

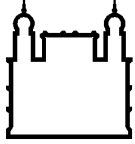
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ENVOLVIMENTO DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS CIRCULANTES EM
PACIENTES COM DENGUE NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS
DE ADESÃO E CD147/EMMPRIN NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

IURY AMÂNCIO PAIVA

Rio de Janeiro
Maio de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

IURY AMÂNCIO PAIVA

Envolvimento de mediadores imunológicos circulantes em pacientes com Dengue na modulação da expressão de moléculas de adesão e CD147/EMMPRIN nas células endoteliais

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

Maio de 2016

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

P149 Paiva, Iury Amâncio

Envolvimento de mediadores imunológicos circulantes em pacientes com Dengue na modulação da expressão de moléculas de adesão e CD147/EMMPRIN nas células endoteliais / Iury Amâncio Paiva. – Rio de Janeiro, 2016.

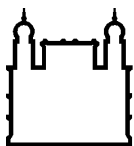
xvii, 109 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 97-109

1. Dengue. 2. Endotélio. 3. Permeabilidade. 4. Mediadores inflamatórios. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: IURY AMÂNCIO PAIVA

ENVOLVIMENTO DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM DENGUE NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO E CD147/EMMPRIN NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

ORIENTADORA: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro- Presidente

Prof. Dra. Joanna Reis – IFRJ

Prof. Dr. Marciano Viana Paes – IOC/FIOCRUZ

Prof. Dra. Adriana Lima Vallochi – IOC/FIOCRUZ

Prof. Dra. Andrea Alice da Silva - UFF

Rio de Janeiro, 20 de Maio de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família, amigos e a todos que de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio incondicional nos momentos de dificuldade e delicados do início ao fim deste processo. Em especial, a meu pai, Paulo, a minha mãe, Mônica, irmãos Thiago e Yan e avó Marlene. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha madrinha Graça pelo apoio incondicional em todas as etapas.

Aos meus amigos de escola, que também foram essenciais nos momentos em que foram necessários esparecimento e apoio.

Aos meus amigos de laboratório, Amanda, Cíntia Mello, Cíntia Marinho, Luciana, Márcio, Nieli e Jéssica pelo apoio em experimentos, momentos de discussões acerca do trabalho e lazer nestes dois anos.

À equipe do Laboratório de Imunologia Viral pelas discussões acerca do projeto.

À Dra. Elzinandes pelo grande apoio em todos os momentos que precisei.

Em especial, à minha orientadora Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto, pela atenção, por me aceitar como seu aluno, por todo o conhecimento compartilhado, ensinamentos, valores profissionais e apoio pessoal em todos os momentos, mesmo estando em outro país.

À Pós-Graduação em Biologia Parasitária pelo apoio pessoal e profissional.

À plataforma de citometria da FIOCRUZ.

Aos Instituto Oswaldo Cruz por fornecer a infraestrutura necessária para a realização deste projeto.

Aos membros da banca pela gentileza de aceitarem o convite.

