progressivo da incidência da doença (45). O DENV-3 foi introduzido no Brasil em 2001 no RJ (46), resultando em uma grave epidemia no verão de 2001/2002, com 1.831 casos de dengue hemorrágica relatados (47). Até o final de 2006, 25 dos 27 estados brasileiros já havia relatado epidemias de dengue em consequência da co-circulação de três sorotipos do vírus (48). O DENV-4 já havia sido relatado na Amazônia em 1982 e em Manaus no ano de 2008 em três pacientes sem histórico de viagem recente (49). Em 2010 o DENV-4 reemergiu no país nos municípios de Boa Vista e Cantá em Roraima, co-circulando com DENV-1 e DENV-2 (50), porém somente em 2012 foi reportada a sequência completa do genoma de uma cepa de DENV-4 isolado em paciente infectado em Roraima em 2010 (51).

O número de notificações de dengue no estado do Rio de Janeiro em 2012 foi de 89.406 casos até o mês de junho, de acordo com o Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN). Dentre os sorotipos isolados no município do Rio de Janeiro, o DENV-4 foi o predominante, representando 88% do total de sorotipos isolados (52).

1.2.2 Manifestações clínicas e a nova classificação dos casos de dengue pela Organização Mundial de Saúde em 2009

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV pode causar desde uma infecção assintomática ou uma doença febril e autolimitada conhecida como febre do dengue (FD), até formas clínicas graves, potencialmente fatais caracterizadas por hemorragia, hemoconcentração, disfunção de vários órgãos, a febre hemorrágica do dengue (FHD) e choque, a síndrome do choque do dengue (SCD) (10).

O curso clínico da doença viral inclui as fases: febril, crítica e de recuperação. A fase febril se caracteriza por febre com duração de 2-7 dias, associada a eritema facial, dor no corpo, cefaléia, prostração e anorexia. Nesta fase não é possível prever a evolução e também não é fácil diferenciá-la de outras doenças febris. A importância de se observar os sinais de alerta nesta fase poderá 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 diminui comumente (53, 54). A fase crítica não ocorre em todos os pacientes, dura de 24 a 48 horas e geralmente ocorre entre o 3º e o 7º dia de 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 (DIC) e hemorragia grave. No entanto, a hemorragia grave e dano grave aos órgãos podem acontecer sem extravasamento plasmático evidente. Os pacientes com

dengue branda apresentam uma melhora clínica após a defervescência (54-57).

Na última fase, a 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 a normalização do número de plaquetas e da reabsorção do líquido plasmático extravasado (54, 58).

A OMS propôs em 1970 uma classificação clínica para os casos de dengue, que foi revista em 1986, 1994 e 1997 (59), descrita como: FD de curso brando, mas incapacitante, caracterizada por febre associada às dores de cabeça, retro-orbital, mialgia, artralgia, perda de apetite, vômitos, diarreia, desconforto abdominal e erupções cutâneas (60). Enquanto que manifestações hemorrágicas e plaquetopenia são observadas em menor frequência (61), leucopenia é um achado comum (62, 63). Os casos mais graves são os de FHD separados em 4 graus de gravidade (graus I a IV), dos quais I e II representam os casos sem sinais de choque, enquanto que os graus III e IV agrupam os casos de choque.

A FHD é caracterizada por todos os sintomas da FD acompanhados de manifestações hemorrágicas espontâneas, plaquetopenia acentuada (contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$) e evidências de aumento da permeabilidade vascular (aumento da hemoconcentração e extravasamento plasmático na cavidade abdominal e pleural). A SCD está associada à alta mortalidade e se caracteriza por falência circulatória e choque hipovolêmico, apresentando sinais como pulso fino, taquicardia, pele úmida, extremidades frias e cianose circumoral. Pacientes com SCD evoluem ao óbito devido à falência múltipla de órgãos e podem também apresentar complicações como a DIC (60).

A descrição e a classificação da dengue acima eram baseadas em estudos realizados em crianças do Sudeste Asiático. Com o reaparecimento da dengue em outras regiões do planeta e em diferentes faixas etárias, percebeu-se uma grande dificuldade de se aplicar o modelo anterior de classificação da OMS devido à rigidez dos critérios e aos casos de dengue grave que não se encaixavam nos critérios de FHD (64-66). Por

essas razões, a OMS realizou um estudo multicêntrico para avaliar o uso dos critérios clínicos de dengue em regiões endêmicas (67) e confirmou que através da utilização de parâmetros clínicos e/ou laboratoriais, é possível diferenciar claramente os pacientes com dengue grave dos pacientes com dengue branda.

A nova classificação é baseada em níveis de gravidade clínica, compreendendo a doença como um evento dinâmico e sistêmico (Figura 4). Uma das vantagens da nova classificação foi a redução do número de casos sem classificação de 13,7% para 1,6% (68), facilitando a abordagem dos casos e o manejo clínico dos pacientes. Após confirmação laboratorial, a nova classificação aborda os três grupos de critérios com base em sinais e sintomas clínicos: 1) Dengue sem Sinais de Alarme (FD sem SA), caracterizado por náusea, vômitos, erupções cutâneas, mialgia, artralgia, cefaleia, leucopenia, teste do torniquete positivo sem sinais de hemorragia; 2) Dengue com Sinais de Alarme (FD com SA), incluindo: dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido, letargia, agitação, hepatomegalia (aumento > 2cm), elevação das transaminases hepáticas e diminuição da contagem de plaquetas; 3) Dengue Grave (Grave), caracterizado por extravasamento plasmático grave, podendo levar ao choque e acúmulo de fluidos acompanhado de desconforto respiratório, hemorragias graves e comprometimento de órgãos como fígado, coração, sistema nervoso central (com perda de consciência) e outros órgãos (54).



Figura 4. Classificação de dengue revisada em 2009 pela Organização Mundial de Saúde (68).

1.3 Imunopatogenia da dengue

Há várias teorias de como a FHD e a SCD se desenvolvem em indivíduos infectados. As hipóteses são provenientes de estudos realizados em regiões endêmicas e de experimentos *in vitro*, porém a falta de modelos animais para o estudo dos mecanismos de patogênese da doença é uma das grandes limitações no avanço da compreensão da doença.

1.3.1 Anticorpos neutralizantes versus anticorpos facilitadores da infecção na dengue

Na infecção humana pelo DENV, a resposta humoral é direcionada principalmente para as proteínas virais prM, E e NS1, enquanto que principalmente nos casos de infecção secundária observa-se resposta contra NS3 e NS5 (69, 70). Acredita-se que uma infecção primária seja capaz de criar proteção efetiva, duradoura, possivelmente ao longo da vida contra uma reinfecção com o mesmo sorotipo, porém uma proteção

de curto prazo contra outros sorotipos (71). A neutralização da infecção por anticorpos específicos pode ocorrer por inibição da entrada do vírus através de seus receptores de superfície celular (72) ou por inibição da fusão viral no citoplasma da célula (73). Por outro lado, estudos epidemiológicos sugerem que a imunidade a um dos quatro sorotipos do DENV pode aumentar a gravidade da doença durante um desafio subsequente com um segundo sorotipo, levando em alguns casos à dengue grave, caracterizada por extravasamento plasmático e manifestações hemorrágicas (74). Acredita-se que anticorpos de baixa capacidade neutralizante, de reação cruzada, produzidos em resposta a um sorotipo anterior contribuam para a patogênese da dengue grave ao promover a entrada do vírus através de receptores Fcγ (FcγR) e infecção de células mielóides (75), gerando um aumento da infecção dependente de anticorpo (ADE).

O ADE ocorre quando a endocitose do complexo vírus - anticorpo anti-DENV é mais eficiente do que a entrada de partículas virais livres nas células alvo. Em geral, o ADE é mediado por anticorpos específicos contra a proteína E em condições de baixa concentração ou baixa avidéz de anticorpos, tornando o número de anticorpos ligados ao vírus abaixo do limite necessário para a neutralização do vírus (76). Esse processo aumenta potencialmente o risco de desenvolvimento de formas graves da dengue em virtude do aumento de células infectadas e conseqüentemente, da carga viral (75, 77, 78). Anticorpos anti-prM parecem também participar do ADE em decorrência da clivagem parcial da proteína prM na superfície do DENV durante o processo de maturação, em vista da redução da densidade de antígenos virais disponíveis para neutralização (31, 79). O ADE pode ocorrer durante infecção primária de crianças entre 4 a 12 meses de idade nascidas de mães imunes ao dengue, isso por que mesmo após o desaparecimento de anticorpos neutralizantes maternos após 3 meses de idade, os anticorpos não neutralizantes continuam presentes (80, 81).

1.3.2 Teoria do pecado original e produção desregulada de citocinas

A resposta imune celular está envolvida na resolução da infecção, mas também no desenvolvimento da dengue grave. Neste contexto, as infecções secundárias pelo DENV são imunologicamente diferentes da primária, pois a resposta imunológica da infecção secundária ocorre em um contexto de imunidade heterotípica pré-existente de reação cruzada. Em geral, as células B e T de memória induzidas por exposição prévia a um sorotipo do DENV são capazes de responder mais rapidamente que as células *naive* durante uma infecção secundária, porém, células de memória reativadas durante a infecção secundária tem baixa afinidade pelos epítomos do sorotipo infectante e por isso são menos eficientes em responder ao desafio secundário (82), fenômeno conhecido como pecado antigênico original (83).

Como demonstrado por Duangchinda e colaboradores (2010), a resposta de células T em pacientes com dengue grave é principalmente monofuncional, já que as células T CD8⁺ produzem somente IFN- γ e fator de necrose tumoral α (TNF- α) e raramente CD107a, um marcador de citotoxicidade celular. Contudo, em paciente com dengue branda, as células T CD8⁺ mais frequentes são as que expressam CD107a e as menos frequentes produzem IFN- γ e TNF- α . Portanto, pacientes com dengue grave teriam células T com um potencial citotóxico limitado, não permitindo o controle eficiente da infecção, mas sim a estimulação de células T produtoras de citocinas inflamatórias, induzindo maior dano tecidual e extravasamento plasmático (84).

Na infecção pelo DENV, a ativação massiva de grande quantidade de células B e T de memória, assim como monócitos, macrófagos e células endoteliais, pode resultar na liberação e indução de citocinas e mediadores inflamatórios que irão contribuir para o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático (85). Estudos realizados com crianças e adultos infectados com diferentes sorotipos do DENV demonstraram o aumento significativo de citocinas e mediadores

como as interleucinas (IL) IL-1 β , -2, -4, -6, -7, -8, -10, -13, -18, TGF-1 β , TNF- α e IFN- γ no plasma de pacientes com dengue grave (Figura 6) (86-92).

Outros mediadores e fatores solúveis associados à gravidade da dengue incluem VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (93), GM-CSF (fator estimulador de colônia granulócitos-macrófago) (94), TPO (trombopoietina) (95), VCAM-1 solúvel (molécula de adesão vascular 1), ICAM-1 solúvel (molécula de adesão intercelular 1), vWF (fator de von Willebrand), (TM) trombomodulina, CD62E (E-selectina), TF (fator tecidual), PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio 1) e t-PA (ativador do plasminogênio tecidual). Estudos realizados em pacientes com dengue observaram que níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-8, TNF- α e CCL2/MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1, ligante do CCR2) estavam associados à plaquetopenia (94). Níveis elevados de CCL2/MCP-1, que atrai monócitos e está fortemente envolvido na redução das junções oclusivas de células endoteliais vasculares, foram observados em pacientes com dengue grave (96). Chau e colaboradores mostraram que pacientes com choque apresentam níveis plasmáticos das quimiocinas CXCL10/IP-10 (proteína 10 induzida por interferon), CCL2/MCP-1 e CXCL9/MIG (monocina induzida por interferon gama) mais elevados do que os pacientes sem choque, com a exceção dos níveis de CCL5/RANTES (97).

TNF- α	FHD > normal FHD > FD = ODF > normal	IL-18	FHD > FD > normal
IL-2	FHD = FD > normal	IFN- γ	FHD > FD > ODF = normal
IL-6	FHD > normal	CCL2/MCP-1	FHD > FD > ODF = normal
IL-8	FHD = FD > normal FHD > FD > normal	CCL5/RANTES	FHD = FD < normal
IL-10	FHD > FD	sTNFR2	FHD > FD > normal
IL-12	FHD < FD	sIL-2R	FHD > FD > normal

Figura 5. Níveis de citocinas, quimiocinas e receptores solúveis em pacientes com dengue e controles normais. FHD, FD e ODF se referem à febre hemorrágica do dengue, febre do dengue e outras doenças febris, respectivamente. Figura adaptada de Mathew e colaboradores, 2008 (77).

O óxido nítrico (NO), outro fator solúvel que está relacionado à gravidade na dengue, é uma molécula que pode ser produzida por plaquetas e participa na regulação da hemostasia. É responsável pela inibição da agregação plaquetária, impedindo a formação do trombo (98). Níveis plasmáticos reduzidos de NO associados ao aumento da IL-10 já foram observados em pacientes com dengue grave (99), o que poderia contribuir para o desenvolvimento das manifestações hemorrágicas observadas nas formas graves da doença.

2. Plaquetas

2.1 Características gerais das plaquetas

As plaquetas foram inicialmente descritas por Max Schultze em 1865, que as identificou como constituintes normais do sangue. Posteriormente em 1882, Giulio Bizzozero descreveu a função das plaquetas na trombose e na hemorragia ao observá-las no sangue em modelos animais vivos (100). As plaquetas sanguíneas são elementos chave na hemostasia, inflamação e no reparo tecidual. São os primeiros componentes celulares que se acumulam em sítios onde há dano tecidual

da parede vascular, e por isso, quando estimuladas e ativadas, iniciam eventos como agregação, exocitose de constituintes presentes em grânulos, expressão de proteínas de adesão e secreção de citocinas e mediadores (101). Além disso, recentemente tem-se demonstrado o papel das plaquetas como células chave de processos inflamatórios e resposta imune, evidenciado pela interação direta de plaquetas ativadas com células endoteliais e células do sistema imunológico, interagindo e respondendo a patógenos, o que é favorecido pela sua localização nos sítios de entrada de microorganismos patogênicos (102).

2.2 Biologia das plaquetas

2.2.1 Origem, formação e estrutura das plaquetas

Existem aproximadamente 10^{12} plaquetas na circulação sanguínea de um adulto humano, e pelo fato do tempo de vida de uma plaqueta ser de apenas 8 a 10 dias, 10^{11} novas plaquetas precisam ser produzidas diariamente a partir de megacariócitos da medula óssea para que o número normal de plaquetas (400×10^9 plaquetas/litro de sangue) seja mantido (103).

Através de ciclos repetidos de replicação de DNA sem divisão celular, os megacariócitos sofrem endomitose e se tornam poliplóides (104). Após processo de endomitose, é iniciado o estágio de maturação, no qual o citoplasma é preenchido por organelas, adquirindo características que incluem o desenvolvimento do sistema de demarcação de membranas (SDM), sistema tubular denso, SCA e a formação dos grânulos (105). Proteínas específicas associadas as plaquetas, tais como os receptores de fibrinogênio são sintetizados e expressos na superfície do megacariócito, enquanto outras são empacotadas em grânulos secretórios, como o vWF. Outras proteínas são endocitadas pelo megacariócito e seletivamente empacotadas em grânulos específicos (106).

Os modelos de formação de plaquetas propostos incluem o brotamento de plaquetas (107) e fragmentação citoplasmática via SDM

(108). Além disso, trabalhos demonstram que ao final do estágio de maturação, os megacariócitos formam longas e múltiplas extensões citoplasmáticas chamadas pró-plaquetas, que cruzam a barreira endotelial, entram nos sinusóides liberando-as na circulação, onde formam as plaquetas por fragmentação de suas extremidades (109).

2.2.2 Morfologia das plaquetas

As plaquetas são células pequenas anucleadas com tamanho que varia entre 2 a 5 μ m de diâmetro que estão presentes na circulação até serem sequestradas e fagocitadas pelo sistema retículo-endotelial (110). Ao microscópio eletrônico, a membrana plasmática de plaquetas em repouso possui aparência rugosa, na forma discóide devido à presença de microtúbulos (111), com dobras que permitem alterações da membrana e por consequência, da sua morfologia quando ativadas (112). Pequenas aberturas do SCA, composto por invaginações da membrana plasmática, se estendem na superfície da plaqueta e permitem que o conteúdo dos grânulos seja secretado quando os mesmos se fundem à membrana plasmática ou a alguma região do SCA durante a ativação (Figura 7) (111).



Figura 6. Morfologia de plaquetas. (A) Estrutura celular da plaqueta em repouso por microscopia eletrônica de transmissão, mostrando as organelas celulares. Figura extraída de Semple e colaboradores, 2011 (113). (B) Diferença entre a plaqueta quiescente com formato discóide e plaqueta ativada exibindo aspecto lamelar. A seta demarca os poros do SCA (aumento x 15.000). (C) Plaqueta ativada exibindo longos filopódios (aumento x 13.000). (B) e (C) foram extraídas de White, 2007 (110).

Microfilamentos de actina submembranares são encontrados, contribuindo para as mudanças morfológicas como a formação de filopódios e translocação de receptores e partículas para a superfície celular no estado ativado (110). Apesar de serem anucleadas, as plaquetas possuem uma zona de organelas complexa, contendo três tipos principais de grânulos secretórios: grânulos α , corpos densos e lisossomos. Corpos multivesiculares também estão presentes; já formados no megacariócito, através da fusão de pequenas vesículas que brotam da zona trans-Golgi e servem como estações de triagem para o desenvolvimento dos três grânulos (110). Uma pequena quantidade de mitocôndrias está presente no citoplasma, que estão envolvidas no metabolismo energético oxidativo (111). Outras organelas envolvidas por membrana e estruturas são encontradas, tais como glicossomos, cadeias e clusters elétron densos e inclusões tubulares (110).

Os grânulos α são os mais abundantes, aproximadamente 50 a 80 grânulos α por plaqueta, representando cerca de 10% do volume plaquetário (114). No megacariócito, os grânulos α podem ser formados a partir dos corpos multivesiculares; através da junção de proteínas de revestimento (como clatrina), proteínas adaptadoras, maquinaria de fusão e GTPases monoméricas. A maturação dos grânulos continua na plaqueta circulante por endocitose da membrana plasmática, que é realizada por uma via dependente de clatrina (115) e é uma atividade constitutiva de plaquetas em repouso. O conteúdo dos grânulos α inclui tanto proteínas de membrana que são expressas na superfície da plaqueta, como a CD62P, como proteínas solúveis que são liberadas na matriz extracelular. Sabe-se que, quando ativadas, as plaquetas podem secretar centenas de proteínas solúveis de seus grânulos α (114), que incluem moléculas pró-coagulantes (Fator V, multimerina, Fator VIII), reguladores fibrinolíticos (α 2-macroglobulina, plasminogênio, inibidor 1 do ativador de plasminogênio), fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal, fator de crescimento hepático, fator de crescimento insulina-símile 1, fator de crescimento transformador β – TGF- β , fator de crescimento endotelial vascular – VEGF, fator de crescimento derivado de plaqueta), quimiocinas

(fator plaquetário 4 - CXCL4/PF4, β -tromboglobulina, CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL17/TARC, CXCL1/KC, CXCL5/ENA-78, CXCL8/IL-8) e moléculas de adesão (CD62P, vWF, trombospondina, fibrinogênio, integrina α IIB β 3, fibronectina) (116). A secreção dos grânulos plaquetários será discutida adiante.

Os grânulos densos são menos abundantes que os grânulos α , possuem meio ligeiramente ácido (pH 6,1) e contém íons (cálcio, magnésio, fósforo e pirofostato), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), proteínas de membrana lisossomal (LAMP-2 e LAMP-3) e serotonina (116).

As plaquetas humanas contem poucos lisossomos; geralmente uma plaqueta possui de zero a três lisossomos. Eles são esféricos, ligeiramente menores que os grânulos α e seu conteúdo inclui pelo menos 13 hidrolases ácidas além de catepsina D e E, e proteínas de membrana lisossomal (LAMP-1, LAMP-2 e CD63) (110). A função dos lisossomos plaquetários na hemostasia é desconhecida, porém durante um contexto de ativação *in vitro*, além da secreção de grânulos α e grânulos densos, o conteúdo dos lisossomos também é exocitado (117). A secreção de lisossomos após ativação de plaquetas *in vivo* também já foi relatada (118). Quando partículas sintéticas como látex são endocitadas por plaquetas através do SCA, elas são transferidas aos grânulos α , mas também podem reagir com lisossomos (119), que seriam, portanto, um compartimento plaquetário de digestão endossomal (110).

2.3 Síntese e secreção de mediadores de coagulação e imunológicos

Quando estimuladas e ativadas, as plaquetas secretam mediadores dos grânulos armazenados ou sintetizados que atuam em diversas funções como exemplificadas na Tabela 1. Alguns agonistas envolvidos na ativação plaquetária incluem ADP, tromboxano A_2 (TXA $_2$), colágeno, serotonina, epinefrina e trombina (120), além de patógenos e toxinas (Figura 8) (121).

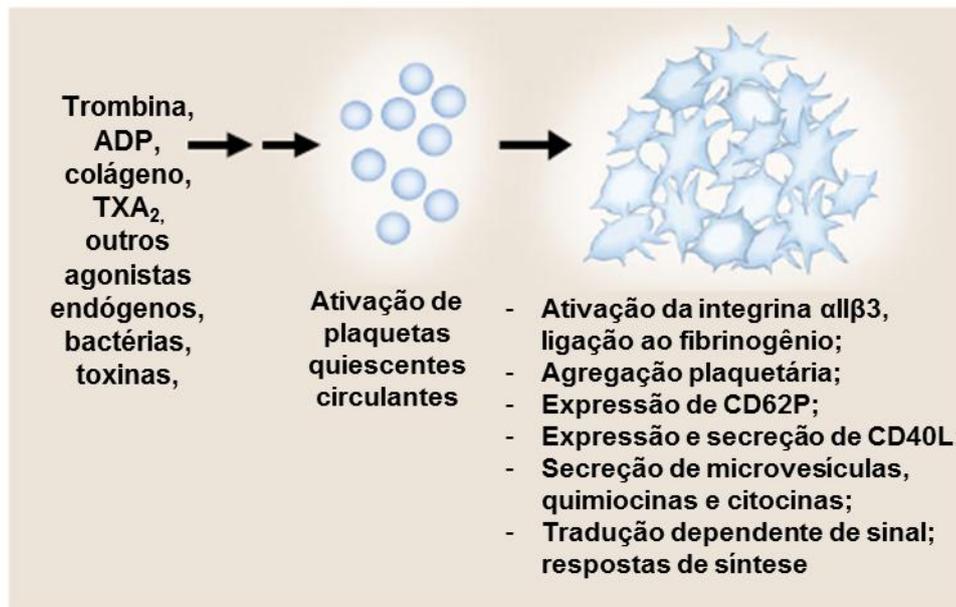


Figura 7. Ativação de plaquetas por agonistas. Plaquetas ativadas por agonistas realizam sinalização intracelular, resultando em respostas funcionais que mediam eventos importantes na inflamação e hemostasia. Figura adaptada de Vieira-de-Abreu e colaboradores, 2012 (121).

Sabe-se que plaquetas ativadas realizam tradução de mRNA e transcrição de proteínas em resposta a sinais de ativação (122). A síntese *de novo* acontece porque plaquetas possuem um repertório complexo pós-transcricional para a tradução após ativação (123). Essa via é possível uma vez que megacariócitos transferem pré-mRNAs específicos para as plaquetas durante a plaquetopoiese, como no caso do pré-mRNA de TF que é processado a mRNA maduro e traduzido em TF biologicamente ativo, um mediador inflamatório regulador da coagulação (124).

Tabela 1. Mediadores imunológicos, inflamatórios e anti-microbianos liberados por plaquetas ativadas

Classe do mediador	Fator	Sintetizado ou armazenado	Célula alvo
Inflamatórios pleiotrópicos e imunomoduladores	Histamina	Sintetizado	CEs, monócitos, PMNs, células NK, T e B, eosinófilos
Lipídeos imunomoduladores e inflamatórios	Serotonina	Armazenado	Macrófagos, monócitos, DCs
	TXA ₂	Sintetizado	Plaquetas, células T e macrófagos
	PAF	Sintetizado	Plaquetas, PMNs, monócitos, macrófagos e linfócitos
Fatores de crescimento	PDGF	Armazenado	Monócitos, macrófagos, células T
	TGF-β	Armazenado	Monócitos, macrófagos, células T e B
Quimiocinas	NAP2/CXCL7	Proteólise de precursores armazenados	PMNs
	PF4/CXCL4	Armazenado	PMNs, monócitos, macrófagos
	GRO-α/CXCL1	Armazenado	PMNs
	ENA-78/CXCL5	Armazenado	PMNs
	SDF-1/CXCL12	Armazenado	Células progenitoras derivadas da medula óssea?
	MIP-1α/CCL3	Armazenado	Monócitos, eosinófilos, basófilos, células NK, T e DC
	MCP-3/CCL7	Armazenado	Monócitos, basófilos, células NK e DC
Molécula de co-estimulação	CD40L/CD154	Armazenado	CEs, monócitos, DC, linfócitos
Citocinas	IL-1β	Sintetizado	Monócitos, macrófagos, DC, linhagens de células T
	IL-1α	Armazenado?	Monócitos, macrófagos, DC, linhagens de células T
	GM-CSF	Armazenado	Eosinófilos
Peptídeos antimicrobianos	Trombocidinas	Armazenadas/Clivadas proteolicamente	Bactérias e fungos

Lista de alguns mediadores e moléculas armazenados e sintetizados por plaquetas. Várias outras moléculas são produzidas e armazenadas em grânulos plaquetários (125-127). Abreviações: CEs, células endoteliais; PMNs, células polimorfonucleares; NK, células *natural killer*; DCs, células dendríticas. Tabela modificada de Weyrich & Zimmerman, 2004 (102).

A exocitose ocorre por mecanismos homólogos aos de células secretórias. O processo envolve reorganização da estrutura de actina, translocação dos grânulos para a membrana plasmática, fusão do grânulo às membranas do SCA e liberação do conteúdo intracelular. A secreção acontece através de mecanismo altamente regulado dependente de SNARE (receptor de ligação ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida). As principais SNARE são as sintaxinas VAMPs e SNAPs (proteína associada ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida) (128). As SNAREs associadas com grânulos são chamadas SNAREs vesiculares (vSNAREs), enquanto aquelas associadas às membranas plasmática e do SCA são chamadas tSNAREs. A associação entre vSNARE e tSNARE produz a energia necessária para a fusão das membranas. As proteínas conservadas Sec1-Munc18 (SM) realizam essa função. As plaquetas humanas possuem as proteínas SM Munc18a, Munc18b e Munc18c (129), sendo que dessas, a Munc18c forma um complexo com a sintaxina 4, o qual se dissocia durante ativação, estimulando a secreção dos constituintes dos grânulos (130). As proteínas Rab, GTPases de baixo peso molecular, também são capazes de modificar a função das SNAREs. Plaquetas possuem as Rabs 1, 3b, 4, 6, 8, 11, 27 e 31 e quando ativadas, fosforilam as Rabs 3b, 6c e 8 (116). Estudos sugerem que a secreção de grânulos densos é regulada pela Rab 27b (131).

2.4 Receptores na fisiologia das plaquetas

Os receptores plaquetários são responsáveis por mediar o contato plaqueta com plaqueta e plaquetas com outras células como, por exemplo, as células endoteliais. Os receptores plaquetários são essenciais para a manutenção da hemostasia, mas também podem estar relacionados a outras funções das plaquetas como a resposta imunológica contra patógenos. As plaquetas possuem receptores comuns a outras células, mas também expressam receptores exclusivos ou que estão presentes em raras células (37).

As integrinas são a principal classe de moléculas de adesão e sinalização presentes em vários tipos celulares e são formadas por heterodímeros de subunidades α e β (132). As plaquetas expressam seis diferentes integrinas, sendo que dessas, a que é expressa exclusivamente por plaquetas é a integrina α IIb β 3, ou complexo GPIIb-IIIa (CD41/CD61) que é essencial para a agregação plaquetária (133, 134). A α IIb β 3 possui vários ligantes, dentre eles fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, trombospondina-1 e vWF (135) e reconhece a sequência peptídica Arg-Gli-Asp (RGD) dos ligantes (136). Peptídeos sintéticos contendo sequências RGD podem inibir a agregação plaquetária ao prevenir que as integrinas plaquetárias se liguem aos ligantes naturais, sendo por isso alvo terapêutico (136). As mudanças conformacionais do domínio extracelular da α IIb β 3 aumentam a sua afinidade pelos ligantes solúveis, processo chamado de sinalização de dentro para fora, que ocorre durante a estimulação plaquetária (137-139), (137, 140). O colágeno e o vWF expostos no endotélio durante injúria vascular são importantes iniciadores da ativação da α IIb β 3 (141), assim como os agonistas ADP e TXA₂ e trombina (142).

A expressão dos receptores do tipo Toll (TLR) em plaquetas é uma forte evidência da participação destas células na resposta imune (102). Inicialmente foi demonstrada a expressão de TLR1, TLR2 e TLR3 por Shiraki e colaboradores (143) e subseqüentemente, a expressão de TLR1-9. Os receptores Toll são proteínas transmembranares conservadas durante a evolução, primeiramente identificados em *Drosophila sp* (144), que possuem uma família homóloga em mamíferos. Humanos possuem dez TLR funcionais (TLRs 1-10) (145). Os TLR 1, 2, 4, 5, 6 e 10 são expressos na superfície celular e migram para os fagossomos após ativação. Os TLR 3, 7, 8 e 9 reconhecem sequências de ácidos nucleicos e são confinados a compartimentos endossomais (146). Todos os TLRs reconhecem motivos conservados comuns, os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), em bactérias, vírus, fungos e outros patógenos. Ligantes para os TLR 1-9 já foram identificados, com exceção do TLR10 (147). Os TLR são expressos em uma ampla variedade de

células, incluindo células B, alguns tipos de células T, monócitos, DCs, macrófagos, certas células endoteliais e muitas outras células do sistema imune (145).

Dentre as funcionalidades dos TLRs nas plaquetas, tem-se o TLR4 que é capaz de modular a plaquetopenia na sepse e induzir a produção de TNF- α *in vivo* (148-152). Sabe-se que o fibrinogênio já foi relatado como ligante para o TLR4 em macrófagos, induzindo secreção de quimiocinas (153) e em monócitos, induzindo a produção de IL-8 (154), porém não se sabe se o fibrinogênio é reconhecido pelo TLR4 em plaquetas. Há evidências da funcionalidade do TLR2 em plaquetas, uma vez que o tratamento com agonistas de TLR2 induz o processamento de RNA da IL-1 β (155). Essa sinalização induz a produção de INF do tipo 1 e de outras citocinas inflamatórias e então uma cascata de eventos de sinalização ocorre em células próximas à fonte de IFN (Figura 9).