Aos CNPq, pelo auxílio científico, financeiro e material.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Dengue é uma doença de amplo espectro clínico, variando desde casos assintomáticos até formas graves com manifestações hemorrágicas, derrames vasculares, podendo levar, em menor frequência, ao óbito dos pacientes. É consenso de vários autores que citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios produzidos por diferentes células do sistema imune, assim como pelas células endoteliais, contribuem para as alterações da permeabilidade endotelial observada principalmente na fase de defervescência, independentemente do desfecho clínico do paciente e, na forma grave da dengue. Esses mediadores podem induzir ativação e desarranjo das junções intercelulares das células endoteliais microvasculares, tornando o endotélio mais permissivo à adesão e transmigração de leucócitos e a demais trocas de macromoléculas e água do lúmen dos vasos para os tecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento de mediadores solúveis oriundos do soro/plasma de pacientes infectados pelo DENV na ativação de células endoteliais primárias da microvasculatura dermal humana (HMVEC-d). Para isso, utilizamos soro/plasma obtidos de amostras de sangue de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de Dengue entre 2010 e 2013, e de indivíduos saudáveis. A classificação de gravidade clínica foi baseada na classificação da OMS de 2009. Foram selecionados 130 pacientes, 82 com quadro de dengue sem sinais de alarme (FD), 43 FD com sinais de alarme (FDSA) e 5 pacientes graves. No soro/plasma dos pacientes e controles foi realizada a quantificação dos níveis da citocina TNF- α e das quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e CX3CL1/Fractalina, assim como de VEGF e MMP-9 por ELISA ou LUMINEX. Para avaliar a ativação endotelial, foram feitos co-cultivo de células HMVEC-d na presença de 20% de soro de pacientes ou de Meio de cultura suplementado por 24 horas. Por citometria de fluxo, as HMVEC-d mantidas em cultura foram avaliadas quanto à expressão das moléculas de adesão CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1, assim como da molécula indutora da produção de metaloproteinases de matriz CD147/EMMPRIN. Nesse estudo, confirmamos que contagens de plaquetas, leucócitos e níveis de transaminases AST/TGO e ALT/TGP são associados ao prognóstico clínico da Dengue. Os pacientes, independente do quadro clínico, apresentaram níveis aumentados de TNF- α , CXCL8, CCL2 e CX3CL1 e diminuídos de VEGF e MMP-9 quando comparados aos controles. Não houve diferença significativa nos níveis de CCL5 entre pacientes e controles. O co-cultivo de HMVEC-d com 20% soro de pacientes induziu diminuição na expressão de CD147/EMMPRIN em relação ao co-cultivo com Meio suplementado. Os soros de pacientes FDSA/Grave promoveram uma menor expressão de CD54/ICAM-1 quando comparado aos pacientes FD. Análises de correlação indicaram associação entre os níveis de CX3CL1, CXCL8, MMP9 e CCL5 e a expressão de CD147, CD31, CD54 e CD106, respectivamente. Nossos dados sugerem que mediadores presentes no soro dos pacientes infectados pelo DENV poderiam modular a expressão de moléculas de adesão e de CD147 nas células endoteliais HMVEC-d, induzindo sua ativação e desregulação da barreira endotelial, e assim, contribuindo às alterações da permeabilidade endotelial observada na Dengue.

ABSTRACT

Dengue is a broad clinical spectrum disease, ranging from asymptomatic to severe illness with hemorrhagic manifestations, vascular leakage, which can take less frequently, to the death of patients. Studies point consensual way, cytokines, chemokines and other inflammatory mediators produced by different immune cells as well as the endothelial cells contribute to changes in endothelial permeability. This process is observed mainly in critical or defervescence phase, regardless of the clinical outcome of the patient, and in the severe form of dengue. These secreted mediators could induce activation and derangement of intercellular junctions of microvascular endothelial cells, increasing leukocyte adhesion and transmigration and exchanges of macromolecules and water from lumen of the vessels to the tissues. The aim of this study was to evaluate the involvement of soluble mediators present in serum and plasma from DENV-infected patients on the activation of primary human dermal microvasculature endothelial cells, HMVEC-d. For this, we utilized serum/plasma from blood samples of patients, confirmed clinically and laboratory for Dengue between 2010 and 2013 Dengue outbreaks and, healthy donors. The clinical severity classification was based on the WHO classification from 2009. We selected 130 patients, including 82 with dengue without warning signs (FD), 48 FD with warning signs (FDSA) and 5 Severe dengue patients (FDSA/Grave). In the serum/plasma of patients and controls was performed quantification of the cytokine TNF- α and chemokines CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES and CX3CL1/Fractalkine, as well as VEGF and MMP-9 by ELISA or LUMINEX. To evaluate endothelial cell activation, HMVEC-d were cultivated in the presence of 20% dengue patient serum or culture media for 24 hours. Then we measured the expression of adhesion molecules CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1 and matrix metalloproteinase inducer CD147/EMMPRIN on HMVEC-d by flow cytometry. In this study, we confirmed that platelet and leukocyte counts and the levels of AST/TGO or ALT/TGP are associated to the dengue clinical prognosis. Regardless of clinical severity, DENV-patients showed increased TNF- α , CXCL8, CCL2 and CX3CL1 levels and decreased VEGF and MMP9 levels when compared to controls. CCL5 levels were similar among all groups. The HMVEC-d cultivated with 20% dengue patients' serum induced a lower expression of CD147/EMMPRIN in relation to HMVEC-d cultivated in culture medium alone. Moreover, dengue-serum from FDSA/Grave were able to decrease CD54/ICAM-1 expression when compared to FD. Correlation analysis indicated an association of CX3CL1, CXCL8, MMP-9 and CCL5 levels and the CD147, CD31, CD54 and CD106 expression, respectively. Our data suggests that mediators present in Dengue patients' sera could modulate the expression of adhesion molecules and CD147 in HMVEC-d, inducing endothelial cell activation and barrier dysfunction, influencing the permeability alterations observed during Dengue disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Características estruturais do Vírus Dengue (DENV).....	20
Figura 1.2.	Ciclo de replicação do vírus Dengue.....	23
Figura 1.3.	Classificação da Dengue quanto à gravidade clínica de acordo com as diretrizes da OMS 2009.....	24
Figura 1.4.	Curso da Dengue.....	25
Figura 1.5.	Modelo proposto para a progressão do extravasamento plasmático, hemorragia e envolvimento das células endoteliais durante a infecção pelo DENV...31	
Figura 1.6:	Vias de paracelular e transcelular de transporte.....	33
Figura 1.7:	Vias que regulam a barreira endotelial.....	35
Figura 1.8.	Organização estrutural das interações intercelulares entre células endoteliais.....	37
Figura 1.9.	Modificações nas junções intercelulares que estariam envolvidas com a permeabilidade endotelial.....	39
Figura 1.10.	Etapas do processo de transmigração leucocitária.....	41
Figura 1.11.	Estrutura da CD147/EMMPRIN.....	44
Figura 1.12.	Possível mecanismo de indução da produção de MMPs.....	45
Figura 4.2.	Imagem da cultura de HMVEC-d.....	54
Figura 5.1.	Níveis séricos e plasmáticos de mediadores solúveis em pacientes infectados pelo vírus dengue e controles.....	65
Figura 5.2.	Níveis de VEGF e MMP-9 e quadros de sangramento.....	67
Figura 5.3.	Expressão da molécula CD147/EMMPRIN e de moléculas de adesão CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1.....	70
Figura 5.4.	Expressão de CD147/EMMPRIN, CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1 e CD31/PECAM-1.....	74
Figura 5.5.	Comparação da frequência de HMVEC-d expressando CD147 e as moléculas de adesão em culturas na presença ou não de soro de pacientes.....	76
Figura 5.6.	Modulação da frequência de células endoteliais expressando cada molécula.....	78