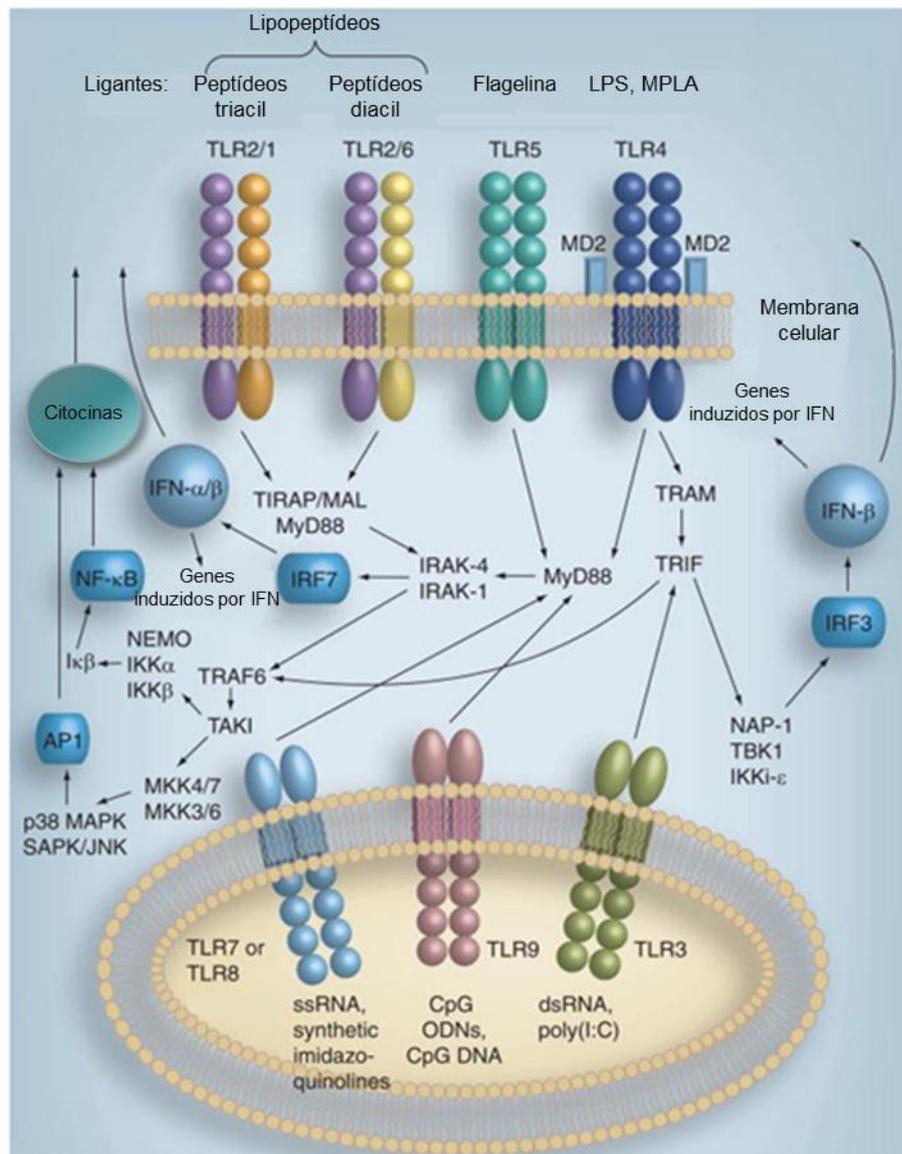


Figura 8. Reconhecimento de PAMPs por TLRs e vias de sinalização. Os TLRs iniciam complexas vias de sinalização intracelular resultando na produção de várias citocinas que ditam respostas imunes específicas. Os ligantes típicos para os TLRs representados são mostrados. Figura adaptada de Black e colaboradores, 2010 (156).

As plaquetas também expressam outros receptores do sistema imune, como FcγRIIA, GPVI e receptor CLEC-2 (157). A ativação da GPVI, que também possui o colágeno como ligante, e de CLEC-2 induz a ativação da GPIIb-IIIa e a secreção de grânulos α (158). Plaquetas são capazes de reconhecer bactérias como *Staphylococcus aureus* através da ligação do FcγRIIA plaquetário à IgG ligada à bactéria paralelamente à ligação de fibrinogênio à GPIIb-IIIa (159).

Os receptores ativados por protease (PAR) acoplados à proteína G são importantes receptores plaquetários que tem como ligante a

trombina. A ativação por trombina promove alteração morfológica de plaquetas, síntese e secreção de TXA_2 (160), mobilização de CD62P e CD40L para a membrana plasmática (161, 162) e ativação da GPIIb-IIIa (135). O ADP é outro importante agonista plaquetário, reconhecido pelos receptores acoplados à proteína G P2Y_1 e P2Y_{12} (163). A estimulação de P2Y_{12} também é essencial para a ativação da GPIIb-IIIa mediada por ADP, sendo considerado portanto um alvo para intervenções terapêuticas nas desordens trombóticas (164). A sinalização através de receptores purinérgicos induz funções hemostáticas e imunes de plaquetas, assim como a ativação por receptores PAR (165).

O TXA_2 participa da indução da agregação, adesão, reconhecimento de fibrinogênio e outros ligantes pela GPIIb-IIIa e potencializa a ativação plaquetária por trombina (166). O receptor de TXA_2 (TP) é um receptor da família das prostaglandinas e em plaquetas existe sob duas isoformas, $\text{TP}\alpha$ e $\text{TP}\beta$, que quando estimuladas, ativam a fosfolipase C, iniciando a sinalização intracelular (167). Outro receptor da família das prostaglandinas é o receptor de prostaglandina E_2 (PGE_2). A PGE_2 em baixas concentrações potencializa a ativação plaquetária por ADP e colágeno, porém em concentrações mais elevadas inibe a agregação plaquetária (168).

O receptor que reconhece PAF (PAFR) também é um receptor acoplado à proteína G é expresso por plaquetas e por leucócitos. O PAF é um ativador de plaquetas, neutrófilos e monócitos em respostas inflamatórias, e sua sinalização conecta as respostas inflamatórias e hemostáticas (169). Ele é um potente indutor da formação de agregados plaquetários e na interação neutrófilos e plaquetas e monócitos (170).

Plaquetas também possuem receptores de quimiocinas como CXCR4, CCR4, CCR1 e CCR3 (171, 172). O CXCR4 é o receptor de CXCL12/SDF-1 também encontrado em megacariócitos, e juntamente com a TPO, pode participar da megacariocitopoiese, translocando megacariócitos da medula óssea para o nicho vascular (173). Pouco se sabe sobre o CCR4 em plaquetas, porém já foi demonstrado que o bloqueio de CCR4 inibe a agregação plaquetária induzida por outras

quimiocinas (174). Acredita-se que os receptores de CCL5/RANTES CCR1 e CCR3 podem participar de mecanismos de *feedback* positivo autócrino, já que o RANTES/CCL5 é secretado por plaquetas ativadas (172).

2.5 O papel das plaquetas na hemostasia e coagulação e alteração desses mecanismos na dengue

A hemostasia é um processo dinâmico no qual mecanismos físicos e bioquímicos promovem a coagulação sanguínea (parada da perda de sangue em um vaso danificado) de forma rápida e regulada. Os ativadores solúveis fisiologicamente importantes incluem TXA_2 , ADP e trombina (175). A adesão e ativação das plaquetas são mediadas através das interações entre os receptores GPIb-IX-V com o vWF e GPVI com o colágeno subendotelial (176). Alternativamente, quando o endotélio vascular é danificado sítios de colágeno são expostos facilitando a adesão de plaquetas nestes sítios específicos. As plaquetas se aderem a moléculas nos tecidos subendoteliais no sítio da lesão, agregando-se e iniciando a cascata de coagulação (177).

Os fatores de coagulação presentes na circulação sanguínea estão envolvidos em uma sequência rigorosamente controlada de reações de ativação que resultam na formação de trombina e subsequentemente de fibrina. Esses fatores circulam na forma de zimogênios, que requerem processamento por proteólise para que sejam ativados. De acordo com o novo modelo de coagulação sanguínea, a mesma ocorre em três estágios que se sobrepõem: fase de iniciação, fase de amplificação e fase de propagação (Figura 9) (178).

A fase de iniciação ocorre com a exposição do fator tecidual na superfície celular, como por exemplo, em células subendoteliais e monócitos ativados. O complexo tenase extrínseco (TF/FVIIa) é produzido, resultando na formação de FXa e FIXa, e na geração de pequenas quantidades de trombina. Essa fase de iniciação é regulada pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI): o FXa formado no início da coagulação se liga ao TFPI, levando à inibição do complexo TF/FVIIa, constituindo um

feedback negativo. Na fase de amplificação, a trombina formada na fase inicial é essencial para a ativação de plaquetas e dos co-fatores das enzimas FXa e FIXa, respectivamente FV e FVIII, permitindo a amplificação da geração de trombina. Assim, o FXa constituinte do complexo protrombinase é protegido da inibição por antitrombina. Na fase de propagação, grandes quantidades de trombina são geradas na superfície da plaqueta ativada, onde a exposição de fosfolípidos aniônicos, especialmente fosfatidilserina, é essencial para a formação dos complexos tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa/FX) e protrombinase (FXa/FVa/protrombina). Níveis mais elevados de trombina levam à ativação de FXI, disponível no plasma e também liberado dos grânulos α de plaquetas. A superfície da plaqueta ativada protege ainda o FXIa da inibição por inibidores plasmáticos. O FXIa pode induzir a formação maciça de trombina através da ativação mais eficiente de FIX na superfície da plaqueta ativada (178).

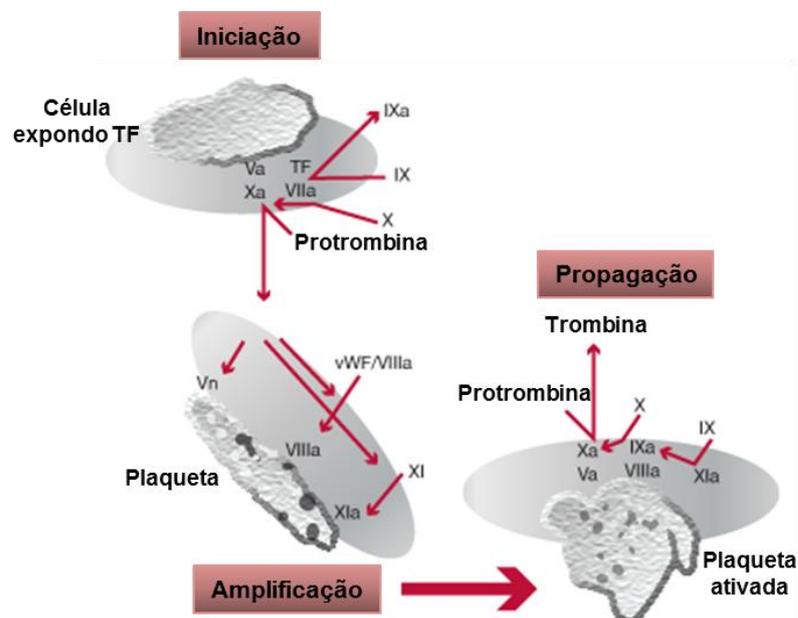


Figura 9. Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares. As três fases da coagulação ocorrem em superfícies celulares. A fase de iniciação ocorre em células que apresentam TF em sua superfície, a fase de amplificação na superfície de plaquetas ao serem ativadas e a fase de propagação ocorre na superfície de plaquetas já ativadas. Figura modificada de Hoffman e colaboradores, 2001 (179).

Vários mecanismos reguladores estão presentes no endotélio vascular a fim de estabelecer o limiar de ativação para a hemostasia. As

células endoteliais separam fisicamente o sangue do subendotélio, que possui substâncias pró-hemostática. Além disso, o endotélio sintetiza e libera prostaglandina I_2 (prostaciclina) e óxido nítrico, que são vasodilatadores que reduzem a resposta plaquetária a estímulos ativadores da hemostasia primária (178).

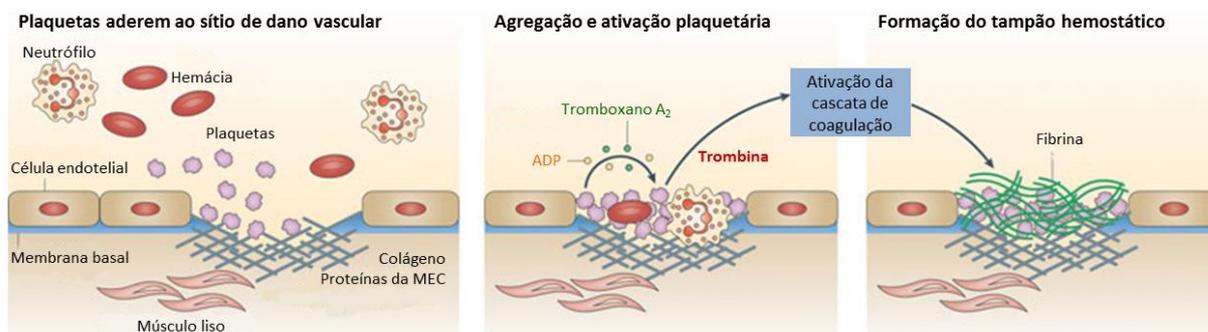


Figura 10. Papel das plaquetas na hemostasia. As plaquetas se agregam quando há dano do endotélio vascular e exposição de colágeno e de proteínas da matriz extracelular (MEC). As plaquetas ativadas liberam mediadores de ativação como TXA_2 e ADP. Após ativação, as plaquetas produzem trombina, catalisando a propagação da cascata de coagulação e eventualmente formando o depósito de fibrina. Figura adaptada de Semple e colaboradores, 2012 (113).

Autores já sugeriram um papel significativo do sistema de cininas plasmáticas na imunopatogênese da dengue, uma vez que níveis de pré-caliceína, fator XII e componente C3 do sistema complemento estavam significativamente reduzidos em pacientes com FHD em comparação a pacientes com outras doenças febris. Interessantemente, os menores níveis foram observados em pacientes com SCD. Entretanto, as concentrações de bradicinina não estavam aumentadas e os níveis de atividade média dos inibidores de caliceína não estavam reduzidos em pacientes infectados pelo DENV (180). Ainda, Funahara e colaboradores (1983) descreveram que todos os pacientes com FHD apresentam DIC do tipo agudo, nos quais é possível observar aumento transitório do tempo de tromboplastina parcial ativada e do tempo de protrombina, e redução da contagem de plaquetas, fibrinogênio, protrombina, fator VIII, plasminogênio e de atividade da antitrombina III (181, 182). O mesmo grupo demonstrou mais tarde que o tipo agudo de DIC que ocorre na FHD está associada ao aumento da permeabilidade vascular (182). Outro estudo determinou que o tempo de protrombina (PT) e tempo de

tromboplastina (PTT), mas não o percentual do hematócrito e a contagem de plaquetas, podem ser índices de propensão à sangramentos em pacientes com FHD (183).

2.6 O papel das plaquetas na resposta imunológica

Ao interagir fisicamente com leucócitos e células endoteliais, as plaquetas atuam como sinalizadoras que conectam a inflamação à hemostasia (184-186). Os mediadores e proteínas de adesão expressas nas plaquetas ativadas facilitam tanto as interações homotípicas entre plaquetas quanto as interações heterotípicas entre plaquetas e células endoteliais e leucócitos. A CD62P, por exemplo, medeia a adesão de plaquetas ao ligante 1 da glicoproteína P-selectina (PSGL-1) expressos em polimorfonucleares e monócitos (187, 188). Uma vez que a PSGL-1 também está presente em linhagens de linfócitos T; plaquetas ativadas influenciam o padrão migratório de linfócitos T por meio de mecanismo dependente de CD62P (189).

O ligante de CD40 (CD40L/CD154) é constitutivamente expresso em plaquetas (190). Sabe-se que o CD40L plaquetário pode interagir com o CD40 em células endoteliais, induzindo a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 e secreção de CCL2, promovendo o recrutamento leucocitário ao sítio inflamatório (191). Plaquetas ativadas também liberam CD40L solúvel, que pode induzir a expressão de CD62E e CD62P em células endoteliais, bem como a secreção de IL-6 e TF (192). A maior parte do CD40L solúvel no plasma humano é gerada de plaquetas ativadas (190). O CD40L derivado de plaquetas também é capaz de auxiliar a diferenciação de linfócitos B e a mudança de classe de imunoglobulinas. O CD40L plaquetário também é capaz de interagir com células T CD8⁺, promovendo a amplificação da resposta de linfócitos T protetora após infecção (193). Em DCs, o CD40L de plaquetas ativadas ou em repouso reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12p70 e TNF e induzem a produção de IL-10 pelas DC (194). Além do CD40L, plaquetas também têm o potencial de ativar as DCs através da secreção local de IL-1 β (195) e RANTES/CCL5

(196), os principais reguladores da atividade da DC. Esses estudos sugerem que o CD40L expresso por plaquetas pode estar envolvido na regulação da resposta imune adaptativa.

Monócitos e polimorfonucleares são capazes também de aderir às plaquetas de forma dependente de Mac-1 (CD11b/CD18), através dos receptores plaquetários GPIIb/IIIa (197), molécula de adesão juncional C (JAM-C, JAM-3) (198), CD40L (199), ICAM-2 (200) e proteínas ponte como o fibrinogênio (201). A expressão de TLRs é outro indício da participação de plaquetas na imunidade inata.

Os fatores liberados dos grânulos α de plaquetas ativadas possuem atividade antibacteriana e são capazes de ativar respostas inflamatórias, contribuindo para a eliminação do patógeno (127).

2.7 Plaquetas e viroses

A plaquetopenia é uma complicação frequentemente observada em infecções virais, evidenciando o fato de que a interação de plaquetas e vírus é um fenômeno patológico importante (202). As primeiras evidências da interação entre plaquetas e vírus foram relatadas por Danon e colaboradores (1959), ao observarem plaquetas incorporando partículas virais de influenza por microscopia eletrônica (203). Estudos posteriores demonstraram que plaquetas endocitam vírus em compartimentos especializados, que então se fundem aos grânulos secretórios, destruindo microorganismos (204).

A plaquetopenia é uma manifestação clínica comum durante a infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) (205). Alguns autores já demonstraram que plaquetas são capazes de endocitar partículas de HIV (202, 204, 206) em vesículas ou no lúmen do SCA. As partículas virais localizadas em vesículas endocíticas se apresentaram intactas, com envelope, porém as partículas do SCA se encontraram fracamente delimitadas e irregulares, indicando destruição pelo conteúdo dos grânulos secretórios (Figura 12) (202). Essa interação com o vírus pode contribuir para a plaquetopenia em pacientes HIV⁺, pois plaquetas

ativadas aumentam a expressão de CD62P e, ao interagir com macrófagos através da P-selectina são fagocitadas, auxiliando na resposta à infecção.

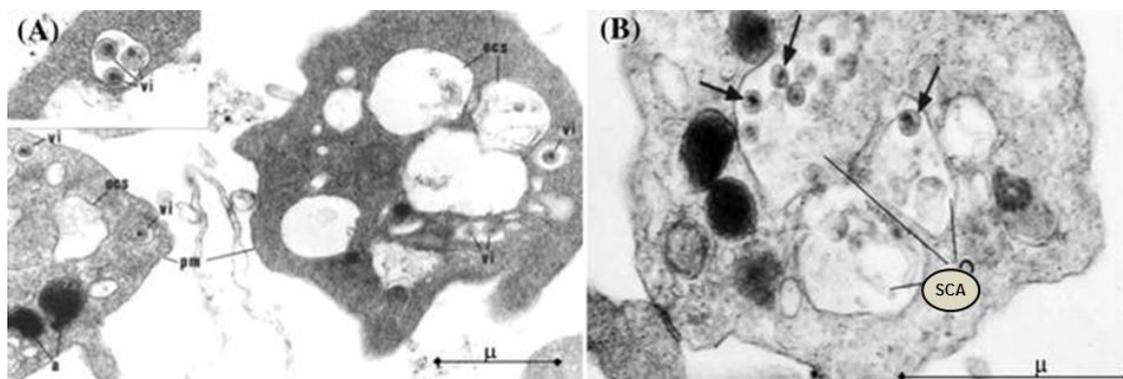


Figura 11. Microscopia eletrônica de plaquetas incubadas com HIV. Imagens características de partículas virais intactas em vesículas endocíticas (vi) em (A) e no SCA em (B). Adaptado de Flaujac e colaboradores, 2010 (202).

Integrinas e receptores FcγRII podem estar envolvidos na interação de plaquetas com vírus (202). Alguns exemplos incluem rotavírus, que podem interagir com plaquetas através da integrina α IIb β 1 (207); adenovírus possuem a sequência RGD que é reconhecida pela integrina α IIb β 3 de plaquetas, e após internalização, induz ativação e agregação plaquetária (208); vírus Epstein Barr são capazes de se ligar ao receptor de complemento CR2 em plaquetas e induzir a secreção de TGF- β (209) e finalmente, vírus da hepatite C é capaz de interagir com plaquetas através da GPVI, um mecanismo que pode estar relacionado ao transporte de partículas virais para o fígado (210). O HIV também interage com plaquetas através de DC-SIGN e de CLEC-2 (211), que são importantes para a internalização das partículas virais.

A interação entre plaquetas e vírus é um importante mecanismo de ativação de resposta inflamatória. Plaquetas que se aderem às células de HUVEC infectadas *in vitro* com DENV-2 são estimuladas a aumentar a expressão de CD62P, promovendo a ativação e agregação plaquetária (212). A infecção por adenovírus induz a ativação plaquetária, aumentando a expressão de CD62P e vWF, a agregação plaquetas-leucócitos e promove trombocitopenia em modelo animal (213).

2.7.1 Na dengue

Uma descrição da cinética da contagem de plaquetas na FD e FHD revela uma redução branda ou moderada significativa do terceiro ao sétimo dia de doença e atinge níveis normais no oitavo ou nono dia (2, 214). A contagem de plaquetas pode ser um indicador de mortalidade, uma vez que a mortalidade é seis vezes maior em pacientes com contagem de plaquetas $< 50.000/\mu\text{L}$ em comparação a pacientes que apresentam contagem de plaquetas $> 50.000/\mu\text{L}$ (183).

A plaquetopenia é uma das manifestações clínicas chave em pacientes infectados pelo dengue e pode ser induzida direta ou indiretamente pelo vírus. Estudos anteriores demonstram que durante a fase aguda da doença, a medula óssea apresentam hipocelularidade e redução da maturação de megacariócitos (2, 215).

Os mecanismos precisos de supressão da medula óssea induzida pelo DENV durante a fase aguda ainda não foram completamente elucidados. Esta supressão pode ocorrer diretamente, devido à infecção dos progenitores hematopoiéticos, como recentemente demonstrado *in vivo* (41) ou por alterações das células estromais, alterando o perfil de citocinas na medula (216). Outro mecanismo importante são as alterações na regulação da medula óssea (217). Nesse contexto, a TPO regula a megacariocitopoiese a produção de plaquetas especificamente através da ativação do c-MPL (do inglês, *Myeloproliferative leukemia virus oncogene*), o receptor de TPO (218, 219). Pelo fato da TPO estar elevada quando a produção de plaquetas está reduzida, os níveis séricos de TPO podem ser um indicador de megacariocitopoiese na doença (220). De fato, Matondang e colaboradores (2004) observaram que os níveis de TPO estavam significativamente elevados em pacientes adultos infectados pelo DENV nos quais os níveis de plaquetas estavam bastante reduzidos, portanto inversamente correlacionados à contagem plaquetária (221). Como já mencionado, a detecção de quantidade expressiva de RNA do vírus DENV em megacariócitos e de partículas virais em plaquetas (Figura 13) de primatas não humanos infectados pelo DENV-2 por Noisakran e

colaboradores (2012), sugere que a infecção da medula óssea pode ser um fator que contribui para a plaquetopenia (41).

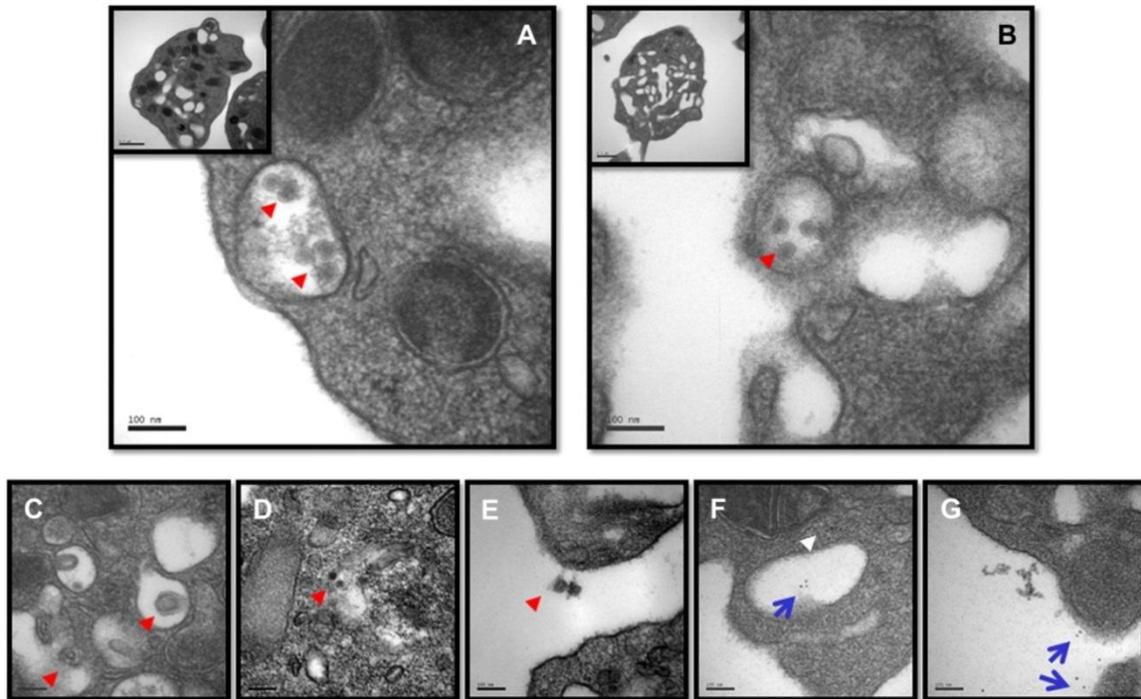


Figura 12. Partículas DENV-like em plaquetas. As plaquetas foram isoladas de macacos rhesus infectados pelo DENV-2 e avaliadas por microscopia eletrônica. Em (A – D) as setas vermelhas indicam partículas DENV-like no interior da plaqueta. (E) Partículas virais brotam de plaquetas, deixando uma substância na superfície da célula. (F – G) Microscopia eletrônica com marcação imune de partículas virais em vesícula (seta azul) e no citoplasma (seta branca). Figura retirada de Noisakran e colaboradores (2012) (41).

A plaquetopenia pode ser devida ainda: 1) ao consumo de plaquetas durante o processo de coagulopatia; 2) à ativação do sistema complemento (212); 3) ao aumento do sequestro periférico (214, 222). Durante a infecção, a destruição de plaquetas pode ser induzida por diferentes mecanismos. Lin e colaboradores (2011) propuseram que o mimetismo molecular entre plaquetas, células endoteliais e moléculas envolvidas na coagulação com as proteínas virais NS1, prM e E poderiam explicar a reação cruzada de anticorpos anti-NS1, anti-prM e anti-E que se ligam à proteínas do hospedeiro, incluindo plaquetas, facilitando a sua remoção (223). A hipótese de destruição plaquetária por mecanismo autoimune também é apoiada pelas observações de que pacientes com dengue grave apresentam mais anticorpos IgM anti-plaquetas que

pacientes brandos e que, na presença de complemento, o soro de pacientes provocava a lise plaquetária (224); níveis de imunoglobulinas associadas à plaquetas (PAIgG e PAIgM) estão aumentados em pacientes com FHD e inversamente correlacionados à contagem de plaquetas (36), bem como aumento da fagocitose de plaquetas por macrófagos em pacientes com níveis de PAIgG elevados (225); imunoglobulinas anti-NS1 de pacientes com FD e FHD são capazes de opozinar plaquetas e aumentar a fagocitose por macrófagos *in vitro*, além de induzir a ativação plaquetária e a plaquetopenia em camundongos (226).

Observou-se em modelos de infecção que monócitos fagocitam plaquetas que contem antígeno viral E (227). Além disso, foi demonstrado que a interação *in vitro* com o DENV estimula a ativação plaquetária, aumentando a expressão de CD62P, ligação de fibrinogênio, alterações morfológicas (38). Além da detecção de partículas virais em plaquetas de pacientes (Figura 14) como já mencionado anteriormente e também de RNA viral isolado de plaquetas de pacientes com infecção secundária (40), Noisakran e colaboradores demonstraram que um baixo nível de produção viral ocorre em plaquetas infectadas pelo DENV com um pico em 18 horas após a infecção, sugerindo assim que o vírus é capaz de se replicar em plaquetas (228).

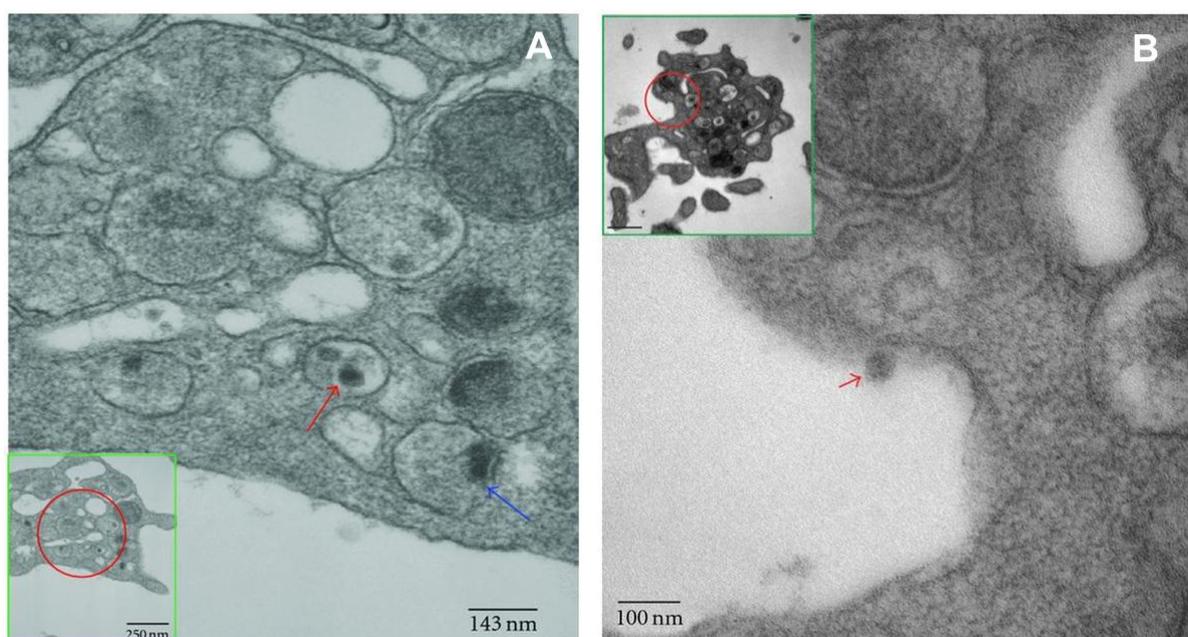


Figura 13. Partículas DENV-like em plaquetas isoladas de paciente DENV⁺. Microscopia eletrônica de transmissão de plaquetas isoladas de pacientes na fase aguda da infecção pelo DENV. (A) Partículas DENV-like no interior de vesículas (seta vermelha) e partícula aparentemente brotando de outra vesícula (seta azul). (B) Partícula DENV-like sendo secretada de uma plaqueta (seta vermelha). Figura adaptada de Noisakran e colaboradores, 2010 (228).

Algumas citocinas e mediadores inflamatórios que estimulam a agregação plaquetária tem sua produção aumentada durante a infecção pelo DENV e estão correlacionadas à plaquetopenia, como o PAF (229), vWF, TF, PAI-1 (230), IL-1 β e TNF- α (94).