Figura 5.7. Correlação dos níveis séricos de mediadores solúveis com a expressão de CD147 e/ou moléculas de adesão.....80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Número de casos de Dengue de 2007 a 2015.....19

Quadro 2: Receptores do DENV em diferentes tipos celulares.....22

Quadro 3. Classificação das Metaloproteinases, MMPs.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.	Detalhamento das epidemias utilizadas neste estudo.....	48
Tabela 4.2.	Especificações dos kits de ELISA e diluição das amostras.....	52
Tabela 4.3.	Soluções para os kits de CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e VEGF.....	52
Tabela 4.4.	Anticorpos Monoclonais utilizados.....	55
Tabela 5.1.	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes.....	59
Tabela 5.2.	Correlação dos dados laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV.....	61
Tabela 5.3.	Correlação entre os dados laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV e os níveis circulantes de mediadores solúveis.....	67
Tabela 5.4.	Características dos pacientes infectados pelo DENV.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD = Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose.

ADE = Facilitação dependente de anticorpo (do inglês *antibody-dependent enhancement*).

ALT/TGP = Alanina Aminotransferase/ Transaminase glutâmico-pirúvica.

AST/TGO = Aspartato Aminotransferase/Transaminase Glutâmico-Oxalacética.

BSA = Albumina Bovina.

CC: família CC quimiocina.

CCL2/MCP-1: ligante 2 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos 1.

CCL4/MIP-1 β : ligante 4 de CC quimiocina/proteína 1 β inflamatória de macrófagos.

CCL5/RANTES: ligante 5 de CC quimiocina/regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais.

CCR5: receptor de quimiocina do tipo CC 5.

VCAM-1 = proteína de adesão celular vascular-1 (do inglês *vascular adhesion molecule*).

EMMPRIN = Molécula indutora da produção de metaloproteinasas de matriz (do inglês *Extracellular matrix metalloproteinase inducer*).

ICAM-1: molécula de adesão intracelular-1 (do inglês *intracellular adhesion molecule*).

CD31/PECAM-1 = Molécula de adesão de plaquetas de células endoteliais (do inglês *Platelet endothelial cell adhesion molecule*).

CLEC5A: Membro A Família 5 do domínio de lectina tipo-C (do inglês “*C-type lectin domain Family 5 member A*”).

CX3C: família CX3C quimiocina.

CX3CL1/Fractalcina: ligante 1 de CX3C quimiocina.

CXCL10/IP-10: ligante 10 de quimiocina CX3C/proteína induzida por IFN- γ .