O conhecimento sobre o envolvimento das plaquetas tanto na manutenção da hemostasia como na mediação da resposta imunológica vem crescendo. Na dengue, as plaquetas constituem uma das populações celulares mais afetadas por mecanismos diretos ou indiretos da infecção. Desta forma, estudos que possam contribuir na compreensão da plaquetopenia, assim como nas alterações funcionais das plaquetas na dengue são de extrema importância para o entendimento da patogenia e no avanço de esquemas terapêuticos durante a infecção humana pelo dengue.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar alterações nas plaquetas durante infecção humana e *ex vivo* pelo DENV, observando sua morfologia, perfil de ativação e expressão de receptores do tipo Toll, interação com o vírus e relação com proteínas plasmáticas associadas à sua funcionalidade.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de marcadores de ativação (CD62P e Fibrinogênio) e receptores da imunidade inata (TLR2 e TLR4) em plaquetas de doadores saudáveis após estimulação com trombina ou DENV-2.
- Avaliar o impacto da interação do DENV-2 com plaquetas de doadores saudáveis, observando o perfil morfológico e detecção do vírus.
- Avaliar a expressão de marcadores de ativação (CD62P e CD40L) e receptores da imunidade inata (TLR2 e TLR4) em plaquetas de pacientes infectados pelo DENV.
- Avaliar o perfil morfológico e detecção do vírus em plaquetas de pacientes infectados pelo DENV na fase aguda da infecção.
- Quantificar moléculas associadas à ativação plaquetária (CD62P, NO, TXB₂, e TFPI) e quimiocinas (CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1) no plasma de pacientes infectados pelo DENV.

4. Materiais e métodos

4.1 Obtenção de plaquetas do sangue periférico de doadores saudáveis

Para obtenção de plaquetas de doadores saudáveis, cerca de 30 mL de sangue foram coletados a vácuo em tubo contendo anticoagulante ACD (citrato de sódio 22 g/L, ácido cítrico 8 g/L e dextrose 24,5 g/L) (BD Vacutainer®, catálogo # 364606). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido centrifugando-se o tubo de sangue a *150g* por 15 minutos, sem freio, à temperatura ambiente. O PRP foi então coletado e lavado duas vezes com solução de EDTA 0,4% em PBS estéril seguido de centrifugação a *1000g* por 10 minutos à temperatura ambiente. Volume de 10 μ L de Prostaglandina E₁ (Cayman, catálogo # 13010.1) a 300 μ M foi adicionado em 10 mL de suspensão de plaquetas em todas as etapas de centrifugação a fim de inibir a ativação plaquetária.

A contagem de plaquetas foi realizada através de método direto em câmara de Neubauer, no qual 10 μ L da suspensão de plaquetas foram diluídos em 190 μ L de líquido de Rees & Ecker (3,8 g de citrato de sódio, 0,2 mL de solução de formol a 0,38% e 0,1 g de azul de cresil brilhante em quantidade suficiente para 120 mL de água destilada). Na câmara de Neubauer, 10 μ L da suspensão de plaquetas diluídas no líquido de Rees & Ecker foram adicionados à câmara e colocados em repouso por até 10 minutos antes de proceder à contagem ao microscópio óptico. A contagem das plaquetas foi realizada a partir da soma dos cinco quadrantes do retículo central da câmara de Neubauer em aumento de 400x (as plaquetas apresentam-se coradas em azul e refringente) e o resultado foi multiplicado por 10.000, obtendo-se o número de plaquetas/mm³.

4.2 Isolamento de plaquetas em barreira de iodixanol – Optiprep a partir do sangue periférico de pacientes suspeitos de infecção pelo DENV

As amostras de sangue de pacientes com suspeita de dengue foram coletadas entre o 1º e 7º dia após o aparecimento dos primeiros sintomas (dias de doença), por punção venosa, a vácuo, em tubo de capacidade de 4 mL, contendo anticoagulante K₂EDTA (BD Vacutainer®, catálogo # 367862). O processo de isolamento começa pela adição de sangue venoso sobre volume do gradiente de densidade OptiPrep™ (Axis-Shield) na proporção 1:1. A diluição do OptiPrep™ em solução diluente (0,85% NaCl, 20 mM Hepes-NaOH, 1 mM EDTA, pH 7,4) permite obtenção de solução com barreira de densidade $\rho=1,063\text{g/mL}$, recomendada para o isolamento de uma fração altamente purificada de plaquetas a partir de sangue total. O anel de plaquetas foi visualizado após centrifugação a $350g$ por 15 minutos à 20°C sem freio, e a camada de plasma foi coletada, aliqüotada e armazenada a -70°C. O anel de plaquetas foi recuperado, lavado uma vez em PBS e em seguida, ressuspensão em 10 mL de PBS contendo 0,3 μM PGE₁ seguido de nova centrifugação a $1000g$ por 10 minutos à temperatura ambiente. Esse processo foi realizado em até 4 horas após coleta do sangue dos pacientes e as plaquetas isoladas foram submetidas imediatamente as diferentes combinações de anticorpos para marcação extracelular por citometria de fluxo.

4.3 Preparação de estoque viral e titulação viral

O vírus DENV sorotipo 2, linhagem 16681 foi provido pelo Dr. SB Halstead (Naval Medical Research Center, USA). Para a preparação do estoque viral, células da linhagem C6/36 de *Aedes albopictus* foram cultivadas em monocamada celular em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), tamponado com bicarbonato de sódio e suplementado com glutamina 200 mM, solução de aminoácidos não essenciais 1%, triptose fostato 0,5%, penicilina 100 U/mL, streptomina 10 mg/mL e 10% de soro fetal bovino (SFB). Antes da infecção, o meio

das células da linhagem C6/36 foi descartado e foram adicionados 500 µL de DENV-2 em 2,5 mL de meio DMEM com 2% de SFB nas garrafas de cultura. Como controle negativo, culturas não foram infectadas, mas foram cultivadas nas mesmas condições das infectadas (mock). Após 90 minutos de incubação à 28°C e 5% CO₂, o sobrenadante de todas as culturas foi descartado e adicionado 25 mL de DMEM com SFB 2%. Ao final do 10º dia de infecção em estufa a 28°C e 5% CO₂, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1000g por 10 minutos, à 4°C.

A partir desse momento, iniciou-se o processo de ultracentrifugação do vírus. Os sobrenadantes das culturas infectadas e das não infectadas (mock) foram coletados e a cada um foi adicionado 10% SFB. Os sobrenadantes foram colocados em tubos de ultracentrífuga com capacidade para até 60 mL e ultracentrifugados a 100.000g por 60 minutos à 4°C com baixa aceleração e sem freio. Ao final, os sobrenadantes foram descartados e o *pellet* mantido a 4°C em gelo até ser ressuscitado em 1,5 mL de meio RPMI 1640 sem SFB. Foi feito um *pool* dos sobrenadantes concentrados, que então foram filtrados em membrana de 0,22 µm (Millipore), pré-tratada com 1 mL de meio RPMI 1640 com SFB 10%. Foi adicionado SFB 10% aos sobrenadantes filtrados, que em seguida foram aliquotados e armazenados a -70°C.

O vírus ultracentrífugado foi titulado em microplacas de titulação. Células C6/36 foram infectadas com diluições seriadas do vírus (500 µL/poço) e mantidas à 28°C por 9 dias, quando, após descarte de parte do sobrenadante, foram ressuscitadas, transferidas para lâminas de microscopia ótica e deixadas na bancada até secagem. As lâminas foram fixadas com acetona por 20 minutos à -20°C e então submetidas à marcação indireta por imunofluorescência, como previamente descrito (231). O título da massa viral foi calculado como dose infectante em cultura de tecido 50% (TCID₅₀/mL) pelo método de Reed-Muench (232). O título obtido do estoque viral produzido foi de 3×10^{10} TCID₅₀/mL.

4.4 Ativação das plaquetas com trombina e interação com o DENV-2 *in vitro*

A suspensão de plaquetas obtida de doadores saudáveis foi dividida em três condições de cultura: (1) plaquetas sem estímulo, (2) plaquetas estimuladas com trombina e (3) plaquetas cultivadas com o DENV-2. Para os experimentos de ativação das plaquetas com trombina, 50 µL de trombina (Sigma, catálogo # T4393) a 100 U/mL foram colocados em 10 mL da suspensão de plaquetas, mantidas em tubos tipo Falcon de 50 mL não aderentes. Os tubos das condições (1) e (2) foram colocados em estufa por 15 minutos à 28°C e 5% CO₂. Ao final da incubação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 1000g e depois as plaquetas foram lavadas com 10 mL de meio RPMI 1640, seguido de outra centrifugação por 10 minutos a 1000g, estando assim preparadas para a realização da técnica de citometria de fluxo.

Diferentes protocolos de interação do DENV-2 ultracentrifugado com as plaquetas de doadores foram testados a fim de estabelecermos a melhor condição. Inicialmente, realizamos um protocolo já descrito na literatura com modificações (39), em que 10⁶ plaquetas/mL isoladas de doadores sadios foram deixadas em cultura na presença do DENV-2 ultra (diluição 1:10, 1:100 ou 1:1000) por 2 horas à 28°C. Após esta etapa de adsorção, as plaquetas foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640, centrifugadas por 10 minutos a 1000g para retirada do excesso de vírus e colocadas em cultura. Ao final de 24 horas, as plaquetas foram lavadas novamente duas vezes com meio RPMI 1640 e centrifugadas por 10 minutos a 1000g e em seguida, submetidas à marcação intracelular utilizando-se os anticorpos anti-glicoproteína não-estrutural viral NS1 ou anti-Dengue Complex por citometria de fluxo. O mock foi utilizado como controle negativo da infecção.

Em um segundo protocolo de interação plaquetas *versus* DENV-2, 10⁶ plaquetas/mL foram colocadas em cultura com mock ou DENV-2 ultra, ambos diluídos 1:1000, em tubo tipo Falcon de 50 mL, seguido por 3 horas de incubação à 28°C em estufa de 5% CO₂, com homogeneizações

a cada 20-30 minutos. Após esse período, as plaquetas em cultura foram lavadas duas vezes em meio RPMI 1640 com centrifugações de *1000g* por 10 minutos seguido pelas marcações para citometria de fluxo e/ou microscopia eletrônica.

4.5 Detecção de antígeno viral, marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas de doadores e pacientes por citometria de fluxo

Para detecção do antígeno viral intracelular, plaquetas de doadores que interagiram com o DENV-2 *in vitro* ou plaquetas de pacientes *ex vivo* foram fixadas em paraformaldeído 2% por 20 minutos a 4°C. A suspensão de plaquetas fixadas foi lavada em solução de permeabilização (BSA 1%, NaN₃ 0,1% , saponina 0,15% em PBS pH 7,4) com centrifugação a *1000g* por 10 minutos à 4°C e distribuída em volumes iguais de 100 µL por poço em placa de 96 poços. Ao *pellet* de plaquetas, 200 µL da solução de permeabilização foram adicionados com incubação por 10 minutos à 4°C. Após incubação e centrifugação, no *pellet* de plaquetas foram adicionados 100 µL de solução de bloqueio (BSA 1%, NaN₃ 0,1% e plasma humano inativado 5% em PBS pH 7,4) com incubação de 30 minutos à 4°C. As plaquetas foram novamente lavadas em 100 µL de solução de permeabilização e ao *pellet* de plaquetas foram adicionados 20 µL do anticorpo primário (anti-NS1 ou anti-Dengue Virus Complex) diluído (Tabela 2) em solução de permeabilização com incubação de 60 minutos a 4°C. Ao final da incubação, foi realizada lavagem com 150 µL de solução de permeabilização e ao *pellet* das plaquetas marcadas, foram adicionados 20 µL do anticorpo secundário (anti-mouse IgG-Alexa488) diluído em solução de permeabilização por 30 minutos à 4°C. Mais uma lavagem foi realizada em solução de permeabilização seguida por outra fixação com paraformaldeído 2% por 30 minutos à temperatura ambiente. As plaquetas foram então lavadas em PBS, suspensas e mantidas em 300 µL de PBS até aquisição imediata no citômetro Accuri™ C6 (BD Biosciences). As análises foram feitas no programa FlowJo versão 7.6.5.

As avaliações da expressão de marcadores de ativação e receptores do tipo Toll foram realizadas nas plaquetas de doadores que interagiram com o DENV-2 ou foram estimuladas com trombina *in vitro* e nas plaquetas de pacientes *ex vivo*. Inicialmente, as suspensões de plaquetas foram lavadas em solução de EDTA 0,4% em PBS estéril com centrifugação a 1000g por 10 minutos à temperatura ambiente. Ao *pellet* de plaquetas foi adicionada solução de bloqueio seguido de incubação por 30 minutos à 4°C. Após a incubação, 100 µL da suspensão de plaquetas foram distribuídas em placa de 96 poços seguida por centrifugação a 1000g por 10 minutos à 4°C. Sobre o *pellet* foram adicionados 20 µL dos anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos, combinados e diluídos (Tabela 2) em solução de lavagem (BSA 1%, NaN₃ 0,1% em PBS pH 7,4), seguido de incubação por 30 minutos à 4°C. Após a incubação, as plaquetas foram lavadas e por fim fixadas com 150 µL de solução de paraformaldeído a 1% durante 20 minutos à temperatura ambiente. As plaquetas foram então lavadas, suspensas e mantidas em 300 µL de PBS até aquisição em no máximo 18 horas no citômetro Accuri™ C6 (BD Biosciences). As análises foram feitas no programa FlowJo versão 7.6.5.

Tabela 2. Anticorpos monoclonais, anticorpos secundários e moléculas conjugadas utilizados

Especificidade	Diluição	Clone	Isotipo	Fabricante	Catálogo
Anti-NS1	1:100	DN3	IgG _{1,k}	Abcam	ab41616
Anti-Dengue Virus Complex	1:100	D3-2H2-9-21	IgG _{2a}	Chemicon	MAB8705
Anti-mouse IgG-Alexa-488	1:400	-	-	Invitrogen	A11001
Mouse IgG_{2a} negative control	1:50	GC270	IgG _{2a}	Chemicon	MABC004
Anti-CD31-FITC	1:25	MBC-78.2	IgG ₁	Southern Biotech	9381-02
Anti-CD41-PECy5	1:25	HIP8	IgG _{1,k}	Biolegend	303707
Anti-CD62P-APC	1:25	AK4	IgG _{1,k}	Biolegend	304910
Anti-CD40L-PE	1:10	24-31	IgG ₁	Southern Biotech	9821-09
Anti-TLR2-PE	1:10	TL2.1	IgG _{2a,k}	eBioscience	12-9922-41
Anti-TLR4-FITC	1:10	3C3	IgG ₁	Acris GmbH	AM26183FC-N
IgG₁-FITC	1:10	15H6	IgG _{1, k}	Southern Biotech	0102-02
Fibrinogênio-Alexa Fluor 546	1:50	-	-	Molecular Probes	F-13192
IgG₁-PE	1:10	11711	IgG ₁	R&D Systems	IC002P
IgG₁-PECy5	1:25	-	IgG ₁	Dako	X0955
IgG_{1,k}-Alexa Fluor 647	1:25	MOPC-21	IgG _{1,k}	BD Biosciences	557783
IgG_{2a,k}-PE	1:10	R35-95	IgG _{2a,k}	BD Biosciences	554689
IgG_{2a,k}-FITC	1:10	G155-178	IgG _{2a,k}	BD Biosciences	556652

4.6 Microscopia eletrônica de transmissão para avaliação morfológica e detecção de partículas virais em plaquetas de doadores e pacientes

Análise inicial foi feita com plaquetas de doadores expostas ao DENV-2 ultra, como descrito anteriormente. Cerca de 10^6 plaquetas em 1 mL de meio RPMI 1640 foram enviadas ao Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (IOC/FIOCRUZ), para serem processadas e submetidas à análise por microscopia eletrônica de transmissão. Primeiramente, as amostras de plaquetas acondicionadas em tubos de microcentrífuga foram fixadas em glutaraldeído 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,2M em sacarose 7% por 5 minutos, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 30 minutos, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,2 M em sacarose 7% e novamente lavadas por duas vezes em água destilada. Em seguida, na fase de desidratação, as amostras foram submetidas a concentrações crescentes de acetona. Nas concentrações de 15%, 30% e 50%, as amostras foram desidratadas por 10 minutos, em acetona 70% com acetato de uranila 1% por 30 minutos, em acetona 90% por 5 minutos e finalmente duas lavagens em acetona 100% em sulfato de cobre por 10 minutos. Após cada etapa da lavagem e desidratação, as amostras foram centrifugadas a *800 rpm* objetivando propiciar a visualização de precipitado de células. Já desidratadas, iniciou-se o processo de infiltração, que consta de uma impregnação gradativa com resina epóxi (Epon, Science Electron Microscopy) em duas diluições diferentes em acetona (relação de 1:3 e 3:1, resina e acetona, respectivamente), onde permaneceram por uma noite. Na manhã seguinte, a resina diluída foi substituída pela resina pura, onde foram mantidas por 4 horas. Posteriormente, a resina foi novamente trocada e as amostras colocadas em estufa a 60°C por três dias para polimerizar. Após a polimerização, os blocos contendo as amostras foram retirados dos tubos e desbastados, objetivando eliminar o excesso de resina localizado próximo as amostras, facilitando assim a realização das secções em

ultramicrotomo. O bloco preparado foi adaptado ao ultramicrotomo (Reichert-Jung Ultracut E), onde foram realizadas secções semifinas (0,5 µm de espessura) e ultrafinas (50 a 70 nm de espessura) com auxílio de uma navalha de diamante (Diatome). As secções semifinas foram coletadas, colocadas em lâminas de vidro, coradas com solução de azul de metileno e azur II (233) e analisadas em microscópio fotônico Zeiss-Axiophot. As secções ultrafinas, por sua vez, foram coletadas em grades de cobre de 300 malhas, contrastados pela técnica de contrastação positiva com acetato de uranila 2% em etanol 50% e citrato de chumbo (234) e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900.

4.7 Estudo populacional dos pacientes

Foram coletadas 45 amostras de pacientes com suspeita de infecção pelo vírus dengue entre fevereiro e abril de 2011. Os pacientes foram atendidos na emergência do Hospital Rio Laranjeiras, Rio de Janeiro, em colaboração com o Dr. Paulo Vieira Damasco. Pacientes e controles saudáveis foram incluídos no estudo após lerem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fiocruz, Ministério da Saúde, sob o número 061/2008. Amostras de 15 doadores saudáveis, que não apresentaram episódios febris nos últimos 3 meses antes da coleta ou histórico de outras doenças, foram utilizadas como controles.

4.8 Diagnóstico clínico e laboratorial dos casos de dengue

A infecção pelo DENV foi confirmada através da pesquisa qualitativa de anticorpos IgM anti-DENV por ELISA de captura (PANBIO, Columbia, USA), pela detecção do antígeno viral NS1 por ELISA (Platelia™ Dengue NS1 Ag Kit – Bio-Rad Laboratories), pelo isolamento viral em células C6/36 de *Aedes albopictus* por imunofluorescência ou pela detecção do RNA viral por RT-PCR. O diagnóstico laboratorial foi realizado pela equipe

do Laboratório de Flavivírus (IOC/FIOCRUZ), chefiado pela Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira.

Os parâmetros laboratoriais como a contagem de plaquetas, percentual do hematócrito, contagem de leucócitos, monócitos e linfócitos totais foram realizados pelo laboratório do Hospital Rio Laranjeiras no momento da consulta dos pacientes com suspeita de dengue. Esses parâmetros não foram avaliados nos controles saudáveis.

O desenho experimental e fluxograma são apresentados na Figura 14.

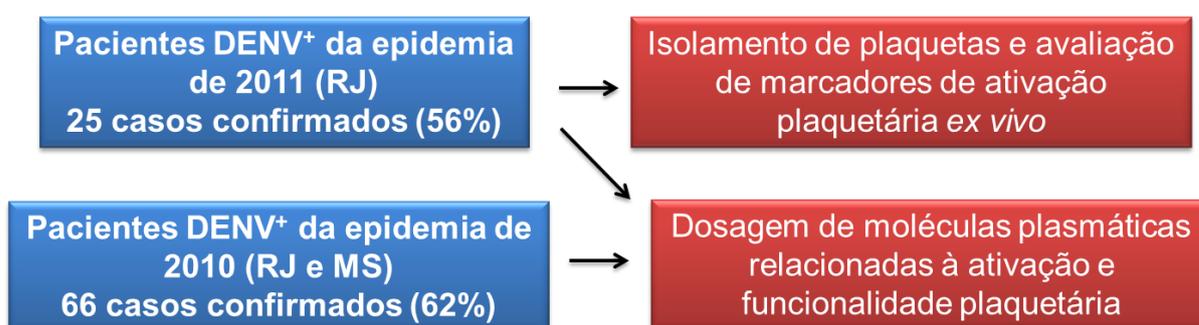


Figura 14. Desenho experimental e fluxograma dos experimentos realizados com amostras de pacientes com infecção aguda pelo vírus Dengue.

4.9 Quantificação das moléculas plasmáticas CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, TXB₂, NO_x, CD62P solúvel e TFPI por ELISA

As dosagens da P-selectina solúvel (sCD62P), Nitrito/ nitrato (NO_x), Tromboxano B₂ (TXB₂), e Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI) foram feitas a partir de amostras de plasma de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de dengue das epidemias de 2011 e de 2010 e controles saudáveis.

No ensaio de quantificação de sCD62P, na placa já sensibilizada fornecida pelo fabricante, 100 µL de plasma de pacientes e controles diluídos 20 vezes em solução diluente fornecida pelo kit foram adicionados nos seus respectivos poços. A curva padrão foi constituída por 5 frascos contendo cada uma das concentrações já conhecidas (45,94 - 0,82 ng/mL) também fornecidos pelo kit. Em seguida, 100 µL de anticorpo policlonal específico para o sCD62P conjugado a HRP foram adicionados

em todos os poços com incubação por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi então lavada três vezes com tampão de lavagem e 100 µL de substrato tetrametilbenzedina (TMB) foram adicionadas aos poços. Seguiu-se incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi finalizada pela adição de 100 µL da solução *stop* (solução ácida fornecida pelo fabricante) e leitura das densidades ópticas no espectrofotômetro Expert Plus® a 450nm.

A concentração de NO_x nas amostras foi determinada com base na conversão enzimática de nitrato a nitrito pela nitrato redutase. O nitrito convertido e o nitrito endógeno da amostra são então dosados utilizando-se a reação de Griess. Na reação de Griess, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido (Reagente de Griess I). O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (Reagente de Griess II), gerando um composto que absorve luz entre 540-570 nm. Para a dosagem de NO_x, as amostras de plasma de pacientes e controles foram previamente desproteinizadas. Para a desproteinação, 100 µL de plasma foram diluídos 1:2 em solução de ZnSO₄ a 15 g/L seguido de centrifugação a 10.000g, por 5 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados e 50 µL dos mesmos foram adicionados aos poços da placa de 96, juntamente com as diluições da curva padrão. A curva padrão foi feita a partir de diluições seriadas de um padrão também fornecido pelo kit. Em seguida, 50 µL do diluente fornecido pelo kit foram adicionados a todos os poços, além de 25 µL de NADH e depois 25 µL de nitrato redutase reconstituída em glicerol no momento do ensaio. Após incubação por 30 minutos à 37°C, foram adicionados 50 µL do Reagente de Griess I e 50 µL do Reagente de Griess II seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. As densidades ópticas foram medidas pelo espectrofotômetro Expert Plus® a 540 nm e correspondem à medida do nitrito endógeno da amostra mais o nitrato, que foi convertido a nitrito.

Para a dosagem de TXB₂, 100 µL das amostras previamente diluídas duas vezes em diluente fornecido pelo kit foram adicionadas aos poços da placa de 96 sensibilizadas. A curva padrão foi feita a partir de diluições seriadas de um padrão também fornecido pelo kit. Em seguida, 50 µL da

solução de anticorpo primário monoclonal específico para o TXB₂ foram adicionados a todos os poços e incubados por 2 horas à temperatura ambiente em agitador horizontal orbital (0,12" orbit) a 500 rpm ± 50 rpm. Após período de incubação, 50 µL de TXB₂ conjugado a HRP foram adicionados em todos os poços por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi então lavada três vezes com tampão de lavagem e 100 µL de substrato tetrametilbenzedina (TMB) foram adicionados aos poços. Seguiu-se incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi finalizada pela adição de 100 µL da solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N) e leitura das densidades ópticas no espectrofotômetro Expert Plus® a 450 nm. A intensidade da cor determinada é inversamente proporcional à concentração de TXB₂ na amostra.

Para a dosagem de TFPI, as amostras de plasma de pacientes e controles foram diluídas previamente cem vezes em diluente fornecido pelo kit. Cinquenta µL do diluente foram adicionados a todos os 96 poços da placa já sensibilizada, seguido da adição de 50 µL das amostras de pacientes e curva padrão. A curva padrão foi feita a partir de diluições seriadas de um padrão também fornecido pelo kit. Seguiu-se incubação por 2 horas à temperatura ambiente em agitador e ao final da incubação, os poços foram lavados com tampão de lavagem. Em seguida, 200 µL de anticorpo policlonal específico para TFPI conjugado a HRP foram adicionados em todos os poços com incubação por 1 hora à temperatura ambiente em agitador. A placa foi então lavada três vezes com tampão de lavagem e 100 µL de substrato tetrametilbenzedina (TMB) foram adicionados aos poços. Seguiu-se incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi finalizada pela adição de 50 µL da solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N) e leitura das densidades ópticas no espectrofotômetro Expert Plus® a 450 nm.

Por fim, para a quantificação das quimiocinas CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1, 100 µL do anticorpo de captura à concentração de 0,5 µg/mL para o CCL5/RANTES e 0,5 µg/mL para o CCL2/MCP-1 diluídos em PBS pH 7,2 foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços (Falcon BD) e incubados por 18 horas à temperatura ambiente. Ao final da incubação,

foram feitas quatro lavagens com solução de lavagem (Tween-20 0,05% em PBS pH 7,2) e então adicionados 200 μ L de solução de bloqueio (BSA 5% em PBS pH 7,2) por poço. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, foram realizadas quatro lavagens com solução de lavagem. Curvas padrões foram preparadas através de diluições seriadas do respectivo padrão fornecido pelo fabricante (Tabela 3). As amostras de plasma dos pacientes e controles foram diluídas dez vezes para a dosagem de CCL2/MCP-1 e cem vezes para a dosagem de CCL5/RANTES em solução diluente (Tween-20 0,05%, BSA 0,1% em PBS pH 7,2). Foram adicionados 100 μ L das amostras de plasma e das diluições da curva padrão aos poços da placa, que foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Ao final da incubação, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem e então, adicionados 100 μ L do anticorpo de detecção na concentração de 0,25 μ g/mL para o CCL5/RANTES e 0,5 μ g/mL para o CCL2/MCP-1. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, foram feitas quatro lavagens com solução de lavagem e em seguida, adicionados 100 μ L do conjugado Avidina-HRP por poço, diluído 1:2000 em solução diluente, e então incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, 100 μ L do substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzedina (TMB) (Sigma) foram adicionados aos poços da placa. A leitura da densidade óptica das amostras e diluições da curva padrão foi realizada no espectrofotômetro Expert Plus[®] a 620 nm.

Tabela 3. Referências dos kits de ELISA e diluições das amostras de plasma de pacientes e controles

Molécula	Curva padrão	Fabricante	Número do catálogo
sCD62P	45,94 – 0,82 ng/mL	R&D Systems	BBE06
NO_x	200 – 3,12 µmol/L	R&D Systems	KGE001
TXB₂	20 – 0,313 ng/mL	R&D Systems	KGE011
TFPI	2000 – 31,2 pg/mL	R&D Systems	DTFP10
CCL5/RANTES	2000 – 31,25 pg/mL	Peprotech	900-M33
CCL2/MCP-1	1000 – 15,62 pg/mL	Peprotech	900-K31

4.10 Análise estatística

Para as comparações entre os grupos de pacientes e controles em relação à expressão dos marcadores de ativação e TLRs nas plaquetas e níveis de moléculas plasmáticas foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U. As análises de correlação foram feitas através do teste de Spearman. Foi utilizado o programa GraphPad Prism v.5 (GraphPad). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. Resultados

5.1 Identificação, avaliação da expressão de marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas isoladas de doadores saudáveis

Nós isolamos inicialmente plaquetas de doadores saudáveis que foram estimuladas ou não com trombina, uma das condições experimentais em que as plaquetas são ativadas, a fim de estabelecer e avaliar: (1) a população de plaquetas, definida pela baixa complexidade estrutural, tamanho pequeno e também pela coexpressão dos marcadores de superfície CD31/PECAM-1 e CD41, (2) a expressão dos marcadores de superfície de ativação plaquetária, a P-Selectina (CD62P) e o Fibrinogênio e por fim (3) a expressão dos receptores extracelulares do tipo Toll, TLR2 e TLR4 por citometria de fluxo.

CD31/PECAM-1 é uma glicoproteína transmembranar constitutivamente expressa nas plaquetas e CD41 é uma subunidade do complexo GPIIb-IIIa, presente exclusivamente na superfície de plaquetas e megacariócitos tanto no estado de repouso quanto no ativado. Em geral, as plaquetas passam a expressar em sua superfície a P-Selectina/CD62P, que é um componente da membrana do grânulo α de plaquetas em repouso, após secreção de constituintes do grânulo α . Portanto, a expressão de CD62P na superfície de plaquetas indica que estas sofreram degranulação, sendo, portanto utilizado como um marcador de ativação plaquetária. Outro marcador de ativação plaquetária utilizado em nosso estudo foi o fibrinogênio, que é um dos componentes da cascata de coagulação, que se liga apenas ao complexo GPIIb-IIIa modificado conformacionalmente durante processo de ativação. Em relação aos receptores do tipo Toll, trabalho anterior do nosso grupo demonstrou aumento da expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes infectados pelo DENV comparado a monócitos de doadores saudáveis (235), indicando contribuição desses receptores da imunidade inata

durante a infecção natural pelo DENV. Assim, ambos os receptores foram avaliados nas plaquetas de pacientes infectados pelo dengue.

Como demonstrado na Figura 15, a região de plaquetas de um doador saudável representativo foi definida pelo pequeno tamanho (FSC) e baixa complexidade estrutural (SSC) (Figura 15 A) e pela expressão dos marcadores CD31 e CD41 na ausência (Figura 15 B) ou na presença de trombina 0,5 U/mL por 15 minutos (Figura 15 C). A definição da região de plaquetas foi confirmada pela ausência de marcação utilizando-se os anticorpos anti-CD3, anti-CD4 ou anti-CD8 em experimentos controles (dados não demonstrados).

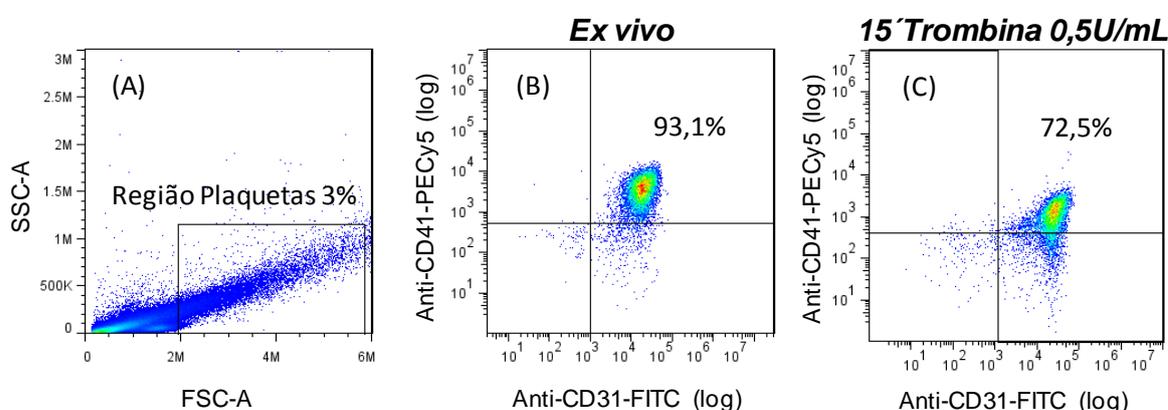


Figura 15. Identificação das plaquetas de doadores. (A) Dot plots representativos da região morfológica de plaquetas definida pelo tamanho (FCS) e granulosidade (SSC), (B) co-marcação de CD31/CD41 na condição *ex vivo* (sem estímulo) e (C) após estímulo com trombina 0,5 U/mL por 15 minutos do mesmo doador.