DC-SIGN = Ligante de Molécula de Adesão Intercelular Não Integrina Específica de célula dendrítica (do inglês *DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin*).

CX3CR1: receptor para família CX3C quimiocina.

DENV = Vírus da Dengue.

DENV-1 = Vírus da Dengue sorotipo 1.

DENV-2 = Vírus da Dengue sorotipo 2.

DENV-3 = Vírus da Dengue sorotipo 3.

DENV-4 = Vírus da Dengue sorotipo 4.

EBM-2: meio endotelial basal.

ECV304: célula endotelial da veia do cordão umbilical humana.

EGM-2MV: meio de crescimento de célula endotelial 2 (do inglês *endothelial growth medium -2MV*).

ELISA = Ensaio imuno-enzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Fc = Fragmento cristalizado.

FcR γ = Receptor para porção Fc de anticorpos classe γ (G).

FD = Febre do Dengue.

FD com SA = Dengue com sinais de alerta.

FD sem AS = Dengue sem sinais de alerta.

FHD = Febre Hemorrágica do Dengue.

FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz.

HDMEC: do inglês “human dermal microvascular endothelial cell”

HMEC-1: do inglês “*human mammary epithelial cells*”.

HMVEC: célula endotelial da microvasculatura dermal humana.

Hsp70/90: família de chaperona 70 e 90.

HSPG: proteoglicanos de heparan sulfato (do inglês “heparan sulfate proteoglycans”).

HUVEC: célula endotelial da veia umbilical humana.

ICAM-1: molécula de adesão intracelular-1.

IFN- γ = Interferon gama.

IgG = Imunoglobulina G.

IgM = Imunoglobulina M.

IL-1 β = Interleucina -1 beta.

IL-1Ra = antagonista do receptor de IL-1.

IL-4 = Interleucina – 4.

IL-6 = Interleucina – 6.

IL-7 = Interleucina – 7.

IL-10 = Interleucina -10.

IL-13 = Interleucina -13.

K562: Linha de célula de leucemia eritromieloblastóide humana (do inglês “human erythromyeloblastoid leukemia cell line”).

LPS: lipopolissacarídeo.

L-SIGN: ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de fígado/linfonodo.

MIF = Fator de Inibição da Migração de Macrófagos.

NK = Natural *Killer*.

NS = Proteína não-estrutural.

OMS = Organização Mundial de Saúde.

OPAS = Organização Pan-Americana de Saúde.

ORF = Fase aberta de leitura (do inglês *Open Reading Frame*).

PBMCs = Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

PBS = Tampão salina fosfato.

PECAM-1 = Molécula de adesão de plaquetas de células endoteliais (do inglês *Platelet endothelial cell adhesion molecule*).

prM = Precursor da proteína M.

Proteína C = Proteína do Capsídeo.

Proteína E = Proteína do Envelope.

Proteína M = Proteína de Membrana.

RBL: Células basofílicas de leucemia-2H3 (do inglês “*basophilic leucemia-2H3 cells*”).

rhEGF: Fator de crescimento epidérmico humano (do inglês “*epidermal growth factor human*”).

rhFGF-B: Fator de crescimento de fibroblastos human –B (do inglês “*human fibroblast growth factor-B*”).

RE = Retículo Endoplasmático.

RNA = Ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid).

RT-PCR = Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa.

SCD = Síndrome do Choque do Dengue.

SFB = Soro Fetal Bovino.

sNS1 = NS1 secretada.

TGF- β = Fator de transformação do crescimento beta (do inglês *Transforming growth factor – beta*).

THP-1: linhagem celular monocítica de leucemia aguda.

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

TNF- α = Fator de necrose tumoral α .

UF = Unidade Federada.

UFMS = Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial.