Após seleção da região de plaquetas, foi possível avaliar a expressão dos marcadores de ativação e receptores do tipo Toll seguindo breve estimulação com trombina. Na Tabela 4 são indicadas as médias e os desvios padrão da expressão de CD62P, Fibrinogênio, TLR2 e TLR4 em plaquetas de 8 doadores. Como se pode observar, a estimulação com trombina aumentou significativamente a expressão de CD62P ($11,80\% \pm 14,02$) e Fibrinogênio ($64,28 \pm 40,33$) comparada as culturas não-estimuladas ($0,57 \pm 1,10$ e $0,59 \pm 0,85$, CD62P e Fibrinogênio, respectivamente). Em relação aos receptores do tipo Toll, não observamos diferença na expressão de TLR2 e TLR4 em culturas de plaquetas estimuladas com trombina ($3,14\% \pm 2,98$ e $4,53\% \pm 4,35$,

respectivamente) comparadas às não estimuladas (3,81% ± 4,17 e 1,55% ± 2,30, respectivamente).

Esses resultados indicam que a estimulação *in vitro* com trombina 0,5 U/mL por 15 minutos ativa plaquetas de doadores, induzindo secreção de grânulos α e mudança conformacional do complexo GPIIb-IIIa, contudo, não induz modulação dos receptores TLR2 e TLR4.

Tabela 4: Expressão dos marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas de doadores saudáveis

	Meio ⁿ⁼⁸	Trombina ⁿ⁼⁸
CD62P %^a	0,57 ± 1,10	11,80 ± 14,02**
Fibrinogênio %^a	0,59 ± 0,85	64,28 ± 40,33***
TLR2 %^a	3,81 ± 4,17	3,14 ± 2,98
TLR4 %^a	1,55 ± 2,30	4,53 ± 4,35

^a representa a Média ± SD

Para a análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prism v.5. ** representa P=0,0074 e *** representa P=0,0002.

5.2 Impacto da interação do DENV-2 em plaquetas de doadores sadios: detecção de proteínas ou partículas virais, marcadores de ativação plaquetária e expressão de receptores do tipo Toll

Após a identificação e estabelecimento das marcações extracelulares em culturas de plaquetas estimuladas com trombina, avaliamos a influência da interação do DENV-2, preparado por ultracentrifugação, tanto na infecção como nas alterações morfológicas e funcionais dessas plaquetas.

Em condições já estabelecidas pelo nosso grupo, células-alvo, susceptíveis a infecção pelo DENV de diferentes sorotipos, como células da linhagem C6/36, células da linhagem Huh-7 e monócitos humanos isolados de doador foram infectadas. Para avaliação da infecção, foi realizada a marcação intracelular indireta com anticorpo anti-Dengue Complex por citometria de fluxo (descrito nos Materiais e Métodos). As taxas de infecção após 24 horas com o DENV-2 ultracentrifugado diluído 1:10 foram: nas células C6/36 47,3%, células Huh-7 55,6% e monócitos

humanos 33,6% de marcação positiva para anti-Dengue Complex. Essas mesmas células foram expostas nas mesmas condições de cultura ao mock que demonstraram marcação irrelevante para o anti-Dengue Complex. Além disso, foi utilizado o controle isotípico IgG_{2a} conjugado ao Alexa-488 em todas as condições de cultura demonstrando especificidade da ligação dos anticorpos anti-Dengue Complex aos antígenos virais nas células-alvo. Desta forma, podemos considerar que o DENV-2 ultracentrifugado preparado foi capaz de infectar as células-alvo eficientemente, podendo assim ser utilizado para os experimentos de interação com plaquetas.

Após realizar diferentes protocolos de interação do DENV-2 ultracentrifugado com as plaquetas de doadores, não detectamos marcação positiva nem para a glicoproteína viral NS1 nem para o Dengue Complex por metodologia de citometria de fluxo (Figura 16 A-B).

Uma vez que as condições pré-estabelecidas de infecção nas células-alvo não foram reproduzidas para as plaquetas, realizamos então a cultura de 10^6 plaquetas/mL de doadores com DENV-2 ultra nas diluições 1:10, 1:100 ou 1:1000 por 3 horas à 28°C. Nestas condições, também não observamos presença dos antígenos virais na população de plaquetas (Figura 16 C-D).

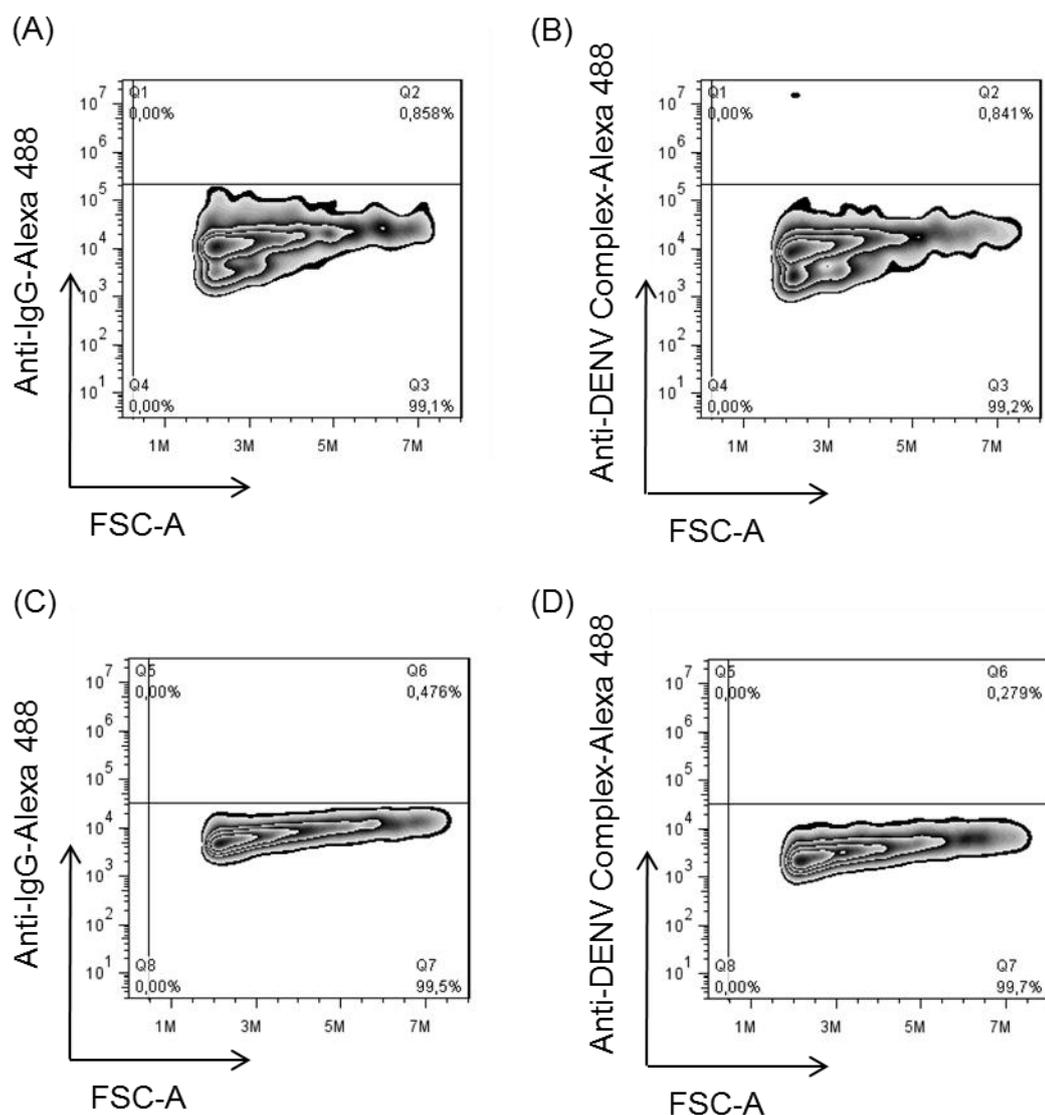


Figura 16. Marcação intracelular de antígenos virais em plaquetas por citometria de fluxo. Gráficos de densidade representativos da marcação intracelular indireta do isotipo (A) e do anti-Dengue Complex (B) em plaquetas cultivadas por 24 horas com o DENV-2 (diluição 1:1000). Em (C), marcação do controle isotípico e em (D), marcação intracelular indireta do anti-Dengue Complex em plaquetas cultivadas por 3 horas com DENV-2 (1:1000).

No entanto, a interação plaquetas e DENV-2 ultra 1:1000 demonstrou pela análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica, quantidade expressiva de partículas virais no interior de vesículas plaquetárias, localizadas próximas à membrana celular, sugerindo a entrada do vírus nas plaquetas. Além disso, a análise ultra-estrutural dessas plaquetas indicou perda de conteúdo citoplasmático e emissão de filopódios, sugerindo ativação plaquetária (Figura 17). Nas outras diluições do DENV-2, 1:10 e 1:100, ocorreu uma redução significativa do precipitado de

plaquetas após lavagem para retirada do vírus, indicando destruição plaquetária pela alta concentração viral.

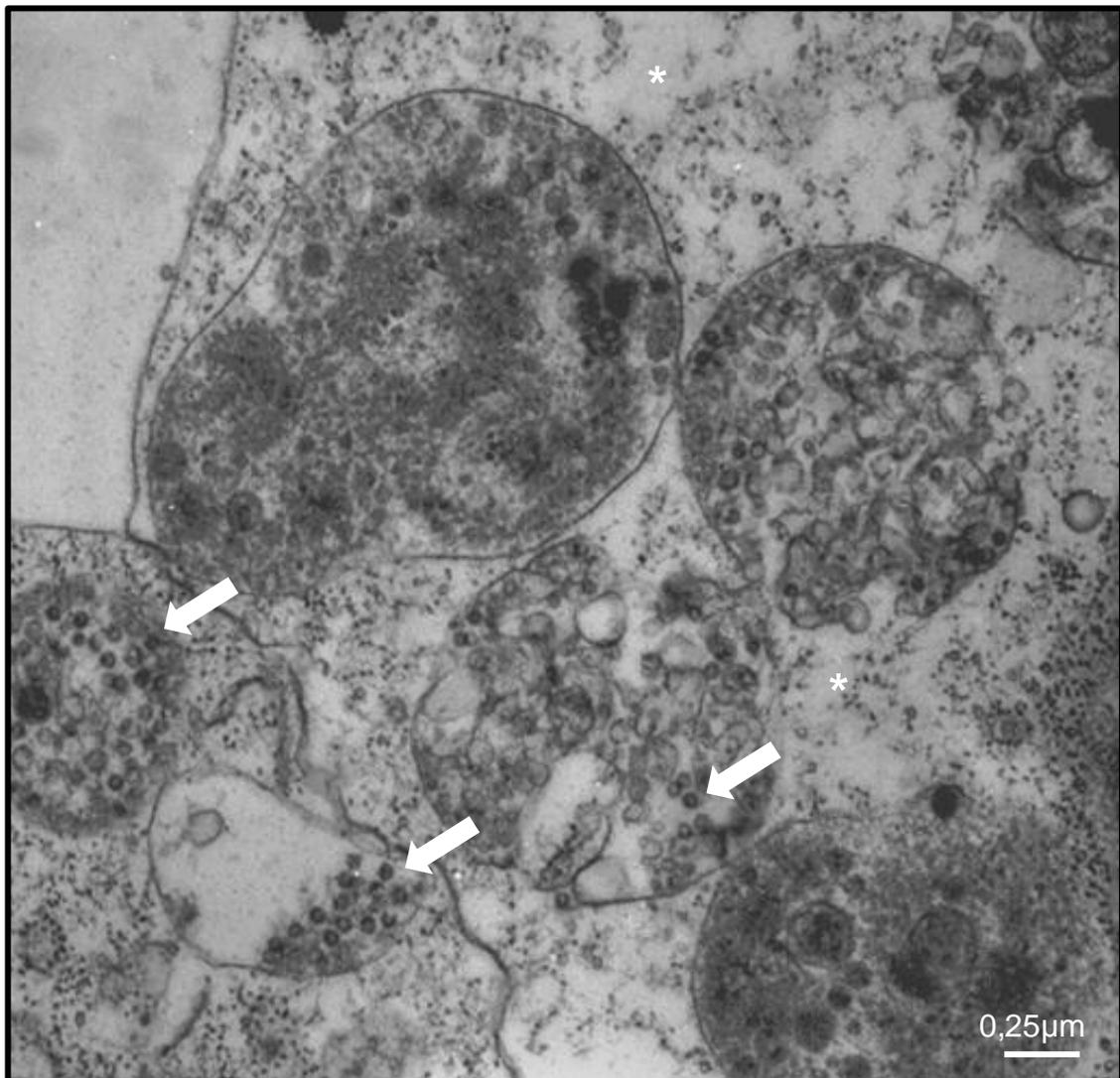


Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão de cultura de plaquetas em contato com DENV-2. Presença de partículas virais em vesículas citoplasmáticas (). Perda de conteúdo plasmático (*). Barra= 0,25µm.

Nesta mesma condição experimental foram avaliados os marcadores de ativação CD62P, Fibrinogênio, e também TLR2 e TLR4 nos oito doadores saudáveis (Figura 18 e Tabela 5).

Nossos resultados indicam que, apesar de realizar a entrada nas plaquetas após 3 horas de cultura, o DENV-2 ultra não induziu alterações na expressão dos marcadores de ativação nem dos receptores do tipo Toll em plaquetas de doadores.

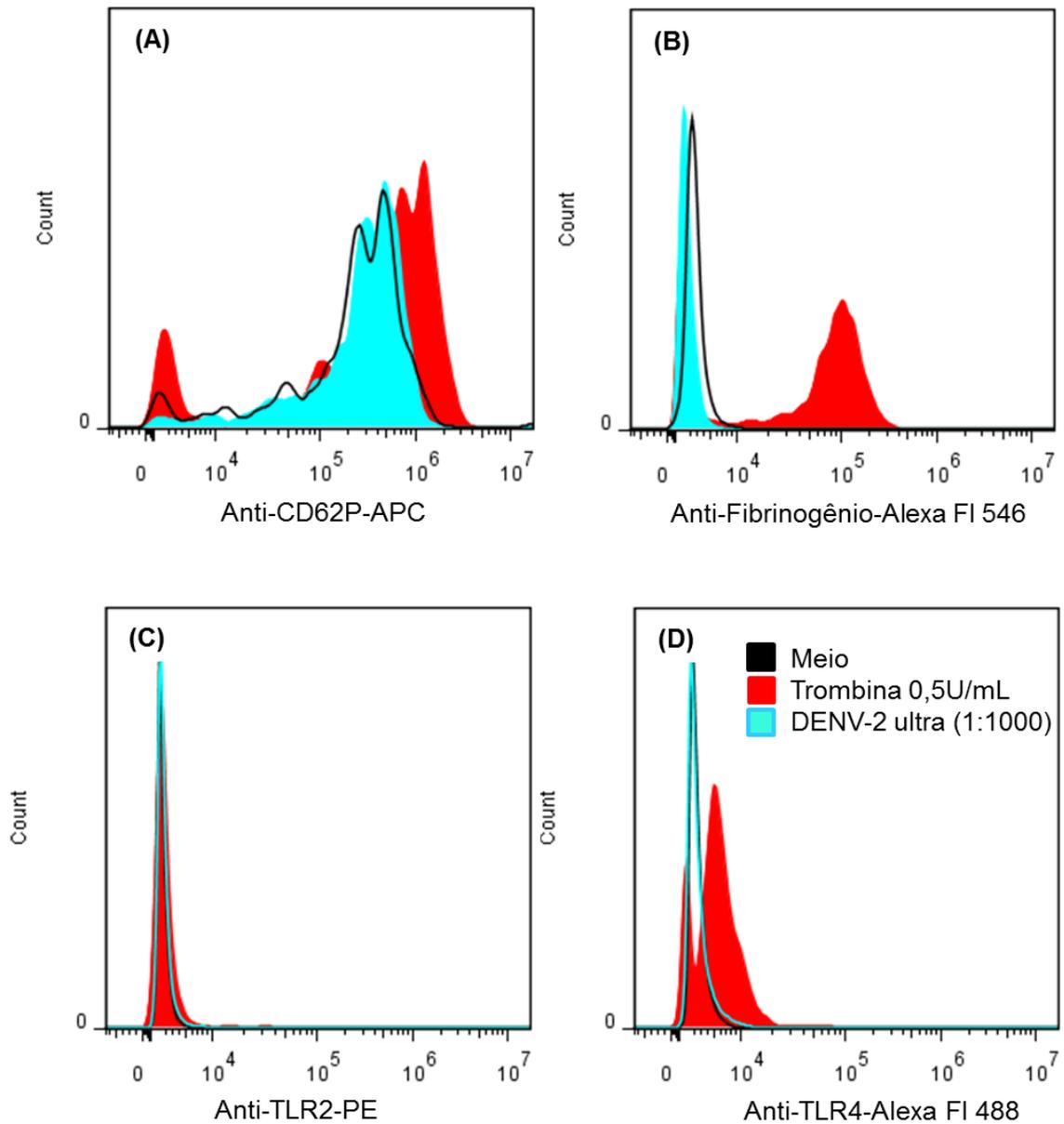


Figura 18. Expressão dos marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas estimuladas com DENV. Histogramas representativos da marcação de CD62P (A), Fibrinogênio (B), TLR2 (C) e TLR4 (D) em plaquetas cultivadas por 3 horas com o DENV-2 ultra (1:1000). A linha preta representa plaquetas não estimuladas, em vermelho, plaquetas estimuladas com Trombina 0,5 U/mL por 15 minutos, e em azul, plaquetas expostas ao DENV-2.

Tabela 5. Expressão dos marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas de doadores na presença do DENV-2 ultra

	Meio	DENV-2 ultra (1:1000)
CD62P %^a	0,57 ± 1,10	0,37 ± 0,58
Fibrinogênio %^a	0,59 ± 0,85	0,74 ± 0,63
TLR2 %^a	3,81 ± 4,17	4,64 ± 5,55
TLR4 %^a	1,55 ± 2,30	1,33 ± 1,68

^a representa a Média ± SD. Para a análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prism v.5.

5.3 Caracterização demográfica, clínica e laboratorial dos pacientes infectados pelo vírus Dengue

Quarenta e cinco indivíduos com suspeita de infecção pelo DENV da epidemia de 2011 foram incluídos neste estudo, sendo que 25 deles (55,6%) tiveram diagnóstico laboratorial confirmado (grupo DENV⁺) e os outros 20 (44,4%) não, sendo assim considerados um grupo acometido por outras doenças febris (ODF). A análise demográfica dos pacientes infectados pelo DENV indicou que 64% são do sexo feminino e apresentam média de idade de 44 anos. Os pacientes DENV⁺ estavam entre 1 a 7 dias a partir do aparecimento dos primeiros sintomas (dias de doença). Como podemos observar na Tabela 6, não houve diferença significativa entre os grupos DENV e ODF em relação a esses parâmetros. O ensaio molecular de RT-PCR ou isolamento viral identificaram a presença dos sorotipos 1 e 2 do DENV, sendo que 69% dos pacientes avaliados estavam infectados pelo DENV-1 e 12,5% pelo DENV-2. Apenas nos casos confirmados, durante o atendimento clínico, 2/25 (8%) dos pacientes informaram episódio anterior de dengue e 19/25 (76%) pacientes disseram que nunca tiveram dengue, porém esse dado não foi confirmado laboratorialmente através de pesquisa de anticorpos IgG específicos para o vírus; 4/25 (16%) pacientes não souberam informar se tiveram episódio anterior de dengue.

Os sintomas clínicos mais frequentes no grupo DENV⁺ foram febre, cefaleia, mialgia, artralgia, lombalgia, dor retro-orbitária, náuseas, prostração e anorexia. Quarenta e quatro por cento dos pacientes

relataram vômitos persistentes ou dor abdominal persistente. Um paciente apresentou contagem de plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$ e dois pacientes foram internados; do qual um apresentou vômitos e dor abdominal persistentes, aumento das transaminases (dado apenas relatado no prontuário, sem especificação dos valores) e contagem de plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ no dia da internação. O segundo paciente internado apresentou perda de consciência (manifestação neurológica). Os sintomas menos frequentes incluíram diarreia, tontura, astenia, tosse, disúria, exantema e prurido. Nenhum dos casos confirmados para dengue apresentou manifestações hemorrágicas leves ou graves, nem sintomas/sinais de extravasamento capilar ou qualquer outra manifestação clínica associada à gravidade, sendo todos os pacientes DENV⁺ considerados grupo brando ou sem sinais de alarme.

A Tabela 6 demonstra que a média da contagem de plaquetas do grupo de pacientes DENV⁺ (157 ± 51) é significativamente menor que a média do grupo ODF (256 ± 63), confirmando que a plaquetopenia é um indicador clínico importante na dengue. Além disso, a média da contagem do número absoluto de leucócitos foi significativamente menor nos pacientes DENV⁺ ($4,25 \pm 1,75$) em comparação com o grupo ODF ($7,36 \pm 3,27$). Os pacientes DENV⁺ apresentaram uma tendência à diminuição da contagem absoluta de monócitos e linfócitos em comparação ao grupo ODF, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 6. Perfil demográfico e laboratorial dos pacientes infectados pelo DENV

Grupo	OFIⁿ⁼²⁰	DENVⁿ⁼²⁵
Sexo (Feminino/Masculino)	15/5	16/9
Idade (anos) (Média ± SD)^a	42,15 ± 14,27	44,08 ± 19,62
Dias de Doença^b (Mín-Máx)^c	3,14 ± 1,46 (1-7) ⁿ⁼¹⁴	4,08 ± 1,85 (1-7) ⁿ⁼²⁴
DENV-1 (n/total; %)	0/12; 0%	11/16; 68,75%
DENV-2 (n/total; %)	0/12; 0%	2/16; 12,5%
Plaquetas x 10³/mm³ a,c	256 ± 63 (153-379) ⁿ⁼¹⁴	157 ± 51 ** (82-260) ⁿ⁼¹³
Hematócrito % a,c	45,11 ± 5,35 (35,3-54,4) ⁿ⁼¹⁴	42,81 ± 3,94 (34,8-48,4) ⁿ⁼¹²
Leucócitos x 10³/mm³ a,c	7,36 ± 3,27 (3,1-15,3) ⁿ⁼¹⁴	4,25 ± 1,75 * (1,9-7,3) ⁿ⁼¹²
Monócitos x 10³/mm³ a,c	0,24 ± 0,13 (0,09-0,61) ⁿ⁼¹⁴	0,16 ± 0,1 (0,04-0,37) ⁿ⁼¹²
Monócitos % a,c	3,64 ± 1,8 (1-7) ⁿ⁼¹⁴	3,75 ± 1,48 (2-7) ⁿ⁼¹²
Linfócitos x 10³/mm³ a,c	2,2 ± 1,0 (0,89-4,36) ⁿ⁼¹⁴	1,33 ± 0,67 (0,63-2,77) ⁿ⁼¹²
Linfócitos % a,c	30,64 ± 7,31 (21-45) ⁿ⁼¹⁴	32,92 ± 10,97 (10-51) ⁿ⁼¹²

^a representa a Média ± SD.

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

^c representa os valores mínimo e máximo (Mín-Máx).

As contagens de plaquetas e leucócitos, a porcentagem do hematócrito, monócitos e linfócitos, foram obtidas através dos hemogramas realizados pelo hospital onde os pacientes foram atendidos.

O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney; ** representa P=0,0014 e * representa P=0,0117.

5.4 Identificação das plaquetas, avaliação da expressão de marcadores de ativação e receptores do tipo Toll em plaquetas isoladas de pacientes infectados pelo vírus Dengue

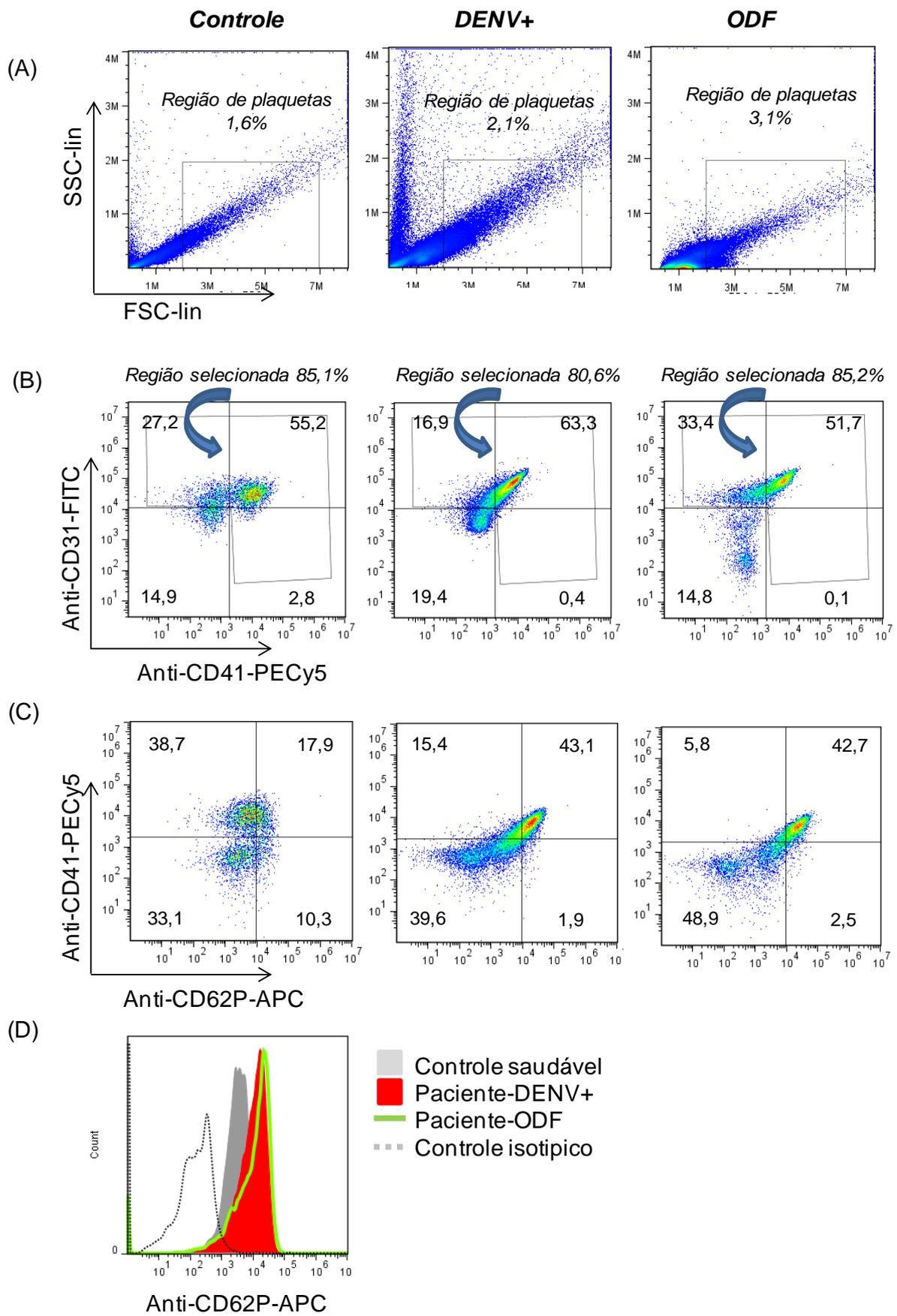
Nos experimentos no qual utilizamos plaquetas frescas de doadores saudáveis e pacientes infectados pelo dengue (DENV) ou não (ODF) utilizamos a barreira de iodixanol – Optiprep™ (Axis-Shield), de forma a agilizar e enriquecer o processo de isolamento de plaquetas. Após isolamento, as plaquetas foram submetidas à marcação extracelular para demarcar a região de plaquetas (CD31⁺ e/ou CD41⁺), além dos marcadores de ativação (CD62P e CD40L) e receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4). Assim, realizamos as seguintes combinações de anticorpos monoclonais dirigidos contra as plaquetas: (1) CD31/CD41/CD40L/CD62P, (2) CD41/TLR2/TLR4, (3) CD31/CD41/isotipos, (4) (CD40L/CD62P/isotipos) e (5) CD41/isotipos.

A Figura 19 demonstra gráficos de pontos representativos de cada um dos três diferentes grupos de indivíduos. Em (A) as regiões selecionadas de tamanho e granulosidade que indicaram em (B) expressão de CD31⁺, CD41⁺ e co-expressão CD31⁺CD41⁺, que definiram a frequência em percentual de população plaquetária (população selecionada). Em (C) demonstramos os gráficos de pontos referentes à marcação de CD41 *versus* CD62P e em (D) histogramas referentes à frequência de CD62P dentro da região selecionada nos diferentes grupos de indivíduos estudados. Por fim, (E) representa a marcação CD41 *versus* CD40L.

Análises comparativas da frequência de plaquetas CD31⁺, CD41⁺ e co-expressão CD31⁺CD41⁺ entre os grupos controles saudáveis (n=6), DENV (n=18) e ODF (n=16) não indicou diferença estatística entre os três grupos na região selecionada ($76,5 \pm 20,1$, $75,2 \pm 19,9$ e $81,8 \pm 16,7$ respectivamente). Em relação à expressão de CD62P dentro da região de plaquetas selecionada, nós observamos aumento significativo da frequência de CD62P em plaquetas nos grupos DENV ($57,3 \pm 32,3$) e ODF ($63,6 \pm 34,6$) em relação aos controles saudáveis ($23,1 \pm 29,5$). No

entanto, não observamos diferença significativa entre os grupos de pacientes com ou sem dengue (Figura 19 F). Ao analisarmos a expressão de CD40L dentro da mesma região, não observamos diferença importante da frequência de CD40L em plaquetas do grupo DENV ($2,61 \pm 2,32$) em relação ao grupo ODF ($1,63 \pm 2,14$) e ao grupo controle ($2,05 \pm 2,33$) (Figura 19 G).

Esses resultados sugerem que tanto plaquetas de pacientes DENV⁺ quanto de pacientes com ODF apresentam um fenótipo de ativação, porém esse fenótipo não é exclusivo da infecção pelo DENV.