YFV = Vírus da Febre Amarela.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Histórico e epidemiologia da Dengue no Brasil.....	18
1.2. Vírus Dengue	20
1.2.1. Classificação, Genoma e Características estruturais do vírus.....	20
1.2.2 Replicação do DENV.....	21
1.3. Manifestações clínicas e Classificação da Dengue segundo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde.....	23
1.3.1. Fases Febril, Crítica (Defervescência) e de Recuperação (Convalescente) e Nova Classificação da Dengue de acordo com a OMS 2009.....	25
1.4. Patogênese.....	27
1.4.1. Teoria da virulência viral.....	28
1.4.2. Teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE)	29
1.4.3. Teoria do pecado antigênico original.....	29
1.4.4. “Tempestade” de citocinas.....	30
1.5. Vacinas	32
1.6. Endotélio Vascular.....	33
1.6.1. Função	33
1.7. Junções intercelulares.....	35
1.7.1. Mecanismos que regulam as Junções intercelulares	37
1.8. Transmigração de leucócitos.....	40
1.8.1. Proteínas de adesão a leucócitos.....	40
1.9. Matriz Extracelular e Metaloproteínases de Matriz (MMPs)	42
1.9.1. CD147/EMMPRIN: Indutora da produção de Metaloproteínases de Matriz....	44
2. JUSTIFICATIVA	46
3. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivo Geral	47
3.2. Objetivos Específicos	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1. População de Estudo e Diagnóstico Laboratorial.....	48
4.2. Obtenção de Plasma e Soro dos Pacientes.....	49
4.3. Quantificação dos Níveis Séricos e Plasmáticos de TNF- α e CXCL8/IL-8 pelas Metodologias de Multiplex em Microarranjo Líquido (LUMINEX).	50
4.4. Quantificação dos Níveis Séricos e Plasmáticos de Mediadores Solúveis por ELISA.....	51
4.5. Manutenção das Culturas de Células Primárias da Microvasculatura Dermal HMVEC-d (<i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i>).	53

4.6. Cultivo das HMVEC-d com Soro de Pacientes infectados.....	54
4.7. Marcação Extracelular por Citometria de fluxo.....	55
4.8. Análise Estatística.....	56
5. RESULTADOS	57
5.1. Perfis Demográfico, Clínico e Laboratorial dos Pacientes	57
5.2. Correlação entre Parâmetros Laboratoriais dos Pacientes.....	60
5.3. Avaliação dos Níveis Séricos e Plasmáticos de Mediadores Inflamatórios em Pacientes e Controles.....	61
5.4. Correlação entre Parâmetros Laboratoriais e Níveis de Mediadores Circulantes.....	66
5.5. Caracterização da Expressão da CD147/EMMPRIN e das Moléculas de Adesão CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 nas HMVEC-d e Padronização da Cultura das HMVEC-d na Presença de Soro de Pacientes Infectados pelo DENV.....	68
5.6. Modulação da expressão de CD147/EMMPRIN, CD106/VCAM-1, CD54/ICAM-1 e CD31/PECAM-1 em HMEVC-d na presença de soro de pacientes infectados pelo DENV.....	71
5.7. Correlação entre a Expressão das Moléculas de Adesão e CD147 nas HMVEC-d e Mediadores Séricos.....	79
6. DISCUSSÃO.....	81
6.1. Sorotipo viral, contagem de plaquetas e leucócitos totais e níveis séricos das transaminases hepáticas constituem parâmetros importantes no prognóstico e desfecho clínico da Dengue.....	81
6.2. Participação de mediadores inflamatórios circulantes na imunopatogênese da Dengue com ênfase na alteração da permeabilidade endotelial nas HMVEC-d.	83
7. CONCLUSÃO	95
8. PERSPECTIVAS.....	96
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e epidemiologia da Dengue no Brasil

A infecção pelo vírus Dengue é um dos mais sérios problemas de saúde pública do mundo, afetando mais de 100 países, com uma incidência global que chega a 390 milhões de casos por ano (Normille, 2013). A Dengue emerge em países localizados nas zonas tropicais e subtropicais do globo, principalmente em áreas urbanas (OMS, 2009). Acredita-se que mais de 2,5 bilhões de pessoas, ou seja, cerca de 40% da população mundial, vivam em áreas de risco de transmissão (OMS, 2015).

No Brasil, a implementação da “Marcha para Erradicação do *Aedes aegypti*”, em 1940, que visava inicialmente o controle da Febre Amarela, erradicou o mosquito vetor. Este trabalho foi reconhecido internacionalmente e o método imitado e inserido em países do Continente Americano. Entretanto, com o encerramento do programa e o ambiente propício à reprodução do vetor, a Dengue reemergiu no Território Nacional (Silva *et al*, 2008; Gubler, 1989). Diversos fatores vêm sendo apontados como responsáveis pelo ressurgimento e emergência das epidemias anuais, por exemplo, intensa urbanização, mudanças climáticas e demográficas e a ineficiência dos programas de controle e prevenção do vetor (Suaya *et al*, 2009; Gubler, 2002).