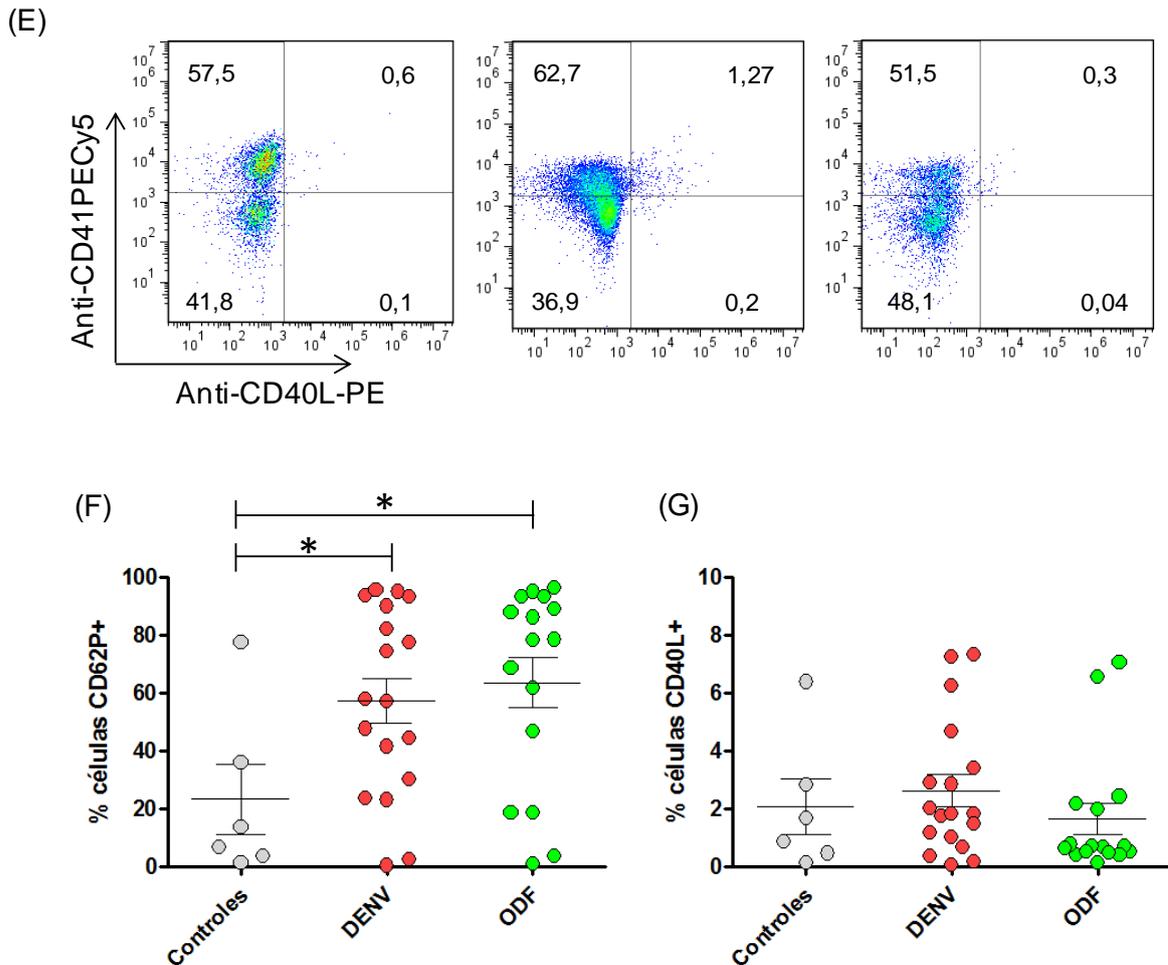
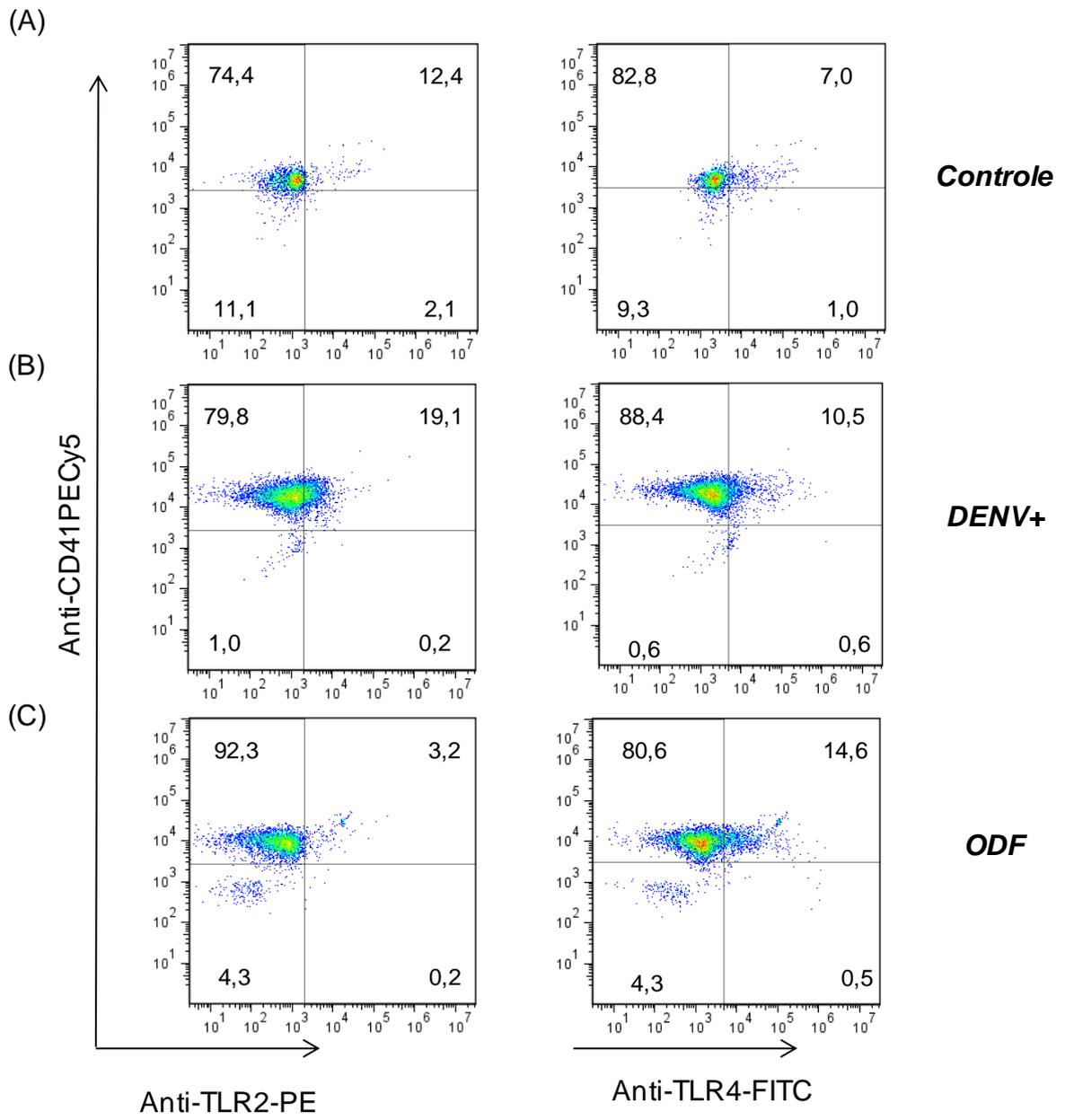


Figura 19. Modulação de marcadores de ativação em plaquetas na infecção aguda pelo DENV. (A) Gráficos de pontos representativos da região morfológica de plaquetas definidas pelo tamanho (FSC), eixo x e granulosidade (SSC), eixo y de um controle, um paciente DENV⁺ e um paciente com ODF. Em (B), gráficos de pontos representativos da co-marcação nos três grupos de indivíduos com os marcadores de plaquetas CD31 e CD41. A região selecionada foi determinada pela expressão de CD31⁺, CD41⁺ e CD31⁺/CD41⁺ e o percentual dessa população se encontra em itálico. Em (C), estão representados os gráficos de pontos da marcação de CD41 *versus* CD62P em plaquetas dos três grupos de indivíduos. (D) apresenta os histogramas representativos da frequência de CD62P em plaquetas dentro da região selecionada nos três grupos avaliados. Ainda na mesma figura, (E) representa os gráficos de pontos da marcação de CD41 *versus* CD40L em plaquetas dos três grupos de indivíduos. Expressão de CD62P (F) e CD40L (G) em controles saudáveis, pacientes DENV⁺ e indivíduos com ODF. Para a análise estatística foi realizado o teste Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prism v.5. Linhas verticais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25 – 75%). * representa P<0,05.

A Figura 20 demonstra gráficos de pontos representativos em relação à marcação de CD41 *versus* TLR2 ou CD41 *versus* TLR4 em um indivíduo representativo de cada grupo, (A) controle, (B) DENV e em (C) ODF. Em (D) histogramas referentes à frequência de TLR2 ou TLR4 dentro da região selecionada CD41⁺ nos diferentes grupos de indivíduos.

Em relação aos receptores do tipo Toll na região de plaquetas CD41⁺, nenhuma diferença estatística foi observada quanto à expressão de TLR2 nas plaquetas entre os grupos, controles saudáveis (n=10, 6,84 ± 4,89), pacientes DENV (n=19, 8,06 ± 14,83) e pacientes ODF (n=15, 3,35 ± 3,22) (Figura 20E). Contudo, observamos uma redução significativa da frequência de TLR4 em plaquetas no grupo de DENV (n=12, 10,82 ± 5,54) em comparação ao grupo controle (n=6, 17,55 ± 4,6). O grupo ODF apresentou maior expressão de TLR4 nas plaquetas (n=11, 19,69 ± 27,55) comparado aos pacientes-DENV, porém esse aumento não foi significativo.

O resultado obtido sugere que no curso da infecção natural pelo dengue, há regulação de receptores da imunidade inata em plaquetas, como o TLR4.



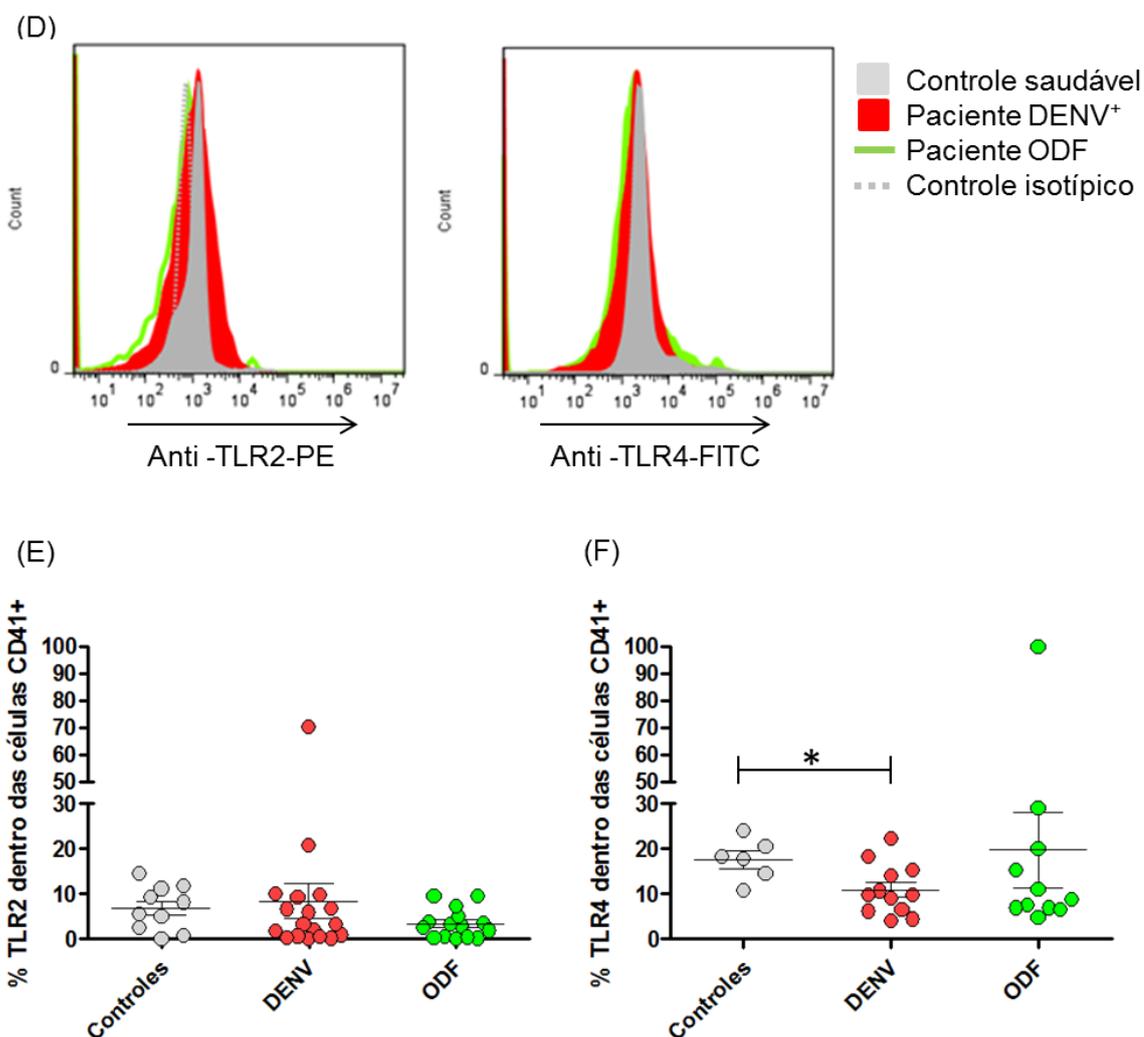


Figura 20. Modulação de receptores do tipo Toll em plaquetas na infecção aguda pelo DENV. Gráficos de pontos representativos da marcação CD41 *versus* TLR2 e TLR4 dentro da região de plaquetas em (A) um indivíduo controle, (B) um paciente DENV⁺ e (C) um indivíduo com ODF. (D) Histogramas representativos da frequência de TLR2 e TLR4 dentro da região selecionada nos três grupos de indivíduos. Expressão da frequência de TLR2 (E) e TLR4 (F) em controles saudáveis, pacientes DENV⁺ e indivíduos com ODF. Para a análise estatística foi realizado o teste Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prism v.5. Linhas verticais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25 – 75%). * representa P<0,05.

5.5 Alteração morfológica e detecção viral em plaquetas de pacientes infectados pelo DENV

Foi realizada a análise ultra-estrutural de plaquetas isoladas de pacientes com infecção aguda pelo DENV da epidemia de 2012 por microscopia eletrônica de transmissão com o intuito de avaliar o perfil morfológico de ativação e a possível detecção de partículas virais em plaquetas. Como pode ser observado na Figura 21, as plaquetas de paciente DENV⁺ apresentaram evidências de ativação, tais como: presença de prolongamentos de membrana (filopódios), perda de conteúdo citoplasmático e dilatação do sistema de membranas. Nestes casos, não foi possível detectar a presença de partículas semelhante ao DENV, mas as lâminas ainda estão sendo avaliadas.

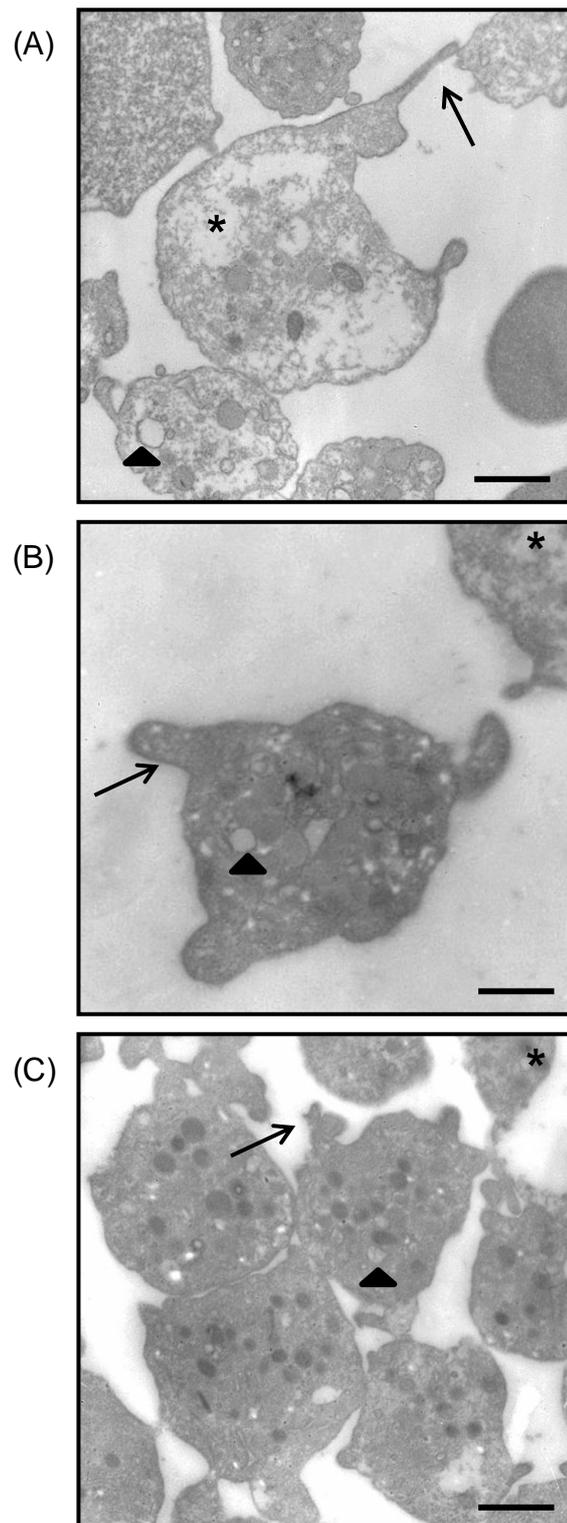


Figura 21. Análise ultra-estrutural de plaquetas de pacientes infectados pelo vírus DENV. Microscopia eletrônica de transmissão de plaquetas isoladas de 3 pacientes com infecção aguda pelo DENV. (→) representa a presença de filopódios, (*) representa perda de conteúdo citoplasmático e (▲) representa dilatação do sistema de membranas. Barra = 1,01 μ m em (A) e barra = 0,83 μ m em (B) e (C).

5.6 Dosagem de moléculas plasmáticas associadas à ativação e funcionalidade plaquetária em pacientes infectados pelo vírus Dengue da epidemia de 2011

Uma vez que plaquetas ativadas são capazes de secretar moléculas importantes na hemostasia, inflamação e resposta imune, nosso objetivo foi dosar os níveis circulantes de algumas moléculas que estão associadas à ativação e funcionalidade plaquetária em amostras de plasma de controles saudáveis e pacientes infectados pelo DENV da epidemia de 2011. Nós quantificamos os seguintes mediadores no plasma dos pacientes: CD62P solúvel (sCD62P), óxido nítrico (NO), tromboxano B₂ (TXB₂), inibidor da via do fator tecidual (TFPI) e as quimiocinas CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1.

Como já mencionado, a P-selectina é uma molécula de adesão presente nos grânulos α de plaquetas e na forma solúvel é indicador de degranulação e ativação plaquetária. As plaquetas também produzem e secretam óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador, e tromboxano A₂ (TXA₂), um vasoconstritor e promotor de trombose. Como o TXA₂ é rapidamente hidrolisado em tromboxano B₂ (TXB₂), este último é mais estável que o TXA₂, e geralmente é utilizado para se estimar os níveis de TXA₂. O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) regula a via extrínseca da coagulação e também está relacionado à funcionalidade plaquetária. Os grânulos α contêm em seu interior vários mediadores, incluindo a quimiocina CCL5/RANTES, excitada no contexto de uma ativação. Outra quimiocina avaliada foi a CCL2/MCP-1, produzida por células endoteliais e que pode ter sua secreção aumentada após interação das plaquetas com as células endoteliais, participando da modulação da permeabilidade vascular em pacientes infectados pelo DENV como descrito anteriormente por outros trabalhos.

Como demonstrado na Figura 22, pacientes infectados pelo DENV apresentaram níveis significativamente menores de sCD62P solúvel (n=09, 12,90 \pm 2,93) em comparação ao grupo controle (n=10, 19,60 \pm 8,09). Em contraste, pacientes infectados pelo DENV apresentaram níveis

plasmáticos significativamente maiores de NO_x ($n=17$, $16,29 \pm 13,56$) em relação aos controles ($n=15$, $11,37 \pm 1,86$). Embora tenhamos observado uma tendência a médias mais altas das dosagens de TXB_2 ($n=16$, $13,93 \pm 13,58$) e TFPI ($n=09$, $20467,2 \pm 9715,8$) plasmáticos nos pacientes DENV^+ comparadas às médias das dosagens nos indivíduos saudáveis ($n=07$, $7,22 \pm 6,35$ para TXB_2 e $n=10$, $15369,5 \pm 7547,3$ para TFPI), essas diferenças não foram significativas.

As modulações dos níveis dos mediadores avaliados durante a infecção pelo DENV estariam relacionadas ao aumento da ativação plaquetária e regulação da cascata de coagulação.

5.7 Correlação entre marcadores de ativação plaquetária e expressão de receptores do tipo Toll com a dosagem de moléculas plasmáticas associadas à ativação e funcionalidade plaquetária em pacientes infectados pelo vírus Dengue

Inicialmente, correlacionamos (i) as frequências da expressão dos marcadores de ativação CD62P e CD40L e dos receptores do tipo Toll TLR2 e TLR4 na região de plaquetas dos pacientes DENV^+ e em seguida, (ii) as frequências da expressão desses marcadores de superfície plaquetária com os mediadores plasmáticos e (iii) desses mediadores entre si. Como demonstrado na Tabela 7, observamos correlações positivas significativas entre: (i) expressão de CD62P com expressão de TLR2 nas plaquetas ($n=18$, $r=0,697$, $p=0,001$), (ii) expressão de CD40L com expressão de TLR4 nas plaquetas ($n=18$, $r=0,755$, $p=0,005$) e por fim, (iii) expressão de TLR2 nas plaquetas com níveis plasmáticos de TFPI ($n=09$, $r=0,683$, $p=0,04$). Nenhuma outra correlação estatística foi encontrada.

Tabela 7. Correlação entre a expressão de marcadores de ativação, receptores do tipo Toll e mediadores plasmáticos em pacientes infectados pelo DENV

	% CD62P dentro das plaquetas	% TLR2 dentro das CD41+	% TLR4 dentro das CD41+
% CD62P dentro das plaquetas	-	P=0,001 ⁿ⁼¹⁸ r=0,697	ns
% CD40L dentro das plaquetas	ns	ns	P=0,005 ⁿ⁼¹⁸ r=0,755
% TLR2 dentro das CD41+	ns	-	ns
TFPI pg/mL	ns	P=0,04 ⁿ⁼⁹ r=0,683	ns

Foi realizada a correlação de Spearman utilizando o programa GraphPad Prism v.5. NS se refere à correlação não significativa e n representa o número de pares analisados.

5.8 Quantificação de moléculas plasmáticas associadas à ativação e funcionalidade plaquetária em pacientes infectados pelo vírus Dengue da epidemia de 2010

Durante epidemia de dengue no primeiro semestre de 2010, nós obtivemos um maior número de pacientes confirmados laboratorialmente com infecção pelo dengue (total de 66 pacientes) em que pudemos inclusive classificá-los de acordo com a nova classificação da OMS de 2009. O primeiro grupo caracterizado por aqueles sem sinais de alerta (FD sem SA) foi composto por 31 indivíduos, o segundo grupo foi formado por 20 pacientes que apresentaram sinais de alerta (FD com SA); e por último, o terceiro grupo formado por 15 indivíduos incluídos no grupo de pacientes graves (Grave) por apresentarem manifestações hemorrágicas e/ou extravasamento plasmático. Não foi realizada a análise *ex vivo* das plaquetas nestes pacientes.

Foram dosados os mediadores plasmáticos sCD62P, NO_x, TXB₂ e TFPI e os níveis das quimiocinas CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES em amostras de controles saudáveis e dos três diferentes grupos de pacientes classificados de acordo com os critérios de gravidade clínica (Figura 23).

Em relação às moléculas envolvidas na ativação e funcionalidade das plaquetas, semelhante aos pacientes da epidemia de 2011, todos os pacientes infectados pelo DENV (FD Sem SA 15,46 ± 12,20, FD Com SA

24,42 ± 31,02 e Graves 18,97 ± 11,03), independente da gravidade clínica, apresentaram níveis menores de sCD62P comparado aos Controles (19,60 ± 8,09), no entanto, apenas o grupo FD Sem SA foi estatisticamente significativo (Figura 23 A). Ao avaliarmos em cada paciente a razão entre a quantidade de sCD62P plasmático pela quantidade de plaquetas, obtivemos um dado bastante interessante, diferente daquele apresentado quando foi verificado apenas os níveis do sCD62P, em que esta razão estava aumentada de forma significativa de acordo com a gravidade da doença (Tabela 8).

Em relação à dosagem de NO_x não vimos nenhuma diferença significativa entre Controles (11,37 ± 1,86) e os diferentes grupos de pacientes infectados pelo DENV (FD Sem SA 11,18 ± 2,04, FD Com SA 12,00 ± 2,22 e Graves 11,70 ± 2,12) (Figura 23 B). Entre as epidemias 2010 e 2011, os resultados foram parcialmente discordantes, uma vez que a dosagem de um paciente que foi de 67,84 µmol/L de NO_x foi o principal responsável pelo aumento da média do grupo.

No caso da dosagem do TXB₂, este praticamente teve médias menores em todos os grupos de pacientes infectados pelo DENV (FD Sem SA 1,56 ± 1,99, FD Com SA 14,39 ± 26,33 e Graves 5,19 ± 5,41) em relação aos Controles (7,22 ± 6,35), mas a diferença foi estatisticamente significativa apenas entre Controle *versus* FD Sem SA e FD Sem SA *versus* Graves (Figura 23 C). Entre as epidemias 2010 e 2011, os resultados foram também parcialmente discordantes, provavelmente pela alta variabilidade da dosagem observada no grupo de pacientes.

Muito interessantes foram as dosagens de TFPI que sugere ser um marcador potencial de gravidade clínica. Como demonstrado, observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes (FD Sem SA 21435,9 ± 8302,3, FD Com SA 25787,7 ± 12323,9 e Graves 32576,4 ± 10053,5) e Controles (15369,5 ± 7547,3) e ainda entre pacientes FD Sem SA *versus* Graves (Figura 23 D). As dosagens de TFPI foram similares entre as epidemias de 2010 e 2011.

Esses resultados indicam que, com exceção do NO_x, há diferenças significativas na produção e secreção de mediadores plaquetários no curso

da infecção pelo DENV, principalmente com relação a razão sCD62P/contagem de plaquetas e às dosagens de TFPI, indicando que a inibição da funcionalidade plaquetária está intimamente relacionada à gravidade da doença.

Por fim, as dosagens das quimiocinas demonstraram: (i) níveis significativamente menores de CCL5/RANTES em todos os grupos de pacientes, independente da gravidade clínica, em comparação aos controles. Além disso, níveis de CCL5/RANTES distinguiram os grupos de pacientes graves daqueles FD sem SA. Em contraste, (ii) níveis de CCL2/MCP-1 foram significativamente maiores nos três grupos de pacientes-DENV, independente da gravidade clínica, comparados ao grupo Controle (Tabela 8).

Esses resultados sugerem que CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1 estariam relacionadas diferencialmente com a gravidade da doença.

Figura 22

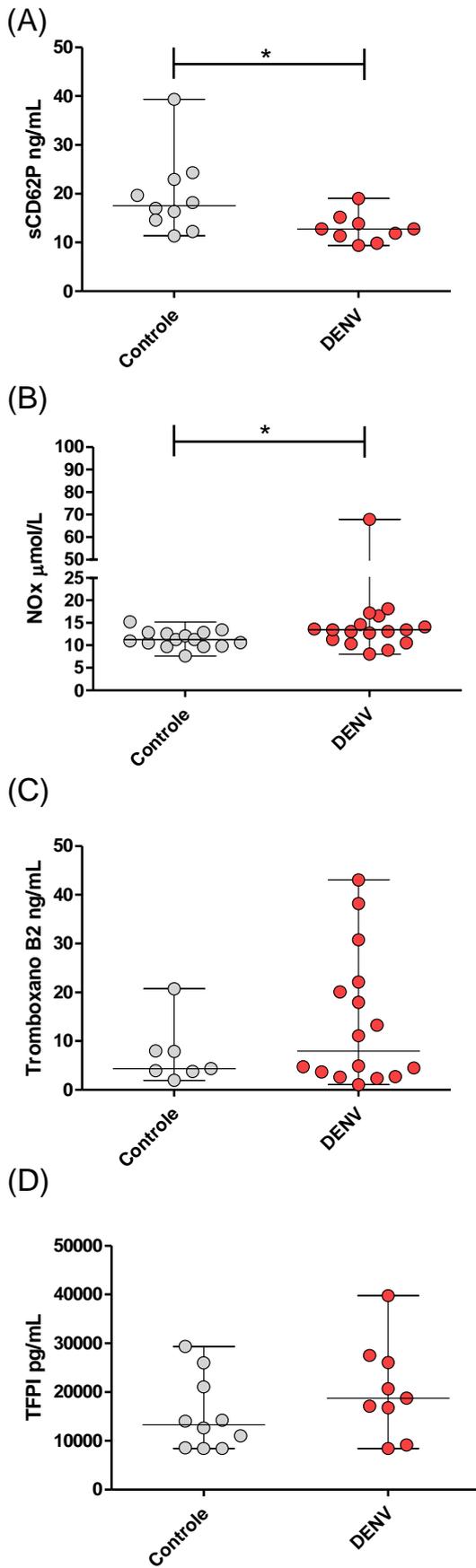


Figura 23

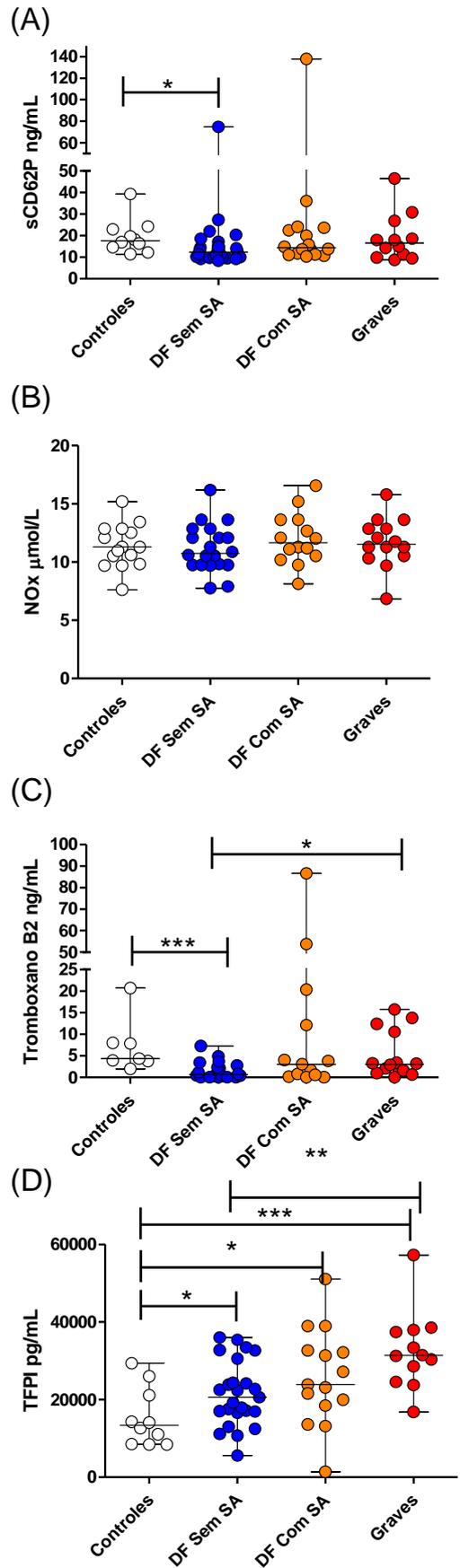


Figura 22. Dosagem de mediadores plasmáticos em pacientes infectados pelo DENV na epidemia de 2011. Os níveis de sCD62P (A), NO_x (B), TXB₂ (C) e TFPI (D) por ensaio imunoenzimático (ELISA) são apresentados em controles saudáveis e pacientes com diagnóstico confirmado de dengue durante epidemia de 2011. Para a análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prism v.5. As linhas horizontais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25% – 75%). ** representa P<0,01 e * representa P<0,05 que foram valores considerados estatisticamente significativos.

Figura 23. Dosagem de mediadores plasmáticos em pacientes infectados pelo DENV na epidemia de 2010. Os níveis de sCD62P (A), NO_x (B), TXB₂ (C) e TFPI (D) por ensaio imunoenzimático (ELISA) são apresentados em controles saudáveis e pacientes com diagnóstico confirmado e classificados de acordo com a gravidade clínica durante epidemia de 2010. Para a análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prism v.5. As linhas horizontais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25% – 75%). ** representa P<0,01 e * representa P<0,05 que foram valores considerados estatisticamente significativos.

Tabela 8. Razão sCD62P/contagem de plaquetas e quantificação de quimiocinas plasmáticas nos pacientes infectados pelo dengue durante epidemia de 2010

	Controle	FD sem SA	FD com SA	Grave
sCD62P/ n plaquetas		0,10 ⁿ⁼²⁵ (0,07-0,13)	0,18 ⁿ⁼¹⁵ (0,15-0,27)&&	0,42 ⁿ⁼¹¹ (0,23-0,88)###@
CCL5/RANTES (pg/mL)	26335 ⁿ⁼¹⁰ (19828-46080)	10931 ⁿ⁼³⁰ (7930-23887)**	8064 ⁿ⁼¹⁷ (6061-19124)**	6159 ⁿ⁼¹⁵ (4044-16349)***#
CCL2/MCP-1 (pg/mL)	291,3 ⁿ⁼¹⁰ (252,6-470,1)	1102 ⁿ⁼²⁸ (755,9-1584)***	1089 ⁿ⁼¹⁸ (734,5-2044)***	796,9 ⁿ⁼¹⁴ (620,9-1286)***

O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney; um símbolo representa P<0,05, dois símbolos representam P<0,005 e três símbolos representam P<0,0005.

Os dados foram expressos em mediana (25%-75%).

* representa diferença estatística entre Controles vs pacientes DENV⁺;

& representa diferença estatística entre FD sem SA vs FD com SA.

representa diferença estatística entre FD sem SA vs Graves.

@ representa diferença estatística entre FD com SA vs Graves.

5.9 Relação entre a dosagem de moléculas plasmáticas associadas à ativação e funcionalidade plaquetária e parâmetros clínico-laboratoriais de pacientes infectados pelo vírus Dengue

Como não tínhamos as análises por citometria de fluxo das plaquetas dos pacientes da epidemia de 2010 e, portanto, não era possível realizar o mesmo tipo de análise como àquela feitas com os pacientes da epidemia de 2011, avaliamos inicialmente as correlações entre as dosagens das moléculas plasmáticas e indicadores de gravidade, como a contagem de plaquetas e o valor do hematócrito. Como demonstrado na Tabela 9,

confirmamos dados anteriores do nosso grupo no qual detectamos correlação positiva entre a contagem de plaquetas e os níveis de CCL5/RANTES (n=57, r=0,353, p=0,007). De forma interessante e original, a contagem de plaquetas foi correlacionada negativamente com os níveis de TFPI (n=48, r=(-) 0,353, p=0,01), sugerindo que a inibição do TF e, conseqüentemente da cascata de coagulação, está diretamente relacionada à plaquetopenia. Nenhuma outra correlação significativa foi observada com as demais moléculas solúveis testadas. Com os valores percentuais de hematócrito, observamos uma única correlação positiva entre o hematócrito e os níveis de CCL2/MCP-1 (n=55, r=0,299, p=0,03).

Tabela 9. Correlação das moléculas plasmáticas com os dados laboratoriais indicadores de gravidade

	CCL5/RANTES (pg/mL)	CCL2/MCP-1 (pg/mL)	CD62P (ng/mL)	NO _x (μmol/L)	TXB ₂ (ng/mL)	TFPI (pg/mL)
Plaquetas (mm³)	R=0,353 ⁿ⁼⁵⁷ P=0,007	ns ⁿ⁼⁵⁶	ns ⁿ⁼⁵²	ns ⁿ⁼⁴⁵	ns ⁿ⁼⁴⁴	R=-0,353 ⁿ⁼⁴⁸ P=0,014
Hematócrito (%)	ns ⁿ⁼⁵⁶	R=0,299 ⁿ⁼⁵⁵ P=0,0265	ns ⁿ⁼⁵¹	ns ⁿ⁼⁴⁴	ns ⁿ⁼⁴³	ns ⁿ⁼⁴⁷

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

Uma segunda forma de análise foi comparar a presença ou ausência de manifestações clínicas importantes no comprometimento dos pacientes: manifestações hemorrágicas graves (metrorragia, hematúria) e indícios de extravasamento plasmático (derrames cavitários e/ou ascite) (Tabela 10). Tendências importantes apareceram. Como podemos ver, embora não significativo, os níveis de CCL5/RANTES foram diminuídos nos pacientes apresentando manifestações hemorrágicas e extravasamento plasmático comparados àqueles que não apresentaram. De forma inversa, níveis de TFPI foram maiores nos pacientes apresentando manifestações hemorrágicas e extravasamento plasmático comparados àqueles que não apresentaram esses sintomas. De forma estatisticamente significativa, os níveis de TXB₂ estavam aumentados nos pacientes com extravasamento

plasmático comparado àqueles sem esses sintomas e também naqueles com manifestações hemorrágicas, embora esta última não significativamente.

Esse resultado pode indicar que, em resposta à ocorrência de extravasamento plasmático, há aumento da produção do vasoconstritor TXA₂ (hidrolisado a TXB₂) por células endoteliais e plaquetas nos pacientes.

Tabela 10. Comparações das dosagens de moléculas plasmáticas entre grupos com manifestações clínicas importantes

	Sem manifestações hemorrágicas	Com manifestações hemorrágicas	Sem extravasamento plasmático	Com extravasamento plasmático
CCL5/RANTES (pg/mL)	10550 ⁿ⁼²⁹ (5740-19338)	7648 ⁿ⁼³⁰ (5044-16563)	9987 ⁿ⁼⁴² (5833-18272)	7231 ⁿ⁼⁷ (5259-16349)
CCL2/MCP-1 (pg/mL)	1069 ⁿ⁼³⁰ (678,0-1550)	982,9 ⁿ⁼²⁸ (753,1-1673)	1058 ⁿ⁼⁴² (758,6-1616)	699,3 ⁿ⁼⁶ (542,9-1286)
sCD62P (ng/mL)	13,96 ⁿ⁼²⁸ (11,12-19,86)	13,78 ⁿ⁼²⁶ (10,61-18,96)	13,69 ⁿ⁼⁴¹ (10,28-20,18)	14,24 ⁿ⁼⁵ (10,06-24,40)
NO_x (µmol/L)	0,0 ⁿ⁼²⁴ (0,0-2,08)	0,0 ⁿ⁼²⁴ (0,0-0,96)	12,08 ⁿ⁼³² (10,52-13,63)	13,24 ⁿ⁼⁶ (11,10-17,33)
TXB₂ (ng/mL)	0,65 ⁿ⁼²³ (0,279-3,69)	2,42 ⁿ⁼²⁴ (0,84-10,04)	0,80ⁿ⁼³¹ (0,0-3,26)	3,27ⁿ⁼⁶ (2,08-11,02)*
TFPI (pg/mL)	22660 ⁿ⁼²⁷ (17105-30341)	30892 ⁿ⁼²⁴ (18596-34882)	22870 ⁿ⁼³⁸ (17050-32660)	28530 ⁿ⁼⁵ (20660-43780)

Os níveis de moléculas plasmáticas foram dosados por ensaio imunoenzimático (ELISA) em pacientes com infecção aguda pelo DENV e comparados entre pacientes com ou sem manifestações hemorrágicas e pacientes com ou sem extravasamento plasmático. Para a análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prism v.5. Os dados foram expressos em mediana e os valores entre parênteses representam a variação interquartil (25% - 75%). * representa P<0,05 entre grupo com extravasamento plasmático vs grupo sem extravasamento plasmático.

6. Discussão

Uma das manifestações clínicas chave na dengue é a plaquetopenia (236), que pode ser decorrente tanto de uma produção reduzida (237, 238) como da destruição aumentada de plaquetas (2, 34). Além disso, alteração na função plaquetária pode aumentar o risco de fragilidade vascular levando as hemorragias e contribuindo para o extravasamento plasmático característicos das formas FHD e SCD (54).

6.1 Aumento da ativação pelo CD62P e diminuição da expressão de TLR4 em plaquetas de pacientes infectados pelo DENV.

A análise da expressão de glicoproteínas de membrana na superfície de plaquetas por citometria de fluxo vem sendo utilizada por ser considerada uma metodologia sensível, rápida e quantitativa. Além disso, oferece muitas vantagens sobre os outros métodos de análise, uma vez que possibilita os estudos de ativação, das interações celulares homo- e heterotípicas e da funcionalidade das plaquetas, muito importantes principalmente em estudos clínicos (239, 240).

A inclusão de um agonista exógeno ao ensaio facilita e certifica as análises de ativação plaquetária *in vitro*. Um dos agonistas fisiológicos mais importantes é a trombina, sendo largamente utilizada em estudos de função plaquetária (241, 242).

Nossos resultados confirmaram a ativação das plaquetas oriundas de doadores saudáveis quando incubadas com trombina durante 15 minutos. Essa ativação foi caracterizada pela indução da degranulação, uma vez que a secreção dos constituintes dos grânulos α leva ao aumento da expressão de CD62P (243-246), e a mudança conformacional da GPIIb-IIIa (247), resultando no aumento da afinidade de ligação ao fibrinogênio, que é um de seus ligantes. Em relação à expressão dos receptores do tipo Toll, TLR2 e TLR4, nós não observamos modulação desses receptores após estimulação com trombina, corroborando alguns achados anteriores. Por exemplo, Aslam e colaboradores (2006) compararam a expressão de

TLR2, TLR4 e TLR9 em plaquetas humanas em repouso, ativadas com trombina ou estimuladas com LPS. Como demonstrado pelos autores, plaquetas quiescentes expressam pouco TLR2, mas muito TLR4 e TLR9. Após a ativação com trombina, a expressão de TLR2 e TLR4 não foi alterada, porém a expressão extracelular de TLR9 aumentou significativamente, sugerindo sua externalização a partir de compartimentos intracelulares. A estimulação com LPS reduziu apenas a expressão de TLR4 (148).

Por outro lado, quando fomos avaliar o impacto da infecção *in vitro* pelo DENV-2 sobre as plaquetas, nossos resultados não indicaram qualquer efeito detectável quanto à expressão de marcadores associados à ativação plaquetária ou regulação da expressão dos receptores do tipo Toll, TLR2 e TLR4 por citometria de fluxo. Entretanto, nas mesmas condições experimentais, a análise morfológica das plaquetas na presença do DENV-2 por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi caracterizada por modificações morfológicas sugestivas de ativação, como perda de conteúdo citoplasmático, extensões semelhantes à filopódios e presença de inúmeras partículas virais no interior de vesículas citoplasmáticas. Nossos dados estão de acordo com o trabalho realizado de Ghosh e colaboradores (2008), em que os autores expuseram o isolado de DENV-2 (originário de cérebro de camundongo) às plaquetas de doadores DENV^{neg} durante 30 minutos, em seguida observaram a morfologia das células por diferentes tipos de microscopia. Os dados dos autores demonstraram recortes extensos na superfície da membrana, extensões semelhantes à filopódios, microfendas com profundidade entre 300 a 500nm, achatamento e adesão à superfície da lâmina, evidência de liberação de micropartículas, degradação do citoplasma e dilatação do sistema canicular aberto. Ainda, os autores observaram um agrupamento e agregação do antígeno de superfície CD41 por microscopia confocal e expressão aumentada de CD62P e ligação ao fibrinogênio nas plaquetas expostas ao DENV-2, confirmando as análises morfológicas, comparadas aos controles em ensaios de citometria de fluxo (38).

Acreditamos que a discrepância entre nossos achados pelas diferentes metodologias possa ser devido às diferentes cinéticas do evento. Assim, é provável que a etapa de visualização das modificações morfológicas no nosso modelo seja uma etapa anterior às alterações nos marcadores de ativação sensíveis a detecção por citometria de fluxo.

A partir das análises *in vitro*, fomos avaliar a expressão de marcadores de ativação e receptores do tipo Toll nas plaquetas de pacientes. Inicialmente, nosso estudo observou uma maior frequência de CD62P nas plaquetas de pacientes DENV, e também no grupo de pacientes com outras doenças febris (ODF) em comparação aos controles. No entanto, esse aumento foi observado nos dois grupos de pacientes, não sendo, portanto, uma característica específica da dengue.

A ativação demonstrada pelo aumento da expressão de CD62P em decorrência de outras infecções virais vem sendo demonstrada em diferentes estudos. Othman e colaboradores (2006) viram que camundongos infectados com adenovírus desenvolvem plaquetopenia e que as plaquetas desses animais aumentam em até 5 vezes a expressão de CD62P. Neste modelo, o adenovírus induz agregação entre plaquetas e leucócitos via CD62P, contribuindo para a plaquetopenia (213).

Em pacientes infectados pelo HIV foi observado maior risco de desenvolver aterotrombose e doenças cardiovasculares. Por consequência, Mayne e colaboradores (2012) demonstraram que plaquetas dos pacientes-HIV⁺ expressam mais CD62P e mais fator tecidual (TF) comparado as plaquetas de doadores saudáveis, o que contribuiria para os riscos cardiovasculares durante a infecção (248).

Na dengue, acredita-se que ocorra um aumento da aderência de plaquetas às células endoteliais através da CD62P, contribuindo à plaquetopenia. De fato, Krishnamurti e colaboradores (2002) utilizaram um modelo *in vitro* bastante interessante no qual, células endoteliais HUVEC pré-tratadas com DENV-2 por 48 horas eram incubadas com plaquetas humanas de doadores para avaliar a porcentagem de aderência. Após de 30 minutos de incubação, os autores observaram que a aderência

das plaquetas às células endoteliais é mediada pela CD62P e que este fenômeno estaria relacionado à plaquetopenia (212).

Nosso trabalho avaliou também a expressão do marcador de ativação de plaquetas CD40L, uma molécula crítica para a apresentação antigênica e regulação da resposta imune adaptativa (249). A avaliação da expressão desse marcador em plaquetas isoladas de pacientes-DENV⁺ não demonstrou diferença na expressão de CD40L entre os grupos de pacientes doentes e indivíduos saudáveis estudados.

Em modelo *in vitro* de infecção pelo DENV, foi demonstrado que a presença de CD40L solúvel em co-culturas de células dendríticas (DCs) infectadas pelo DENV e células T aumentam a indução de IL-12 e IFN- γ pelas células T, sugerindo a participação do CD40L na resposta imune celular na dengue (250).

A expressão de CD40L na superfície de plaquetas ativadas é modulada diferentemente da expressão de CD62P segundo Hermann e colaboradores (2001). De fato, frente à estimulação com agonistas plaquetários, a expressão de CD40L é menor em comparação à expressão de CD62P. Em contraste, a estimulação com baixas concentrações de colágeno induz expressão de CD40L, mas não de proteínas granulares como o CD62P e CD63, indicando que a localização subcelular e o tipo de estímulo são determinantes na expressão dos marcadores de ativação CD62P e CD40L (251).

A perda da funcionalidade plaquetária também pode ser avaliada pela liberação de CD40L solúvel, como demonstrado por Wenzel e colaboradores (2012), que avaliaram as dosagens de CD40L solúvel em aférese de plasma rico em plaquetas. Após 5 dias de armazenamento, houve redução na liberação de CD40L quando plaquetas eram estimuladas, indicando que o CD40L solúvel pode ser utilizado como um marcador de perda de funcionalidade de plaquetas (252).

Estima-se que 95% do CD40L solúvel originam-se de plaquetas. Diferentemente da rápida secreção dos grânulos α , que dura poucos minutos, a secreção de CD40L é bem mais lenta. A ideia que prevalece é que a expressão de CD40L na superfície de plaquetas é um processo

rápido e que o CD40L solúvel é liberado da membrana como um produto de degradação de um processo proteolítico lento. Entretanto, os mecanismos de geração de CD40L solúvel ainda não estão completamente elucidados (253).

Não encontramos trabalhos em dengue comparando a expressão de CD40L e CD62P na ativação plaquetária, porém acreditamos que a interação do DENV com plaquetas module de forma diferente a translocação de CD62P e CD40L dos compartimentos intracelulares para a superfície plaquetária, inclusive com diferentes cinéticas.

A interação *in vitro* do DENV com as plaquetas de doadores não modulou a expressão dos receptores do tipo Toll, TLR2 e TLR4, enquanto que em plaquetas de pacientes infectados pelo DENV, a expressão extracelular de TLR4 foi significativamente reduzida em comparação ao grupo controle.

Um dado interessante da literatura demonstrou uma modulação diferencial da expressão de TLR entre plaquetas ativadas (CD41⁺CD62P⁺) *versus* plaquetas não-ativadas (CD41⁺CD62P^{neg}). Neste contexto, uma alta expressão membranar de TLR2 e TLR9 e baixa de TLR4 nas plaquetas ativadas comparado às não ativadas foi observado. Além disso, TLR2, TLR4 e TLR9 estavam significativamente aumentados na forma intracelular em plaquetas ativadas (149).

A expressão diminuída de TLR4 foi também observada no estudo de Djamiatun e colaboradores (2011), no qual os autores demonstraram polimorfismos gênicos do TLR4 e alterações na transcrição de isoformas do TLR4 na infecção pelo DENV (254). Outro estudo observou que a infecção pelo DENV suprime a expressão gênica de TLR4 (255).

Por outro lado, nosso grupo observou uma alta frequência de monócitos expressando TLR2 e TLR4 em pacientes DENV⁺ principalmente na fase febril comparado aos controles saudáveis. Assim, a infecção pelo DENV desencadearia a expressão de TLR2 e TLR4 nos monócitos e produção de citocinas inflamatórias, sugerindo participação desses receptores na resposta imune antiviral e no aparecimento de manifestações clínicas (235). Nesta mesma linha, autores observaram que

apenas o ligante poly(I:C) do TLR3 foi capaz de induzir diminuição da replicação do DENV-2 em linhagem de hepatócitos, caracterizada tanto pela redução do RNA viral, assim como a indução da expressão de IFN- β e do interferon do tipo III. Desta forma, os autores sugeriram que a sinalização via TLR3 protege as células hepáticas da infecção, sugerindo uma via imunomoduladora e promissora contra a infecção pelo DENV (256).

Existe um número limitado de achados na literatura sobre a expressão e funcionalidade dos TLRs em plaquetas, especialmente em relação a plaquetas na dengue. Especificamente em relação à funcionalidade do TLR4, foi demonstrado que LPS não induz plaquetopenia em animais deficientes de TLR4 (148, 152). De forma bastante similar, em humanos a infusão de LPS também induz uma grave plaquetopenia e agregação plaquetária na circulação microvascular do pulmão e fígado, seguido por degradação das plaquetas e inflamação aguda acompanhada por destruição tecidual (257). Recentemente, van de Weg e colaboradores (2012) demonstraram níveis plasmáticos aumentados de LPS, importante sinalizador da resposta imunológica através do complexo CD14 membranar e TLR4, em todos os grupos de crianças infectadas por DENV de acordo com a gravidade da doença comparado aos controles (258).

Assim, pensamos que o aumento da expressão de CD62P membranar nas plaquetas de pacientes infectados ou não pelo DENV indica que a ativação plaquetária é uma característica comum as infecções por patógenos. Além disso, como foi extensamente discutido na literatura, a expressão de CD62P na superfície de plaquetas favorece as interações homo- e heterotípicas com células imunes e com as células endoteliais, sugerindo fortemente que as plaquetas dos pacientes infectados pelo DENV estariam participando da resposta imune antiviral. No entanto, outras vias e mecanismos imunológicos precisam ser avaliados para confirmar a hipótese. Uma vez que a expressão de CD40L membranar é muito rápida, nossa hipótese é de que o CD40L solúvel seria o melhor indicador da ativação plaquetária em pacientes infectados pelo dengue. Esta última hipótese será avaliada. Quanto a diminuição da expressão de

TLR4 nas plaquetas de pacientes infectados pelo DENV, pode ser, como discutida na literatura, outro indicador de ativação plaquetária, contribuindo ainda mais para o processo de agregação e consequentemente, plaquetopenia. A dosagem do LPS, principal ligante do TLR4, pode nos fornecer mais dados para a compreensão deste mecanismo. Além disso, nosso objetivo futuro é obter plaquetas de pacientes infectados pelo DENV clinicamente graves, com uma plaquetopenia mais acentuada para verificarmos se a diminuição da expressão de TLR4 é restrita a quadro brando ou não.

6.2 DENV-2 interage *in vitro* com plaquetas de doadores

Em 1995, Wang e colaboradores (1995) demonstraram ligação do complexo DENV-anticorpo na superfície de plaquetas independente do receptor Fc, sugerindo que plaquetas seriam células potenciais a infecção pelo DENV (259). Entretanto, Ghosh e colaboradores (2008) não observaram partículas virais dentro das plaquetas de doadores DENV^{neg} expostas ao isolado de DENV-2 (originário de cérebro de camundongo) durante 30 minutos em ensaios de microscopia, embora as células tivessem apresentado perfil morfológico de ativação (38). Mais tarde, Noisakran e colaboradores (2009) detectaram RNA do DENV por RT-PCR convencional, tanto fita positiva como negativa, e partículas semelhantes ao DENV por microscopia eletrônica em plaquetas de pacientes (40). No mesmo ano, utilizando população de plaquetas purificadas de pacientes, Noisakran e colaboradores (2009) confirmaram a presença de antígeno viral por imunofluorescência e microscopia confocal em plaquetas (39). Além disso, por microscopia eletrônica, os autores demonstraram que nas plaquetas de pacientes DENV⁺, as partículas semelhantes ao vírus estavam agrupadas, ou ocasionalmente como uma única partícula, circundada por uma vesícula. Ainda, foram detectadas a expressão de NS1 e antígeno E por diferentes técnicas imunológicas sugerindo fortemente que o DENV ganha acesso e que muito provavelmente se replica de forma transitória nas plaquetas. Desta forma, plaquetas poderiam estar

envolvidas na disseminação da infecção viral durante a viremia. Neste mesmo estudo, os autores detectaram por ensaios de PCR quantitativo em tempo real o RNA viral do DENV em plaquetas expostas ao DENV-2 (cepa 16681) com um pico de replicação viral nas primeiras 18 horas seguido de um declínio. Mais tarde, Noisakran e colaboradores demonstraram que as plaquetas contendo essas partículas semelhantes ao vírus, poderiam estar na categoria de micropartículas derivadas de megacariócitos, pró-plaquetas ou micromegacariócitos (228), o que é coerente com os achados de Nelson e colaboradores (260, 261). Estes últimos observaram a presença de micromegacariócitos e sugerem que a produção de plaquetas da medula óssea está aumentada em resposta à disfunção ou ao baixo número de plaquetas na circulação de pacientes DENV⁺.

No nosso estudo, nós realizamos a marcação intracelular da glicoproteína viral NS1 e do anti-Dengue Complex após 3 horas ou 24 horas de exposição das plaquetas ao DENV-2 ultracentrifugado (cepa 16681), porém não detectamos antígenos virais na população de plaquetas por citometria de fluxo. Entretanto, de forma bastante interessante, no mesmo experimento, além das alterações morfológicas indicativas de ativação das plaquetas expostas ao DENV-2, detectamos a presença de inúmeras partículas virais no interior de vesículas citoplasmáticas, o que complementa e reforça a indicação de que plaquetas são capazes de interagir diretamente com o DENV *in vitro*, internalizando partículas virais quando em estado de ativação.

A supressão da medula óssea é uma das características da infecção pelo DENV. Além de confirmar a detecção de partículas semelhantes a DENV em plaquetas de animais infectados por microscopia eletrônica, Noisakran e colaboradores (2012) isolaram plaquetas da medula óssea de primatas não humanos infectados pelo DENV e detectaram a presença de RNA viral por RT-PCR em tempo real. Análises da celularidade da medula óssea demonstraram que o declínio da massa celular estava inversamente correlacionado à carga viral na circulação periférica dos animais, sugerindo que a desregulação da medula pode estar associada ao aumento da replicação viral. Quando avaliaram a composição celular da

medula, viram que as células predominantes na medula com presença de antígeno viral são as células de linhagem megacariocítica CD61⁺, sugerindo que a infecção de células progenitoras de plaquetas na medula óssea pelo DENV é um fator que pode contribuir para a plaquetopenia (41).

A infecção ou interação de outros vírus em plaquetas tem sido extensamente demonstrada. De Almeida e colaboradores (2009) avaliaram a presença de RNA do vírus da hepatite C (HCV) por RT-PCR no soro e plaquetas de pacientes após a terapia antiviral. De forma interessante, ao final do tratamento os autores detectaram RNA do HCV nas plaquetas e no soro, sugerindo que a persistência do vírus em plaquetas ao final do tratamento está relacionada ao risco de infecção recorrente (262).

O impacto da ativação e/ou infecção de plaquetas pelo DENV tem sido relacionado à patogênese da dengue (38). De fato, as plaquetas possuem receptores como o DC-SIGN, FcγRII e integrinas (202).

Porém não se sabe ainda quais receptores estariam envolvidos na entrada do DENV em plaquetas, ou se ela ocorre através do SCA (39). A presença de RNA viral em plaquetas sugere replicação do DENV em seu interior, porém não se descarta a possibilidade de que o RNA viral seja derivado de progenitores infectados (40).

Assim, se por um lado essas células funcionariam auxiliando a resposta imune antiviral do hospedeiro, por outro lado, é provável que as plaquetas participem da dinâmica da viremia, contribuindo para a disseminação do vírus.

6.3 Plaquetopenia na infecção natural pelo DENV: possíveis causas e efeitos

Na infecção pelo DENV, os pacientes com FHD possuem anormalidades hemostáticas que incluem deficiências nos fatores de coagulação, hiper-fibrinólise, plaquetopenia e disfunção plaquetária. Em contraste, pacientes com FD raramente apresentam coagulopatias ou

comprometimento vascular (2). A plaquetopenia é uma manifestação clínica chave no curso da dengue; além de leucopenia e aumento de transaminases hepáticas (34). A diminuição da contagem de plaquetas se inicia geralmente na fase febril, atingindo níveis menores na fase de defervescência (263).

Em nosso estudo, trabalhamos com pacientes de duas epidemias distintas. Os casos de dengue da epidemia de 2010 foram classificados de acordo com a nova proposta da OMS baseada em critérios de gravidade (54). Nessa coorte de pacientes, a contagem de plaquetas diminuiu e a ocorrência de sangramento aumentou de acordo com o agravamento da doença. A contagem de plaquetas desses pacientes apresentou correlação inversa com as enzimas hepáticas AST/TGO (aspartato aminotransferase/transaminase glutâmica oxalacética) e ALT/TGP (alanina aminotransferase/transaminase glutâmica pirúvica). A relação entre os níveis de ALT e AST com a presença de sangramentos (264, 265) e com a FHD (266) já foram demonstradas na literatura, confirmando o envolvimento dessas enzimas em formas graves da doença. Na dengue, a plaquetopenia está associada ao derrame pleural, indicando que a alteração vascular é um fator essencial associado à plaquetopenia e hemorragias nas formas graves (267).

A coorte de pacientes da epidemia de 2011 não apresentou uma queda importante da contagem de plaquetas, nem manifestações hemorrágicas ou sinais de extravasamento vascular, sendo assim, foram agrupados na sua maioria como FD sem sinais de alarme.

Os padrões de complicações associados à infecção diferem em adultos e crianças; estudo realizado com adultos e crianças infectados pelo DENV demonstrou que sinais de extravasamento vascular e choque são mais frequentes e graves em crianças do que adultos, enquanto que manifestações hemorrágicas e comprometimento de órgãos são mais comuns em adultos, que também apresentam plaquetopenia mais grave. Os autores observaram correlação significativa entre a contagem de plaquetas e a gravidade de sangramentos, porém sugerem que além da plaquetopenia, outros fatores como a ocorrência de infecção secundária

são responsáveis pela maior propensão de manifestações hemorrágicas graves em adultos (268).

A ativação do endotélio vascular está associada à plaquetopenia, e pode contribuir para a dengue grave. Djamiatun e colaboradores (2012) observaram que crianças com FHD/SCD apresentam níveis plasmáticos elevados dos constituintes de corpos de Weibel-Palade (WPB): antígeno do fator de von Willebrand, propeptídeo do vWF e osteoprotegerin, atividade reduzida da enzima ADAMTS-13, uma metaloprotease que funciona como regulador da proteólise de multímeros do vWF e níveis elevados de fator ativador do vWF (vWF em conformação de ligação às plaquetas), indicando que a gravidade da dengue está associada a exocitose dos WPBs contribuindo para a plaquetopenia na dengue (269).

A plaquetopenia também pode estar relacionada ao aumento da fagocitose de plaquetas por macrófagos induzida pelo DENV, apesar do aumento dos níveis de trombopoietina observado em pacientes com infecção secundária pelo DENV (270). As imunoglobulinas associadas à plaquetas PAIgG e PAIgM também estão relacionadas à indução de plaquetopenia e à gravidade durante a fase aguda da infecção pelo DENV (36, 271), assim como a presença do marcador sorológico de diagnóstico de dengue NS1 (272, 273). O dano induzido por peroxidação lipídica pode participar da indução de plaquetopenia na infecção; observaram-se níveis de peroxidação lipídica significativamente menores em pacientes com FD, aumentando de acordo com a gravidade da doença, inversamente correlacionados à contagem de plaquetas em pacientes com FHD/SCD (274).

A reação-cruzada de anticorpos específicos anti-NS1 viral com as plaquetas também contribuiria à plaquetopenia. Neste contexto, Chen e colaboradores (2009) observaram que anticorpos anti-NS1 que não apresentam os epítomos de reação cruzada na porção N terminal (Δ C NS1) tem a sua capacidade de ligação à plaquetas reduzida em comparação com anticorpos anti-NS1 completos e que também inibem a agregação plaquetária após estimulação com ADP. Ainda, animais imunizados com o anti- Δ C NS1 apresentaram tempo de sangramento inferior aos animais

imunizados com anti-NS1 completo, confirmando que a interação anticorpos anti-NS1 e plaquetas pode ser um mecanismo de destruição plaquetária (275).

Não existem diretrizes claras para o manejo clínico de pacientes com plaquetopenia, sendo que a transfusão de plaquetas é a tendência natural (276). Contudo, a transfusão de plaquetas pode agravar a plaquetopenia por promover maior estimulação da resposta imune. De fato, ocorreria um forte estímulo antigênico, desencadeando reações de hipersensibilidade e complicações como efusão pleural, ascite e edema pulmonar (277). A elevação da contagem de plaquetas devida à transfusão é transitória em virtude do curto tempo de vida das plaquetas (278). Desta forma, é indicado que a transfusão de plaquetas seja avaliada cuidadosamente. Ao contrário da transfusão terapêutica (feita em pacientes com sangramentos), a transfusão de plaquetas de forma profilática (realizada em pacientes sem manifestações hemorrágicas) não significa necessariamente redução do risco de sangramentos e melhora clínica do paciente (279). A primeira é recomendável nos casos de manifestações hemorrágicas graves, como sangramento do trato intestinal, e não necessariamente está relacionada à baixa contagem de plaquetas (280).

A leucopenia geralmente é observada durante a fase aguda da doença tanto em casos brandos quanto graves e a plaquetopenia se apresenta na fase aguda, porém na fase de defervescência alcança níveis ainda menores (34, 281). Em estudo realizado por Rubio Jr (2007), foi demonstrada a associação entre a contagem de leucócitos e a contagem de plaquetas com a incidência de sangramentos. Os autores observaram que pacientes com leucopenia grave tinham menor contagem de plaquetas e que pacientes plaquetopênicos apresentaram mais episódios de sangramentos (282).

Assim, uma plaquetopenia acentuada está relacionada às manifestações hemorrágicas graves e, portanto, a avaliação laboratorial desse parâmetro é uma ferramenta chave, que auxilia no diagnóstico diferencial da dengue e no manejo clínico dos pacientes.

6.4 Mediadores plasmáticos associados à ativação plaquetária e inibição do sistema de coagulação estão correlacionados a gravidade da dengue

Durante a hemostasia, formação de trombo e inflamação, as plaquetas liberam fatores com diversas funções fisiológicas. O processo de hemostasia requer a cooperação entre o endotélio vascular, as plaquetas e os fatores plasmáticos de coagulação, como o TFPI. Além da hemostasia, plaquetas liberam moléculas pró-coagulantes como Fator V e Fator VIII, bem como fatores relacionados à reações inflamatórias como proliferação (PDGF e TGF- β), adesão (sCD62P, vWF, fibronectina), agregação (PAF) e vasoconstrição (TXA₂). A ativação plaquetária por diferentes agonistas também induz a secreção de quimiocinas por plaquetas como CCL5/RANTES e CXCL4/PF4. Plaquetas são capazes de depositar quimiocinas em células endoteliais, levando ao recrutamento de monócitos através da CCL2/MCP-1, por exemplo (185).

Nossos dados demonstraram que a dosagem dos níveis de CD62P solúvel no plasma dos pacientes encontrava-se reduzida no grupo caracterizado pela forma mais branda da doença, tanto da epidemia de 2010 como na de 2011, comparados aos controles. Os demais grupos caracterizados por pacientes mais graves da epidemia de 2010, embora estatisticamente não significativo, apresentaram uma tendência a diminuição da dosagem de sCD62P. Inicialmente, esse último dado era contrário a nossa hipótese, uma vez que pacientes graves teriam uma maior ativação plaquetária e conseqüentemente, maior dosagem de sCD62P. Contudo, nossos resultados corroboram o trabalho de Krishnamurti e colaboradores (2001), que avaliaram a ativação de plaquetas e de células endoteliais através da dosagem de sCD62P no plasma de pacientes DENV⁺ e observaram níveis normais de sCD62P em amostras agudas de pacientes independente da gravidade clínica (267). Nossos resultados iniciais também estão em acordo com o trabalho realizado por Murgue e colaboradores (2001), que encontraram concentrações de sCD62P em controles, em pacientes DENV⁺ e em

pacientes com outras doenças febris dentro da faixa de normalidade, sem diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de sCD62P também estavam mais elevados em pacientes graves do que em pacientes com FD, porém sem diferença estatística, como observado também em nosso estudo (283).

Como as células endoteliais também são fonte de sCD62P, para estimar a contribuição da sCD62P liberada de plaquetas, a razão entre a dosagem de sCD62P e a contagem de plaquetas foi calculada. Obtivemos um dado bastante interessante, diferente do trabalho que verificou apenas os níveis do sCD62P, observando que esta razão estava aumentada de forma significativa de acordo com a gravidade da doença. Assim, de acordo com outros autores, a maior parte da sCD62P origina-se de plaquetas ativadas, e quando ativadas, as plaquetas são removidas da circulação, portanto, o excesso de sCD62P representa degranulação plaquetária recente.

Outro dado importante e que contribui enormemente para a avaliação clínica dos pacientes vem do estudo de Ferroni e colaboradores (2009). Os autores utilizaram da determinação dos níveis de sCD62P como um marcador *in vivo* de ativação plaquetária em pacientes com fatores de risco de doenças cardiovasculares e demonstraram que a sCD62P estava correlacionada com os parâmetro de agregometria, representando uma ferramenta útil para a avaliação da ativação e comportamento plaquetário (284).

Em relação às plaquetas, o óxido nítrico é um importante regulador de suas funções, inibindo a agregação, o recrutamento e a adesão ao endotélio vascular, como descrito anteriormente. Além disso, é um potente vasodilator e, portanto, na dengue teria um envolvimento importante nas alterações do endotélio vascular relacionadas ao extravasamento plasmático. A quantificação, o envolvimento e a correlação do óxido nítrico na patogênese da dengue são ainda bastante controversos (285).

Inicialmente, Valero e colaboradores (2002) observaram níveis elevados de NO em pacientes com FD, mas semelhantes entre pacientes

com FHD e os controles. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram que a incubação de plaquetas com DENV não aumentou os níveis de NO em sobrenadante da cultura (286) sugerindo que os níveis elevados de NO na FD poderiam alterar a evolução da doença para formas graves e que o dano de células endoteliais e falhas na NO sintase poderiam ser responsáveis pelos níveis basais de NO na FHD. Contrariamente, outro estudo demonstrou níveis séricos de NO reduzidos em pacientes com FD em relação aos controles e que pacientes com SCD tinham níveis de NO mais elevados que pacientes com FHD (287). Os autores sugerem que a diminuição dos níveis de NO em pacientes em relação a controles pode ser decorrente do dano endotelial, incapacitando o endotélio de produzir NO. Mendes-Ribeiro e colaboradores (2008) sugeriram que a diminuição da agregação plaquetária na dengue pode ser explicada pelo aumento da atividade de óxido nítrico sintase (NOS) e aumento do transporte de L-arginina em plaquetas de pacientes com dengue (288), indicando que o aumento da atividade da NOS estaria envolvido no aumento da produção de NO, que então inibiria a agregação plaquetária. Dados recentes do mesmo grupo demonstram que os níveis do NO endotelial e NO induzido em pacientes com FHD não eram diferentes de controles, apesar da atividade aumentada da NOS em plaquetas de pacientes com FHD, independente dos análogos da arginina (289) sugerindo que a ativação da via intra-plaquetária de geração de NO na FHD contribui para o aumento da permeabilidade vascular e manifestações hemorrágicas na dengue.

As alterações da produção de NO estão associadas à vários efeitos como vasodilatação, inflamação, trombose e resposta imune, promovendo a interação entre plaquetas e células endoteliais, induzindo o extravasamento plasmático. Chaturvedi e colaboradores (2009) sugerem que o NO possui um papel central na infecção pelo DENV, já que a inibição da replicação do DENV pelo NO possui um papel protetor na infecção, evitando o desenvolvimento de formas mais graves da doença e a alteração da permeabilidade (290).

Não observamos diferença nas dosagens de NO_x entre controles e pacientes da epidemia de 2010, independente da gravidade clínica, e apenas um paciente da epidemia de 2011 apresentou nível elevado de NO_x o que aumentou a média do grupo. É provável que a produção de NO_x por plaquetas esteja alterada durante a infecção pelo DENV, influenciando a permeabilidade vascular, porém os dados obtidos representam a produção de NO_x por todos os tipos celulares. É necessário avaliar a produção de NO_x exclusiva por plaquetas através de outras metodologias, com o intuito de relacionar a síntese de NO_x por plaquetas aos parâmetros clínicos de gravidade na dengue.

O TXB₂, metabólito estável do TXA₂, é produzido por plaquetas ativadas, promove a agregação plaquetária e atua no endotélio vascular contrabalaneando a atividade vasodilatadora da prostaciclina (PGI₂) (291), porém sua influência na patogênese da dengue ainda não foi bem esclarecida. O TXA₂ e a PGI₂ são prostanóides funcionalmente antagônicos gerados pelo metabolismo do ácido aracdônico pela ciclooxigenase e por sintases específicas. (292). No sistema vascular, o TXA₂ é produzido predominantemente por plaquetas e estimula a agregação plaquetária e vasoconstrição, enquanto que a PGI₂ possui efeitos opostos ao TXA₂. O desequilíbrio da razão entre os prostanóides está associado à trombose arterial e depende da taxa de síntese de TXA₂ por plaquetas e de PGI₂ por células endoteliais (293).

Existem poucos trabalhos na literatura em relação ao balanço de mediadores relacionados à vasoconstrição/vasodilatação na dengue. Em 1990, Wang e colaboradores (1990) demonstraram que pacientes classificados pelos autores como portadores de uma febre hemorrágica epidêmica apresentaram níveis aumentados de TXB₂ e diminuídos de 6-keto-prostaglandina F1 alfa (6-K-PGF1), o metabólito estável da PGI₂, em relação aos controles saudáveis, sugerindo que o desbalanço entre esses mediadores influenciaria a patogênese da doença (294).

Outro trabalho avaliou os níveis de 6-K-PGF1 e TXB₂ em crianças com FHD com e sem choque e demonstrou que os níveis de 6-K-PGF1 estavam significativamente aumentados em pacientes FHD com choque e sem

choque comparados aos controles. Além disso, os níveis de 6-K-PGF1 tenderam a aumentar em pacientes FHD com choque comparados a pacientes FHD sem choque, porém sem diferença estatística, indicando que os níveis plasmáticos de PGI₂ estão aumentados na FHD, principalmente durante o choque. Os níveis de TXB₂ em pacientes FHD sem choque não apresentaram diferenças significativas em comparação aos controles, porém pacientes FHD com choque tinham níveis de TXB₂ significativamente reduzidos em relação aos controles e pacientes FHD sem choque, indicando que o TXA₂ é produzido como um mecanismo compensatório à secreção excessiva de PGI₂ em pacientes com FHD e que o desequilíbrio da produção desses fatores está associado à gravidade na dengue (295).

No nosso estudo, não detectamos diferença significativa nos níveis de TXB₂ entre controles *versus* pacientes DENV⁺ na epidemia de 2011; na epidemia de 2010, pacientes sem sinais de alerta apresentaram níveis diminuídos de TXB₂ comparado aos controles saudáveis e pacientes graves. Acreditamos que qualquer interpretação desses dados seria ainda muito preliminar, por um lado simplíssimo em função da alta variabilidade de dosagens nos grupos de pacientes. Por outro lado, acreditamos que mediadores com função vasodilatadora devam ser pesquisados, incluindo a razão entre os níveis de vasoconstritores/ vasodilatadores, pois talvez o efeito biológico que influencia na clínica do paciente esteja mais relacionado à razão entre os mediadores do que em um mediador especificamente, haja vista que níveis de TXB₂ estavam mais elevados em pacientes que apresentaram extravasamento plasmático comparados àqueles que não apresentaram essa clínica.

O TFPI é sintetizado principalmente por células endoteliais e é um anticoagulante endógeno que modula a coagulação induzida pelo TF, inativando o fator Xa e o complexo TF/VIIa (296). Dados da literatura apontam que a infecção pelo DENV induz a expressão gênica de *TFPI* e que os padrões da modulação de mRNA em células infectadas pelo DENV indicam uma mudança do balanço entre coagulação e fibrinólise, favorecendo a fibrinólise (297). Além disso, autores demonstraram que a

ativação da fibrinólise é mais intensa em pacientes com as formas mais graves da dengue comparado aos pacientes na forma branda e que níveis diminuídos de proteínas anticoagulantes são encontrados em pacientes graves (298). Sendo assim, existiria uma alteração do balanço coagulação *versus* fibrinólise na infecção que estaria associado à gravidade (299). A secreção de TFPI por plaquetas ativadas ainda é controversa (300). Acredita-se que o TFPI seja sintetizado em megacariócitos, armazenado em plaquetas, expresso na superfície de plaquetas ativadas, podendo ser liberado na forma solúvel (301).

No nosso estudo, de forma interessante e mais clara nos paciente oriundos da epidemia de 2010, as dosagens de TFPI aumentavam com a gravidade da doença, corroborando dados da literatura nos quais pacientes-DENV⁺ graves apresentam uma desregulação da cascata de coagulação. Lin e colaboradores (2012) observaram que o antígeno viral NS1 foi capaz de se ligar à trombina, formando um complexo NS1-trombina, e também à protrombina, entretando, a atividade da trombina não foi alterada pela ligação ao NS1. Contudo, o NS1 inibiu a ativação da protrombina, prolongando o tempo de tromboplastina parcial ativada de plasma humano pobre em plaquetas, o que pode contribuir para a desregulação da cascata de coagulação e hemorragias em pacientes graves (302).

Em estudo prévio realizado por nosso grupo, foi demonstrado que a expressão de TF em monócitos era significativamente mais elevada em pacientes graves do que em pacientes brandos e controles. Também, a contagem de plaquetas de pacientes estava indiretamente correlacionada à expressão de TF por monócitos, sugerindo que a ativação dessas células durante a infecção aumenta a expressão e liberação de TF por células infectadas contribuindo para a plaquetopenia (303). É possível que o aumento dos níveis de TFPI em pacientes DENV⁺ observado no presente estudo seja uma resposta ao aumento da expressão de TF, como uma resposta regulatória da cascata de coagulação.

Os níveis de TFPI foram correlacionados diretamente com a frequência de plaquetas CD41⁺ expressando TLR2. É provável que a

ativação de TLR2 seja capaz de afetar a função endotelial e as vias de coagulação, porém, para melhor avaliar se a associação entre a expressão de receptores do tipo Toll e fatores de coagulação na infecção pelo DENV está relacionada à patogênese, são necessários estudos futuros que avaliem essa relação em grupos de pacientes brandos e graves, já que no presente trabalho nós não observamos diferença significativa na expressão de TLR2 em pacientes. Dados na literatura mostram que o tratamento de células HUVEC com lipoproteínas de bactérias agonistas de TLR2 aumenta a expressão de TLR2 por células endoteliais e a permeabilidade da monocamada, bem como aumento da produção de PAI-1 e TF e diminuição da produção de TFPI, sugerindo que a ativação de TLR2 contribui para a coagulopatia e extravasamento plasmático na sepse (304). A ativação de TLR2 por lipopeptídeos bacterianos aumenta a produção de citocinas (por exemplo, IL-6, IL-8, GM-CSF, com exceção de TNF- α) e de moléculas de adesão tais como ICAM-1. O tratamento de animais com agonistas de TLR2 aumenta a expressão de E-selectina, os níveis de mieloperoxidase e a produção de espécies reativas de oxigênio nos pulmões, além de promover a aderência de leucócitos à monocamada celular, sugerindo que a ativação de TLR2 endotelial contribui para a sepse (305)

Em plaquetas, dados da literatura demonstram que a estimulação de TLR2 induz uma resposta tromboinflamatória. A incubação de plaquetas com agonista de TLR2 induz agregação e adesão ao colágeno, e também a expressão de CD62P, ativação da integrina α IIB β 3 e geração de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que plaquetas expressam TLR2 funcional capaz de reconhecer ligantes bacterianos e ativar vias trombóticas e inflamatórias (306). Contraditoriamente, Ward e colaboradores (2005) demonstraram que a ativação de TLR2 e TLR4 por agonistas não resultou em agregação plaquetária, aumento da expressão de CD62P ou aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Os agonistas dos TLRs também não ativaram plaquetas pré-tratadas com epinefrina, ADP ou PAF, sugerindo que TLR2 e TLR4 não possuem efeito na ativação direta de plaquetas (307). Blair e colaboradores (2009) relataram que a ausência de

agregação e secreção plaquetária observada por Ward e colaboradores se deve à utilização de baixas concentrações do ligante em plasma rico em plaquetas e que a utilização de concentrações mais elevadas de ligantes de TLRs é de fato capaz de ativar plaquetas (306).

Apesar de não significativo, nós observamos níveis aumentados de TFPI em pacientes que apresentaram manifestações hemorrágicas e extravasamento plasmático, reforçando a sugestão de que a inibição da cascata de coagulação está relacionada à patogênese da dengue e sugerindo o TFPI como um bom marcador de prognóstico da doença.

Quando ativadas, as plaquetas são capazes de estimular e promover a liberação de quimiocinas por monócitos, como CCL2/MCP-1 (308) e também de secretar diretamente quimiocinas armazenadas em seus grânulos, como CCL5/RANTES (309). Khunchai e colaboradores (2012) demonstraram recentemente que a interação entre a proteína viral NS5 e à proteína associada ao domínio de morte (Daxx) aumentam a produção de CCL5/RANTES (310).

Dados da literatura (311) em pacientes DENV⁺ vêm corroborando nossos achados nos quais demonstramos níveis plasmáticos reduzidos de CCL5/RANTES, enquanto que aumentados de CCL2/MCP-1, de acordo com a gravidade da doença. De forma interessante, níveis plasmáticos de CCL5/RANTES foram correlacionados diretamente à contagem de plaquetas, sendo, portanto um bom indicador de plaquetopenia (311).

A maior parte de quimiocinas em plaquetas é encontrada em grânulos α . Dezenas de citocinas, quimiocinas e outros mediadores também são encontrados ligados à receptores na membrana plaquetária (312). Estudos prévios indicam a associação de quimiocinas com a angiogênese, como uma consequência da infiltração de leucócitos através endotélio e/ou pela indução da expressão de fatores de crescimento como o VEGF; CCL5/RANTES interage com receptores acoplados à proteína G e cadeias de glicosaminoglicanos ligadas à heparan sulfato, estando envolvida em processos angiogênicos (313). Assim como observamos no grupo de pacientes no presente estudo, Polo e colaboradores (1999) avaliaram os níveis de CCL5/RANTES e outras quimiocinas no curso da infecção pelo

HIV-1 e também observaram correlação direta dos níveis de CCL5/RANTES com a contagem de plaquetas (314). As plaquetas representam uma importante fonte de CCL5/RANTES, que é secretado dos grânulos α quando plaquetas são ativadas, e após ligar-se a CCR1, CCR3 e CCR5, induz adesão e transmigração de monócitos e linfócitos T de forma dependente de integrinas e moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1 (315). A quimiocina mais abundante em grânulos α de plaquetas é a CXCL4/PF-4; recentemente, Auerbach e colaboradores (2012) indicaram essa quimiocinas derivada de plaquetas como um fator antiviral endógeno capaz de inibir a infecção pelo HIV-1, ao interagir diretamente com a glicoproteína viral gp120, bloqueando a entrada do vírus (316).

A secreção de quimiocinas por plaquetas no contexto da infecção pelo DENV pode estar alterada, como demonstrada pela correlação direta entre a contagem de plaquetas e níveis de CCL5/RANTES em pacientes DENV⁺, sugerindo que a diminuição da contagem de plaquetas afeta a liberação de quimiocinas, influenciando a progressão da doença.

7. Conclusões e perspectivas

- O aumento da expressão de CD62P membranar nas plaquetas de pacientes infectados pelo DENV indica ativação plaquetária e, portanto, favorecimento das interações homo- e heterotípicas com células imunes e com as células endoteliais, sugerindo assim o envolvimento das plaquetas dos pacientes infectados pelo DENV na resposta imune antiviral.
- As interações heterotípicas de plaquetas especialmente com monócitos, linfócitos e células endoteliais no contexto da infecção pelo DENV serão objetos de estudos prospectivos.
- Baseado na literatura, diferente da avaliação membranar do CD40L nas plaquetas, o CD40L solúvel seria o melhor indicador da ativação plaquetária.
- Considerando a importância do CD40L na interação de plaquetas com a resposta imune adaptativa, outras avaliações serão realizadas para testar essa hipótese.
- A diminuição da expressão de TLR4 nas plaquetas de pacientes infectados pelo DENV é outro indicador de ativação e agregação plaquetária e poderia contribuir consequentemente à plaquetopenia. O impacto potencial dessa modulação na resposta imune antiviral precisa ser investigado.
- Nosso objetivo futuro é obter plaquetas de pacientes infectados pelo DENV clinicamente graves, com uma plaquetopenia mais acentuada para verificarmos se a diminuição da expressão de TLR4 é restrita ao quadro brando e avaliar outros receptores da imunidade inata, como os TLR intracitoplasmáticos, os receptores do gene I induzível pelo ácido retinóico (RIG-I) e do gene 5 associado a diferenciação do melanoma. Além disso, a dosagem do LPS pode nos fornecer mais dados para a compreensão deste mecanismo.
- O impacto da ativação e/ou infecção de plaquetas pelo DENV tem sido relacionado à patogênese da dengue. O real ou provável impacto dessa interação precisa ser mais bem investigado. Se por um lado as

plaquetas poderiam auxiliar a resposta imune antiviral do hospedeiro, por outro lado, poderiam estocar partículas virais, contribuindo para a disseminação do vírus.

- Uma vez que a maior parte do CD62P solúvel origina-se de plaquetas ativadas, e quando ativadas, as plaquetas são removidas da circulação, a razão entre as quantidades de CD62P solúvel e contagem de plaquetas é a relação que melhor representa degranulação plaquetária recente. Na nossa coorte de pacientes, esta relação estava aumentada de forma significativa com a gravidade da doença.
- Os níveis de TFPI estão relacionados à gravidade sendo, portanto, indicado como bom marcador de prognóstico na dengue.
- A secreção de quimiocinas pré-formadas e estocadas ou sintetizadas *de novo* por plaquetas na infecção pelo DENV pode estar alterada de acordo com a alteração quantitativa de plaquetas, o que poderia influenciar na clínica ou ser um indicador do prognóstico da doença.
- Outros mediadores inflamatórios secretados pelas plaquetas serão estudados assim como sua implicação na imunopatogênese.
- A plaquetopenia da infecção pelo DENV pode, enfim, estar relacionada à interação direta ou indireta com o vírus, e através da exposição a mediadores secretados em decorrência da infecção, tem sua funcionalidade alterada, influenciando o sistema de coagulação e a resposta imunológica.

8. Referências bibliográficas

1. Nelson ER, Bierman HR. Dengue Fever: A Thrombocytopenic Disease? *JAMA*. 1964;190:99-103. Epub 1964/10/12.
2. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 2000;13(2):261-76. Epub 2000/08/16.
3. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology*. 1999;257(1):1-6.
4. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(5):429-36. Epub 2006/08/31.
5. WHO. WHO Recommended Surveillance Standards. Second edition. Global Alert and Respose - Disease Outbreak Reported. 2002:116.
6. Blok J. Genetic relationships of the dengue virus serotypes. *J Gen Virol*. 1985;66 (Pt 6):1323-5. Epub 1985/06/01.
7. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002;108(5):717-25. Epub 2002/03/15.
8. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature structural biology*. 2003;10(11):907-12. Epub 2003/10/07.
9. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Micro*. 2007;5(7):518-28.
10. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Micro*. 2010.
11. Chang CJ, Luh HW, Wang SH, Lin HJ, Lee SC, Hu ST. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) interacts with dengue virus core protein. *DNA Cell Biol*. 2001;20(9):569-77. Epub 2001/12/19.
12. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427(6972):313-9. Epub 2004/01/23.
13. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*. 2008;319(5871):1834-7. Epub 2008/03/29.
14. Johnson AJ, Guirakhoo F, Roehrig JT. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. *Virology*. 1994;203(2):241-9. Epub 1994/09/01.
15. Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology*. 1998;246(2):317-28. Epub 1998/07/11.
16. Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol*. 1996;70(12):8765-72. Epub 1996/12/01.

17. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006;80(23):11418-31. Epub 2006/08/25.
18. Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005;38(1):5-16. Epub 2005/02/05.
19. Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *Journal of Virology.* 2005;79(9):5414-20.
20. Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Rensus M, Kroemer M, Lim SP, et al. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(4):372-3. Epub 2006/03/15.
21. Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(10):3889-97. Epub 1989/05/25.
22. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol.* 1999;73(4):3108-16. Epub 1999/03/12.
23. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* 2007;282(12):8873-82.
24. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 9):2605-14. Epub 2006/08/09.
25. Iglesias NG, Filomatori CV, Gamarnik AV. The F1 motif of dengue virus polymerase NS5 is involved in promoter-dependent RNA synthesis. *J Virol.* 2011;85(12):5745-56. Epub 2011/04/08.
26. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine.* 2000;6(7):816-20. Epub 2000/07/11.
27. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2010;67(16):2773-86. Epub 2010/04/08.
28. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells. *PLoS pathogens.* 2008;4(12):e1000244.
29. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol.* 1997;71(11):8475-81. Epub 1997/10/29.
30. Allison SL, Tao YJ, O'Riordain G, Mandl CW, Harrison SC, Heinz FX. Two distinct size classes of immature and mature subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J Virol.* 2003;77(21):11357-66. Epub 2003/10/15.

31. Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, et al. Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS pathogens*. 2010;6(1):e1000718. Epub 2010/01/12.
32. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004;189(8):1411-8. Epub 2004/04/10.
33. Dalrymple N, Mackow ER. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *J Virol*. 2011;85(18):9478-85. Epub 2011/07/08.
34. Oishi K, Saito M, Mapua CA, Natividad FF. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2007;13(3):125-33. Epub 2007/06/27.
35. Boonpucknavig S, Vuttiviroj O, Bunnag C, Bhamarapravati N, Nimmanitya S. Demonstration of dengue antibody complexes on the surface of platelets from patients with dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1979;28(5):881-4. Epub 1979/09/01.
36. Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MTP, Robles AMP, et al. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clinical & Experimental Immunology*. 2004;138(2):299-303.
37. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. In: Alan DMMD, editor. *Platelets*. Second ed. Burlington: Academic Press; 2007. p. 117-43.
38. Ghosh K, Gangodkar S, Jain P, Shetty S, Ramjee S, Poddar P, et al. Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy. *Journal of electron microscopy*. 2008;57(3):113-8. Epub 2008/05/10.
39. Noisakran S, Chokephaibulkit K, Songprakhon P, Onlamoon N, Hsiao HM, Villinger F, et al. A re-evaluation of the mechanisms leading to dengue hemorrhagic fever. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1171 Suppl 1:E24-35. Epub 2009/09/16.
40. Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2009;40(2):253-62. Epub 2009/03/28.
41. Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Clark KB, Villinger F, Ansari AA, et al. Infection of bone marrow cells by dengue virus in vivo. *Experimental hematology*. 2012;40(3):250-9 e4. Epub 2011/12/24.
42. Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp*. 2006;277:3-16; discussion -22, 71-3, 251-3. Epub 2007/02/27.
43. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1983;25(1):53-4. Epub 1983/01/01. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota previa.
44. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil,

- 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiology and Infection*. 1993;111(1):163-70. Epub 1993/08/01.
45. Siqueira JB, Jr., Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(1):48-53. Epub 2005/02/12.
46. Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(7):925-6. Epub 2001/10/31.
47. Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(9):1376-81. Epub 2005/10/19.
48. Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*. 2007;22(5):358-63. Epub 2008/01/17.
49. de Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2009;3(4):e390. Epub 2009/04/29.
50. Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(5):938-40. Epub 2011/05/03.
51. Naveca FG, Souza VC, Silva GA, Maito RM, Granja F, Siqueira T, et al. Complete genome sequence of a Dengue virus serotype 4 strain isolated in Roraima, Brazil. *J Virol*. 2012;86(3):1897-8. Epub 2012/01/17.
52. Janeiro PdRd. Boletim semanal da dengue. In: SMSDC/RJ SSSSC, editor. 2012. p. 8.
53. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis*. 1997;176(2):313-21. Epub 1997/08/01.
54. WHO. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 2009.
55. Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*. 2004;9(9):1022-9. Epub 2004/09/14.
56. Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanarooj S, et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007;26(4):283-90; discussion 91-2. Epub 2007/04/07.
57. Binh PT, Matheus S, Huong VT, Deparis X, Marechal V. Early clinical and biological features of severe clinical manifestations of dengue in Vietnamese adults. *J Clin Virol*. 2009;45(4):276-80. Epub 2009/05/20.
58. Lateef A, Fisher DA, Tambyah PA. Dengue and relative bradycardia. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13(4):650-1. Epub 2007/06/15.
59. WHO, editor. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 1997; Geneva: World Health Organization.

60. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Indian journal of dermatology*. 2010;55(1):68-78. Epub 2010/04/27.
61. Ahmed FU, Mahmood CB, Sharma JD, Hoque SM, Zaman R, Hasan MS. Dengue and dengue haemorrhagic fever in children during the 2000 outbreak in Chittagong, Bangladesh. *Dengue Bulletin*. 2001;25:33-9.
62. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB, Jr., Feres VC, Rocha B, Levi JE, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis*. 2008;197(6):817-24. Epub 2008/02/14.
63. Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, Siripanichgon K. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;39(2):76-81. Epub 2007/05/18.
64. Rigau-Pérez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(5):297-302.
65. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *The Lancet*. 2006;368(9530):170-3.
66. Bandyopadhyay S, Lum LCS, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine & International Health*. 2006;11(8):1238-55.
67. Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2011;16(8):936-48. Epub 2011/06/01. Etude prospective multicentrique sur la classification de la dengue dans quatre pays d'Asie du sud-est et trois d'Amérique latine.
68. Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martinez E, et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC infectious diseases*. 2011;11:106. Epub 2011/04/23.
69. Valdes K, Alvarez M, Pupo M, Vazquez S, Rodriguez R, Guzman MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2000;7(5):856-7. Epub 2000/09/06.
70. Churdboonchart V, Bhamarapravati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991;44(5):481-93. Epub 1991/05/01.
71. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(7):946-51. Epub 2004/04/02.
72. Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond MS, Fremont DH. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*. 2005;437(7059):764-9. Epub 2005/09/30.

73. Vogt MR, Moesker B, Goudsmit J, Jongeneelen M, Austin SK, Oliphant T, et al. Human monoclonal antibodies against West Nile virus induced by natural infection neutralize at a postattachment step. *J Virol*. 2009;83(13):6494-507. Epub 2009/04/24.
74. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *The Yale journal of biology and medicine*. 1970;42(5):350-62. Epub 1970/04/01.
75. Halstead SB. Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses. *Advances in Virus Research: Academic Press*; 2003. p. 421-67.
76. Pierson TC, Xu Q, Nelson S, Oliphant T, Nybakken GE, Fremont DH, et al. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell host & microbe*. 2007;1(2):135-45. Epub 2007/11/17.
77. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological Reviews*. 2008;225(1):300-13.
78. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: A retrospective seroepidemiologic study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;42(2):179-84.
79. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirirakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*. 2010;328(5979):745-8.
80. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1988;38(2):411-9. Epub 1988/03/01.
81. Libraty DH, Acosta LP, Tallo V, Segubre-Mercado E, Bautista A, Potts JA, et al. A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PLoS medicine*. 2009;6(10):e1000171. Epub 2009/10/28.
82. Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(9):4102-7. Epub 1996/04/30.
83. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X-n, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine*. 2003;9(7):921-7.
84. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(39):16922-7. Epub 2010/09/15.
85. Pang T, Cardosa MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock

- syndrome (DHF/DSS). *Immunology and cell biology*. 2007;85(1):43-5. Epub 2006/11/30.
86. Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 2001;204(4):494-507. Epub 2002/01/05.
87. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *The Indian journal of medical research*. 2006;123(1):25-30. Epub 2006/03/29.
88. Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(1):70-5. Epub 2001/08/16.
89. Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2001;30(3):229-33. Epub 2001/05/04.
90. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *Journal of medical virology*. 1998;56(3):280-5. Epub 1998/10/23.
91. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 2002;87(1):42-6. Epub 2002/02/23.
92. Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;92(6):654-6. Epub 1999/05/18.
93. Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanaroj S, Libraty DH, Green S, et al. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever. *J Virol*. 2007;81(4):1592-600. Epub 2006/12/08.
94. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC infectious diseases*. 2008;8:86. Epub 2008/06/27.
95. Cardier JE, Balogh V, Perez-Silva C, Romano E, Rivas B, Bosch N, et al. Relationship of thrombopoietin and interleukin-11 levels to thrombocytopenia associated with dengue disease. *Cytokine*. 2006;34(3-4):155-60. Epub 2006/06/09.
96. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 12):3623-30. Epub 2006/11/14.

97. Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NT, et al. Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2008;198(4):516-24. Epub 2008/07/05.
98. Brett DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual review of biochemistry.* 1994;63:175-95. Epub 1994/01/01.
99. Simmons CP, Popper S, Dolocek C, Chan TNB, Griffiths M, Dung NTP, et al. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases.* 2007;195(8):1097-107.
100. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol.* 2006;133(3):251-8. Epub 2006/04/29.
101. Shi G, Morrell CN. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thrombosis research.* 2011;127(5):387-90. Epub 2010/11/26.
102. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* 2004;25(9):489-95. Epub 2004/08/25.
103. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *The New England journal of medicine.* 2006;354(19):2034-45. Epub 2006/05/12.
104. Ebbe S. Biology of megakaryocytes. *Progress in hemostasis and thrombosis.* 1976;3:211-29.
105. Italiano Jr JE, Hartwig JH. Megakaryocyte development and platelet formation. In: Alan DMMD, editor. *Platelets.* Second ed. Burlington: Academic Press; 2007. p. 23-44.
106. Heijnen HF, Debili N, Vainchencker W, Breton-Gorius J, Geuze HJ, Sixma JJ. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood.* 1998;91(7):2313-25. Epub 1998/04/18.
107. Djaldetti M, Fishman P, Bessler H, Notti I. SEM observations on the mechanism of platelet release from megakaryocytes. *Thrombosis and haemostasis.* 1979;42(2):611-20.
108. Behnke O. An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J Ultrastruct Res.* 1968;24(5):412-33. Epub 1968/09/01.
109. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.* 2007;317(5845):1767-70. Epub 2007/09/22.
110. White JG. Platelet structure. In: Alan DMMD, editor. *Platelets.* Second ed. Burlington: Academic Press; 2007. p. 45-73.
111. Parise LV, Smyth SS, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry and function. *Williams 8ed: McGraw-Hill Professional Publishing;* 2010.
112. White JG, Escolar G. Current concepts of platelet membrane response to surface activation. *Platelets.* 1993;4(4):175-89. Epub 1993/01/01.

113. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(4):264-74. Epub 2011/03/26.
114. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews*. 2009;23(4):177-89. Epub 2009/05/20.
115. Klinger MH, Kluter H. Immunocytochemical colocalization of adhesive proteins with clathrin in human blood platelets: further evidence for coated vesicle-mediated transport of von Willebrand factor, fibrinogen and fibronectin. *Cell Tissue Res*. 1995;279(3):453-7. Epub 1995/03/01.
116. Reed GL. Platelet secretion. In: Alan DMMD, editor. *Platelets*. Second ed. Burlington: Academic Press; 2007. p. 309-18.
117. Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000;96(5):1782-8. Epub 2000/08/29.
118. Ciferri S, Emiliani C, Guglielmini G, Orlicchio A, Nenci GG, Gresele P. Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thrombosis and haemostasis*. 2000;83(1):157-64. Epub 2000/02/11.
119. Lewis JC, Maldonado JE, Mann KG. Phagocytosis in human platelets: localization of acid phosphatase-positive phagosomes following latex uptake. *Blood*. 1976;47(5):833-40. Epub 1976/05/01.
120. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102(2):248-57. Epub 2009/08/05.
121. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Seminars in immunopathology*. 2012;34(1):5-30. Epub 2011/08/06.
122. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(3):s17-24. Epub 2008/02/26.
123. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(2):241-6. Epub 2008/11/06.
124. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(11):2433-40. Epub 2006/10/25.
125. Herd CM, Page CP. Do Platelets have a Role as Inflammatory Cells? In: Joseph M, editor. *Immunopharmacology of Platelets*. London: Academic Press; 1995. p. 1-20.
126. Bergmeier W, Wagner DD. Inflammation. In: Alan DMMD, editor. *Platelets*. Second ed. Burlington: Academic Press; 2007. p. 713-26.
127. Yeaman MR, Bayer AS. Antimicrobial host defense. In: Alan DMMD, editor. *Platelets*. Second ed. Burlington: Academic Press; 2007. p. 727-55.
128. Sudhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 2009;323(5913):474-7. Epub 2009/01/24.

129. Schraw TD, Lemons PP, Dean WL, Whiteheart SW. A role for Sec1/Munc18 proteins in platelet exocytosis. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):207-17. Epub 2003/05/30.
130. Houg A, Polgár J, Reed GL. Munc18-Syntaxin Complexes and Exocytosis in Human Platelets. *J Biol Chem.* 2003;278(22):19627-33.
131. Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS, Seabra MC. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(14):5872-7. Epub 2007/03/27.
132. Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, Aszódi A, Bengtsson T, Berna A, et al. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circulation Research.* 2001;89(3):211-23.
133. Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood.* 1987;70(2):475-83.
134. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood.* 1996;88(3):907-14.
135. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 2000;275(29):21785-8.
136. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. 1996. p. 697-715.
137. Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin Bidirectional Signaling: A Molecular View. *PLoS Biol.* 2004;2(6):e169.
138. O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, et al. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *Journal of Cell Biology.* 1994;124(6):1047-59.
139. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Current Opinion in Cell Biology.* 1992;4(5):766-71.
140. Parise LV, Helgerson SL, Steiner B, Nannizzi L, Phillips DR. Synthetic peptides derived from fibrinogen and fibronectin change the conformation of purified platelet glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem.* 1987;262(26):12597-602.
141. Packham MA, Guccione MA, Greenberg JP, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Release of ¹⁴C-serotonin during initial platelet changes induced by thrombin, collagen, or A23187. *Blood.* 1977;50(5):915-26. Epub 1977/11/01.
142. Joo SJ. Mechanisms of Platelet Activation and Integrin alphaIIbeta3. *Korean circulation journal.* 2012;42(5):295-301. Epub 2012/06/16.
143. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thrombosis research.* 2004;113(6):379-85. Epub 2004/07/01.
144. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science.* 1999;284(5418):1313-8.
145. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology.* 2004;5(10):987-95. Epub 2004/09/30.

146. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):535-42. Epub 2009/06/27.
147. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*. 2005;174(5):2942-50. Epub 2005/02/25.
148. Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KW, Nestel FP, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*. 2006;107(2):637-41. Epub 2005/09/24.
149. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and cell biology*. 2005;83(2):196-8. Epub 2005/03/08.
150. Semple JW, Aslam R, Kim M, Speck ER, Freedman J. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood*. 2007;109(11):4803-5. Epub 2007/02/15.
151. Patrignani P, Di Febbo C, Tacconelli S, Moretta V, Baccante G, Sciulli MG, et al. Reduced thromboxane biosynthesis in carriers of toll-like receptor 4 polymorphisms in vivo. *Blood*. 2006;107(9):3572-4. Epub 2006/01/07.
152. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005;106(7):2417-23. Epub 2005/06/18.
153. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2001;167(5):2887-94. Epub 2001/08/18.
154. Kuhns DB, Priel DA, Gallin JI. Induction of human monocyte interleukin (IL)-8 by fibrinogen through the toll-like receptor pathway. *Inflammation*. 2007;30(5):178-88. Epub 2007/07/13.
155. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol*. 2008;181(5):3495-502. Epub 2008/08/21.
156. Black M, Trent A, Tirrell M, Olive C. Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on toll-like receptor agonists. *Expert review of vaccines*. 2010;9(2):157-73. Epub 2010/01/30.
157. Kasirer-Friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev*. 2007;218:247-64. Epub 2007/07/13.
158. Falet H, Pollitt AY, Begonja AJ, Weber SE, Duerschmied D, Wagner DD, et al. A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(9):1967-79. Epub 2010/08/18.
159. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(6):445-57. Epub 2006/05/20.
160. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(8):2994-8. Epub 1975/08/01.

161. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *The Journal of cell biology*. 1985;101(3):880-6. Epub 1985/09/01.
162. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591-4. Epub 1998/02/19.
163. Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, Gachet C, Conley PB, Goodman SG, et al. G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(4):449-57. Epub 2008/11/22.
164. Rozalski M, Nocun M, Watala C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets: potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta biochimica Polonica*. 2005;52(2):411-5. Epub 2005/05/25.
165. Michelson AD. P2Y12 antagonism: promises and challenges. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(3):s33-8. Epub 2008/01/05.
166. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *The New England journal of medicine*. 2007;357(24):2482-94. Epub 2007/12/14.
167. Giannarelli C, Zafar MU, Badimon JJ. Prostanoid and TP-receptors in atherothrombosis: is there a role for their antagonism? *Thrombosis and haemostasis*. 2010;104(5):949-54. Epub 2010/10/05.
168. Fabre J-E, Nguyen M, Athirakul K, Coggins K, McNeish JD, Austin S, et al. Activation of the murine EP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(5):603-10.
169. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annual review of biochemistry*. 2000;69:419-45. Epub 2000/08/31.
170. Groscurth P, Huracek J, Filgueira L, von Felten A, Rhyner K. Effects of platelet activating factor (PAF) on human citrated whole blood. *European journal of haematology*. 1988;41(1):37-46. Epub 1988/07/01.
171. Boehlen F, Clemetson KJ. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfusion medicine (Oxford, England)*. 2001;11(6):403-17. Epub 2002/02/20.
172. Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AEI, Power CA, Baggiolini M, Wells TNC. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood*. 2000;96(13):4046-54.
173. Pitchford SC, Lodie T, Rankin SM. VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelet production in mice. *Blood*. 2012. Epub 2012/06/02.
174. Abi-Younes S, Si-Tahar M, Luster AD. The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4. *Thrombosis research*. 2001;101(4):279-89. Epub 2001/03/15.
175. Qu Z, Chaikof EL. Interface between hemostasis and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(5):634-42.

176. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. San Rafael CA: 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences.; 2010.
177. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(9):938-49.
178. Zingali RB, Monteiro RQ. Apostila - Bioquímica dos Sistemas Cardiovascular e Respiratório. 2009.
179. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;85(6):958-65. Epub 2001/07/04.
180. Edelman R, Nimmannitya S, Colman RW, Talamo RC, Top FH, Jr. Evaluation of the plasma kinin system in dengue hemorrhagic fever. *J Lab Clin Med*. 1975;86(3):410-21. Epub 1975/09/11.
181. Funahara Y, Sumarmo, Wirawan R. Features of DIC in dengue hemorrhagic fever. *Bibl Haematol*. 1983(49):201-11. Epub 1983/01/01.
182. Funahara Y, Ogawa K, Fujita N, Okuno Y. Three possible triggers to induce thrombocytopenia in dengue virus infection. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1987;18(3):351-5. Epub 1987/09/01.
183. Chua MN, Molanida R, de Guzman M, Laberiza F. Prothrombin time and partial thromboplastin time as a predictor of bleeding in patients with dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1993;24 Suppl 1:141-3. Epub 1993/01/01.
184. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1(9):1897-905. Epub 2003/08/28.
185. Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2012. Epub 2012/08/28.
186. Schulz C, Massberg S. Platelets in atherosclerosis and thrombosis. *Handbook of experimental pharmacology*. 2012(210):111-33. Epub 2012/08/25.
187. McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Current opinion in hematology*. 2003;10(2):150-8. Epub 2003/02/13.
188. McEver RP, Cummings RD. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(3):485-91. Epub 1997/08/01.
189. Sallusto F. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica*. 1999;84 Suppl EHA-4:28-31. Epub 2000/07/25.
190. Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001;98(4):1047-54. Epub 2001/08/09.
191. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106(8):896-9. Epub 2002/08/21.
192. Hammwohner M, Ittenson A, Dierkes J, Bukowska A, Klein HU, Lendeckel U, et al. Platelet expression of CD40/CD40 ligand and its

- relation to inflammatory markers and adhesion molecules in patients with atrial fibrillation. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ). 2007;232(4):581-9. Epub 2007/03/30.
193. Elzey BD, Schmidt NW, Crist SA, Kresowik TP, Harty JT, Nieswandt B, et al. Platelet-derived CD154 enables T-cell priming and protection against *Listeria monocytogenes* challenge. *Blood*. 2008;111(7):3684-91. Epub 2008/02/08.
194. Kissel K, Berber S, Nockher A, Santoso S, Bein G, Hackstein H. Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines. *Transfusion*. 2006;46(5):818-27.
195. Kaplanski G, Porat R, Aiura K, Erban JK, Gelfand JA, Dinarello CA. Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin-8 in vitro via an interleukin-1-mediated event. *Blood*. 1993;81(10):2492-5.
196. Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *Journal of Experimental Medicine*. 1992;176(2):587-92.
197. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, et al. Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(2):193-204. Epub 2000/07/19.
198. Santoso S, Sachs UJH, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, et al. The Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM-3) on Human Platelets is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(5):679-91.
199. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, et al. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation*. 2007;115(12):1571-80. Epub 2007/03/21.
200. Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(3):1243-51. Epub 1994/09/01.
201. Altieri DC, Bader R, Mannucci PM, Edgington TS. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *The Journal of cell biology*. 1988;107(5):1893-900.
202. Flaujac C, Boukour S, Cramer-Borde E. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010;67(4):545-56. Epub 2009/12/17.
203. Danon D, Jerushalmy Z, De Vries A. Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. *Electron microscopical observation. Virology*. 1959;9:719-22. Epub 1959/12/01.
204. Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood*. 2002;99(11):4021-9. Epub 2002/05/16.
205. Wubuli M, Pan KJ, Sun XF, Aibaidula Y, Zhang YX. [Main clinical features and prognosis of AIDS patients with the predominance of

- thrombocytopenia]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2012;92(19):1314-6. Epub 2012/08/14.
206. Zucker-Franklin D, Seremetis S, Zheng Z. Internalization of human immunodeficiency virus type I and other retroviruses by megakaryocytes and platelets. *Blood*. 1990;75(10):1920-3.
207. Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(10):5389-94. Epub 1997/05/13.
208. Stone D, Liu Y, Shayakhmetov D, Li ZY, Ni S, Lieber A. Adenovirus-platelet interaction in blood causes virus sequestration to the reticuloendothelial system of the liver. *J Virol*. 2007;81(9):4866-71. Epub 2007/02/16.
209. Ahmad A, Menezes J. Binding of the Epstein-Barr virus to human platelets causes the release of transforming growth factor-beta. *J Immunol*. 1997;159(8):3984-8. Epub 1997/10/23.
210. Zahn A, Jennings N, Ouwehand WH, Allain JP. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 8):2243-51. Epub 2006/07/19.
211. Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, et al. DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol*. 2006;80(18):8951-60. Epub 2006/08/31.
212. Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;66(4):435-41. Epub 2002/08/08.
213. Othman M, Labelle A, Mazzetti I, Elbatarny HS, Lillicrap D. Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance. *Blood*. 2007;109(7):2832-9.
214. Mitrakul C. Bleeding problem in dengue haemorrhagic fever: platelets and coagulation changes. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1987;18(3):407-12. Epub 1987/09/01.
215. Kho LK, Wulur H, Himawan T. Blood and bone marrow changes in dengue haemorrhagic fever. *Paediatr Indones*. 1972;12(1):31-9. Epub 1972/01/01.
216. Rothwell SW, Putnak R, Russa VFLA. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: Characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;54(5):503-10.
217. Srichaikul T. Disseminated intravascular coagulation in dengue haemorrhagic fever. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1987;18(3):303-11. Epub 1987/09/01.
218. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*. 1994;369(6481):533-8. Epub 1994/06/16.

219. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*. 1994;265(5177):1445-7. Epub 1994/09/02.
220. Putintseva E, Vega G, Fernandez L. Alterations in thrombopoiesis in patients with thrombocytopenia produced by dengue hemorrhagic fever. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1986;28(5):269-73. Epub 1986/01/01.
221. Matondang AV, Widodo D, Zulkarnain I, Rengganis I, Trihandini I, Inada K, et al. The correlation between thrombopoietin and platelet count in adult dengue viral infection patients. *Acta medica Indonesiana*. 2004;36(2):62-9. Epub 2005/01/28.
222. Srichaikul T, Nimmannitya S, Sripaisarn T, Kamolsilpa M, Pulgate C. Platelet function during the acute phase of dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1989;20(1):19-25. Epub 1989/03/01.
223. Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2011;236(5):515-23. Epub 2011/04/20.
224. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *Journal of medical virology*. 2001;63(2):143-9. Epub 2001/02/15.
225. Honda S, Saito M, Dimaano EM, Morales PA, Alonzo MTG, Suarez LAC, et al. Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary dengue virus infection by human macrophages. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;80(5):841-5.
226. Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, et al. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5(11):2291-9.
227. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao H-M, Duncan A, Villinger F, Ansari AA, et al. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*. 2010;115(9):1823-34.
228. Noisakran S, Onlamoon N, Songprakhon P, Hsiao HM, Chokephaibulkit K, Perng GC. Cells in dengue virus infection in vivo. *Advances in virology*. 2010;2010:164878. Epub 2010/01/01.
229. Yang KD, Lee CS, Shaio MF. A higher production of platelet activating factor in ex vivo heterologously secondary dengue-2 virus infections. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 1995;42(4):403-7. Epub 1995/01/01.
230. Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S, Thisyakorn U, Lusher J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97(4):627-34. Epub 2007/03/30.
231. Miagostovich MP, Nogueira RM, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1993;35(2):149-54. Epub 1993/03/01.
232. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493-7.

233. Humphrey CD, Pittman FE. A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain technology*. 1974;49(1):9-14. Epub 1974/01/01.
234. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*. 1963;17:208-12. Epub 1963/04/01.
235. Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*. 2010;130(2):202-16. Epub 2010/02/02.
236. Cohen SN, Halstead SB. Shock associated with dengue infection. I. Clinical and physiologic manifestations of dengue hemorrhagic fever in Thailand, 1964. *The Journal of pediatrics*. 1966;68(3):448-56. Epub 1966/03/01.
237. La Russa VF, Innis BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillière's Clinical Haematology*. 1995;8(1):249-70.
238. Rosenfeld SJ, Young NS. Viruses and bone marrow failure. *Blood reviews*. 1991;5(2):71-7. Epub 1991/06/01.
239. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thrombosis and haemostasis*. 1998;79(5):885-96. Epub 1998/06/03.
240. Goodall AH, Appleby J. Flow-cytometric analysis of platelet-membrane glycoprotein expression and platelet activation. *Methods Mol Biol*. 2004;272:225-53. Epub 2004/07/01.
241. Brass LF, Hoxie JA, Kieber-Emmons T, Manning DR, Poncz M, Woolkalis M. Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation. *Advances in experimental medicine and biology*. 1993;344:17-36. Epub 1993/01/01.
242. Hung DT, Vu TK, Wheaton VI, Ishii K, Coughlin SR. Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *The Journal of clinical investigation*. 1992;89(4):1350-3. Epub 1992/04/01.
243. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods*. 2000;21(3):259-70. Epub 2000/06/30.
244. Dumont LJ, VandenBroeke T, Ault KA. Platelet surface P-selectin measurements in platelet preparations: An international collaborative study. *Transfusion Medicine Reviews*. 1999;13(1):31-42.
245. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of Platelet Activation Status by Analyzing P-Selectin Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;273(2):565-70.
246. Whiss PA, Andersson RGG, Srinivas U. Kinetics of platelet P-selectin mobilization: Concurrent surface expression and release induced by thrombin or PMA, and inhibition by the NO Donor SNAP. *Cell Communication and Adhesion*. 1998;6(4):289-300.

247. Isenberg WM, McEver RP, Phillips DR, Shuman MA, Bainton DF. The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. *The Journal of cell biology*. 1987;104(6):1655-63. Epub 1987/06/01.
248. Mayne E, Funderburg NT, Sieg SF, Asaad R, Kalinowska M, Rodriguez B, et al. Increased platelet and microparticle activation in HIV infection: upregulation of P-selectin and tissue factor expression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;59(4):340-6. Epub 2011/12/14.
249. Sprague DL, Sowa JM, Elzey BD, Ratliff TL. The role of platelet CD154 in the modulation in adaptive immunity. *Immunologic research*. 2007;39(1-3):185-93. Epub 2007/10/06.
250. Sun P, Celluzzi CM, Marovich M, Subramanian H, Eller M, Widjaja S, et al. CD40 ligand enhances dengue viral infection of dendritic cells: a possible mechanism for T cell-mediated immunopathology. *J Immunol*. 2006;177(9):6497-503. Epub 2006/10/24.
251. Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets*. 2001;12(2):74-82. Epub 2001/04/12.
252. Wenzel F, Hohlfeld T, Giers G. Soluble CD40L release as test for functional platelet loss. *Clinical laboratory*. 2012;58(3-4):337-42. Epub 2012/05/16.
253. Aukrust P, Damås JK, Solum NO. Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation? *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12):2326-8.
254. Djamiatun K, Ferwerda B, Netea MG, van der Ven AJ, Dolmans WM, Faradz SM. Toll-like receptor 4 polymorphisms in dengue virus-infected children. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;85(2):352-4. Epub 2011/08/05.
255. Modhiran N, Kalayanarooj S, Ubol S. Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(12):e924. Epub 2011/01/05.
256. Liang Z, Wu S, Li Y, He L, Wu M, Jiang L, et al. Activation of Toll-like receptor 3 impairs the dengue virus serotype 2 replication through induction of IFN-beta in cultured hepatoma cells. *PloS one*. 2011;6(8):e23346. Epub 2011/08/11.
257. Kunkel SL, Strieter RM. Cytokine networking in lung inflammation. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1990;25(10):63-6, 9, 73-6. Epub 1990/10/15.
258. van de Weg CA, Koraka P, van Gorp EC, Mairuhu AT, Supriatna M, Soemantri A, et al. Lipopolysaccharide levels are elevated in dengue virus infected patients and correlate with disease severity. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;53(1):38-42. Epub 2011/10/22.
259. Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology*. 1995;213(1):254-7. Epub 1995/10/20.
260. Nelson ER, Bierman HR, Chulajata R. Hematologic findings in the 1960 hemorrhagic fever epidemic (Dengue) in Thailand. *The American*

- journal of tropical medicine and hygiene. 1964;13:642-9. Epub 1964/07/01.
261. Nelson ER, Tuchinda S, Bierman HR, Chulajata R. Haematology of Thai haemorrhagic fever (dengue). *Bulletin of the World Health Organization*. 1966;35(1):43-4. Epub 1966/01/01.
262. de Almeida AJ, Campos-de-Magalhaes M, Brandao-Mello CE, de Oliveira RV, do Espirito-Santo MP, Yoshida CF, et al. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. *Hepato-gastroenterology*. 2009;56(90):429-36. Epub 2009/07/08.
263. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008;53(3):287-99. Epub 2008/06/05.
264. Parkash O, Almas A, Jafri SM, Hamid S, Akhtar J, Alishah H. Severity of acute hepatitis and its outcome in patients with dengue fever in a tertiary care hospital Karachi, Pakistan (South Asia). *BMC gastroenterology*. 2010;10:43. Epub 2010/05/13.
265. Trung DT, Thao le TT, Hien TT, Hung NT, Vinh NN, Hien PT, et al. Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;83(4):774-80. Epub 2010/10/05.
266. Souza LJ, Alves JG, Nogueira RM, Gicovate Neto C, Bastos DA, Siqueira EW, et al. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2004;8(2):156-63. Epub 2004/09/14.
267. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(6):840-7. Epub 2002/01/17.
268. Trung DT, Thao le TT, Dung NM, Ngoc TV, Hien TT, Chau NV, et al. Clinical features of dengue in a large Vietnamese cohort: intrinsically lower platelet counts and greater risk for bleeding in adults than children. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(6):e1679. Epub 2012/06/30.
269. Djamiatun K, van der Ven AJ, de Groot PG, Faradz SM, Hapsari D, Dolmans WM, et al. Severe dengue is associated with consumption of von Willebrand factor and its cleaving enzyme ADAMTS-13. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(5):e1628. Epub 2012/05/09.
270. Alonzo MT, Lacuesta TL, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LA, Mapua CA, et al. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis*. 2012;205(8):1321-9. Epub 2012/03/03.
271. Honda S, Saito M, Dimaano EM, Morales PA, Alonzo MT, Suarez LA, et al. Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary dengue virus infection by human macrophages. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;80(5):841-5. Epub 2009/05/02.
272. Kulkarni RD, Patil SS, Ajantha GS, Upadhya AK, Kalabhavi AS, Shubhada RM, et al. Association of platelet count and serological markers

- of dengue infection- importance of NS1 antigen. Indian journal of medical microbiology. 2011;29(4):359-62. Epub 2011/11/29.
273. Arya SC, Agarwal N, Parikh SC. Detection of dengue NS1 antigen, alongside IgM plus IgG and concurrent platelet enumeration during an outbreak. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2011;4(8):672. Epub 2011/09/15.
274. Soundravally R, Sankar P, Bobby Z, Hoti SL. Oxidative stress in severe dengue viral infection: Association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. Platelets. 2008;19(6):447-54.
275. Chen MC, Lin CF, Lei HY, Lin SC, Liu HS, Yeh TM, et al. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. J Immunol. 2009;183(3):1797-803. Epub 2009/07/14.
276. Pallavi P, Ganesh CK, Jayashree K, Manjunath GV. Unfurling the rationale use of platelet transfusion in dengue Fever. Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion. 2011;27(2):70-4. Epub 2012/06/02.
277. Sellahewa KH. Management dilemmas in the treatment of dengue fever. Dengue Bulletin. 2008.
278. Isarangkura P, Tuchinda S. The behavior of transfused platelets in dengue hemorrhagic fever. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 1993;24 Suppl 1:222-4. Epub 1993/01/01.
279. Lye DC, Lee VJ, Sun Y, Leo YS. Lack of efficacy of prophylactic platelet transfusion for severe thrombocytopenia in adults with acute uncomplicated dengue infection. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2009;48(9):1262-5. Epub 2009/03/19.
280. Chuansumrit A, Phimolthares V, Tardtong P, Tapaneya-Olarn C, Tapaneya-Olarn W, Kowsathit P, et al. Transfusion requirements in patients with dengue hemorrhagic fever. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 2000;31(1):10-4. Epub 2000/10/07.
281. Oliveira EC, Pontes ER, Cunha RV, Froes IB, Nascimento D. Hematological abnormalities in patients with dengue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009;42(6):682-5. Epub 2010/03/09. Alterações hematológicas em pacientes com dengue.
282. Rubio Jr GD, Torno LL. Association of leukocyte and thrombocyte counts as a predictor of bleeding outcomes among dengue patients. Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases. 2007;36:33-8.
283. Murgue B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. Journal of medical virology. 2001;65(1):97-104. Epub 2001/08/16.
284. Ferroni P, Martini F, Riondino S, La Farina F, Magnapera A, Ciatti F, et al. Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2009;399(1-2):88-91. Epub 2008/10/07.
285. Rodriguez-Ortega M. [Nitric oxide in dengue pathology]. Acta científica venezolana. 1998;49 Suppl 1:8-12. Epub 1999/02/25. Oxido nitrico en la patologia del dengue.

286. Valero N, Espina LM, Anez G, Torres E, Mosquera JA. Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;66(6):762-4. Epub 2002/09/13.
287. Trairatvorakul P, Chongsrisawat V, Ngamvasinont D, Asawarachun D, Nantasook J, Poovorawan Y. Serum nitric oxide in children with Dengue infection. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2005;23(2-3):115-9.
288. Mendes-Ribeiro AC, Moss MB, Siqueira MA, Moraes TL, Ellory JC, Mann GE, et al. Dengue fever activates the L-arginine-nitric oxide pathway: an explanation for reduced aggregation of human platelets. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008;35(10):1143-6. Epub 2008/05/29.
289. Matsuura C, Moraes TL, Barbosa JB, Moss MB, Siqueira MA, Mann GE, et al. Nitric oxide activity in platelets of dengue haemorrhagic fever patients: the apparent paradoxical role of ADMA and I-NMMA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106(3):174-9. Epub 2012/01/31.
290. Chaturvedi UC, Nagar R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009;56(1):9-24.
291. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, et al. Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A2. *Science*. 2002;296(5567):539-41.
292. Mitchell JA, Warner TD. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(1):75-86. Epub 2006/02/18.
293. FitzGerald GA. Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. *The American journal of cardiology*. 2002;89(6A):26D-32D. Epub 2002/03/23.
294. Wang GQ, Zou ZZ, Yu DP. [A study of the role of plasma thromboxane B2 and 6-keto-prostaglandin F1 alpha in epidemic hemorrhagic fever]. *Zhonghua nei ke za zhi [Chinese journal of internal medicine]*. 1990;29(3):138-40, 88. Epub 1990/03/01.
295. Preeyasombat C, Treepongkaruna S, Sriphrapadang A, Choubtum L. The role of prostacyclin (PGI2) and thromboxane A2 (TXA2) in pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF). *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 1999;82 Suppl 1:S16-21. Epub 2000/03/24.
296. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thrombosis research*. 1996;81(1):1-41. Epub 1996/01/01.
297. Chen L-C, Yeh T-M, Lin Y-Y, Wang Y-F, Su S-J, Chen C-Y, et al. The envelope glycoprotein domain III of dengue virus type 2 induced the expression of anticoagulant molecules in endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010;342(1):215-21.
298. Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, Daramola OA, Dung NM, Loan HT, et al. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome.

Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2002;35(3):277-85. Epub 2002/07/13.

299. Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HL, Lin YS, et al. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *Journal of medical virology*. 2001;63(3):247-51. Epub 2001/02/15.

300. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105 Suppl 1:S13-33. Epub 2011/04/12.

301. Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, Collins ML, Ferrel JP, Dale GL, et al. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood*. 2007;109(5):1931-7. Epub 2006/11/04.

302. Lin SW, Chuang YC, Lin YS, Lei HY, Liu HS, Yeh TM. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *The Journal of infection*. 2012;64(3):325-34. Epub 2011/12/06.

303. de Azeredo EL, Kubelka CF, Alburquerque LM, Barbosa LS, Damasco PV, Ávila CAL, et al. Tissue factor expression on monocytes from patients with severe dengue fever. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2010;45(4):334-5.

304. Shin HS, Xu F, Bagchi A, Herrup E, Prakash A, Valentine C, et al. Bacterial lipoprotein TLR2 agonists broadly modulate endothelial function and coagulation pathways in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2011;186(2):1119-30. Epub 2010/12/21.

305. Wilhelmsen K, Mesa KR, Prakash A, Xu F, Hellman J. Activation of endothelial TLR2 by bacterial lipoprotein upregulates proteins specific for the neutrophil response. *Innate immunity*. 2012;18(4):602-16. Epub 2011/12/22.

306. Blair P, Rex S, Vitseva O, Beaulieu L, Tanriverdi K, Chakrabarti S, et al. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ Res*. 2009;104(3):346-54. Epub 2008/12/25.

307. Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, et al. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;94(4):831-8. Epub 2005/11/08.

308. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*. 1997;95(10):2387-94. Epub 1997/05/20.

309. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res*. 2005;96(6):612-6. Epub 2005/04/02.

310. Khunchai S, Junking M, Suttitheptumrong A, Yasamut U, Sawasdee N, Netsawang J, et al. Interaction of dengue virus nonstructural protein 5 with Daxx modulates RANTES production. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423(2):398-403. Epub 2012/06/06.

311. de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Povia TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LD, et al. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue Fever. *PloS one*. 2012;7(7):e38527. Epub 2012/07/21.

312. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F. Platelets and cytokines: How and why? *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2012;19(3):104-8. Epub 2012/06/12.
313. Suffee N, Richard B, Hlawaty H, Oudar O, Charnaux N, Sutton A. Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5. *Biochemical Society transactions*. 2011;39(6):1649-53. Epub 2011/11/23.
314. Polo S, Veglia F, Malnati MS, Gobbi C, Farci P, Raiteri R, et al. Longitudinal analysis of serum chemokine levels in the course of HIV-1 infection. *AIDS (London, England)*. 1999;13(4):447-54. Epub 1999/04/10.
315. Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(11):1920-7. Epub 2008/08/30.
316. Auerbach DJ, Lin Y, Miao H, Cimbro R, Difiore MJ, Gianolini ME, et al. Identification of the platelet-derived chemokine CXCL4/PF-4 as a broad-spectrum HIV-1 inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(24):9569-74. Epub 2012/05/31.