Entre 1981 e 1982, a dengue foi reintroduzida no Brasil, em Boa Vista, Roraima. Esta epidemia foi a primeira documentada e comprovada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4, atingindo cerca de 11 mil pessoas (Osanaí *et al*, 1983). Em 1986, foram registradas epidemias no Rio de Janeiro e no Nordeste do país, causadas pelo DENV-1 (Schatzmayr *et al*, 1986). A partir daí, ocorreu disseminação da Dengue para outras regiões, totalizando 33.500 casos apenas em 1986. No ano seguinte, uma nova epidemia atingiu as cidades do Sudeste e Nordeste, onde foram registrados cerca de 60 mil casos (Teixeira *et al*, 1999).

No início da década de 90, os casos de Dengue concentraram-se, principalmente, nos estados do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e Pernambuco. Nos anos seguintes ocorreu expansão dos DENV-1 e DENV-2 para outras regiões da Federação (Barreto & Teixeira, 2008). No final dos anos 90, em Limeira, São Paulo, foi introduzido o DENV-3. Com a dispersão deste sorotipo pelo país, em 2004, já foi possível detectar a co-circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 em quase todo o Território

Nacional (Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, CID 10: A90). Já em 2006, após alguns anos de predomínio do DENV-3, foi identificada a recirculação do DENV-2. No ano de 2008, foram constatadas epidemias causadas pelo DENV-2 em diversos estados do país, marcando o pior cenário da doença no Brasil em relação ao total de internações e de óbitos, comparado aos anos anteriores. Essas epidemias foram caracterizadas por uma maior quantidade de casos graves em crianças, que representaram mais de 50% dos casos de internações nos municípios de maior contingente populacional (Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, CID 10: A90). Em 2013, tivemos a prevalência do DENV-4, que foi reintroduzido em 2010 no estado de Roraima após quase três décadas sem notificação de casos causados por este sorotipo (Ministério da Saúde, Situação Epidemiológica da Dengue, 2014). No ano passado, 2015, a epidemia de Dengue teve prevalência do sorotipo DENV-1 (Ministério da Saúde, Boletim epidemiológico, 2016).

O número de casos e óbitos constatados nas epidemias da última década pode ser encontrado no quadro abaixo:

Quadro 1. Número de casos de Dengue de 2007 a 2015 no Brasil.

Epidemia (Ano)	Total de casos	FHD/SCD ou Grave (%)	Óbitos (%)
2007	559.954	1.541 (0,2%)*	158 (0,02%)
2008	734.384	9.957 (1,3%)*	212 (0,02%)
2009	528.883	8.223 (1,5%)*	298 (0,05%)
2010	1.004.392	16.540 (1,6%)#	673 (0,06%)
2011	764.032	10.545 (1,3%)#	482 (0,06%)
2012	565.510	4.055 (0,7%)#	284 (0,05%)
2013	1.468.873	6.969 (0,4%)#	545 (0,03%)
2014	591.080	689 (0,1%)#	410 (0,06%)
2015	1.649.008	1.569 (0,09%)#	863 (0,05%)

O quadro mostra o número de casos totais, casos graves e óbitos nas epidemias de 2007 a 2015. * Casos FHD (Febre hemorrágica do Dengue) / SCD (Síndrome do Choque do

Dengue). # Casos Graves. Anos 2007 a 2009, Fonte: Dados obtidos da Organização Pan-Americana de Saúde (2008-2016).

1.2. Vírus Dengue

1.2.1. Classificação, Genoma e Características estruturais do vírus

O vírus Dengue (DENV) pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* e apresenta-se na forma de quatro sorotipos antigenicamente distintos (60-75% de homologia), DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (revisado Guzman & Harris, 2015). Qualquer um dos quatro sorotipos é transmitido por mosquitos fêmeas do gênero *Aedes* através de sua picada, num ciclo humano-mosquito-humano. Os DENVs são vírus icosaédricos, envelopados, constituídos por uma molécula de RNA fita simples, senso positivo, de aproximadamente 11kb, com uma única fase aberta de leitura, ORF (do inglês *Open reading frame*) que codifica uma poliproteína que, quando processada por proteases virais e celulares, dá origem a três proteínas estruturais: capsídeo [C], Membrana [M]/transcrita na forma de seu precursor [prM] e envelope [E] e ainda, a sete proteínas não-estruturais primordiais para o processo de replicação viral: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. A partícula viral infecciosa (madura) possui aproximadamente 50 nm de diâmetro e contém as proteínas estruturais C, M, E e o genoma RNA (Figura 1.1) (Murphy & Whitehead, 2011).

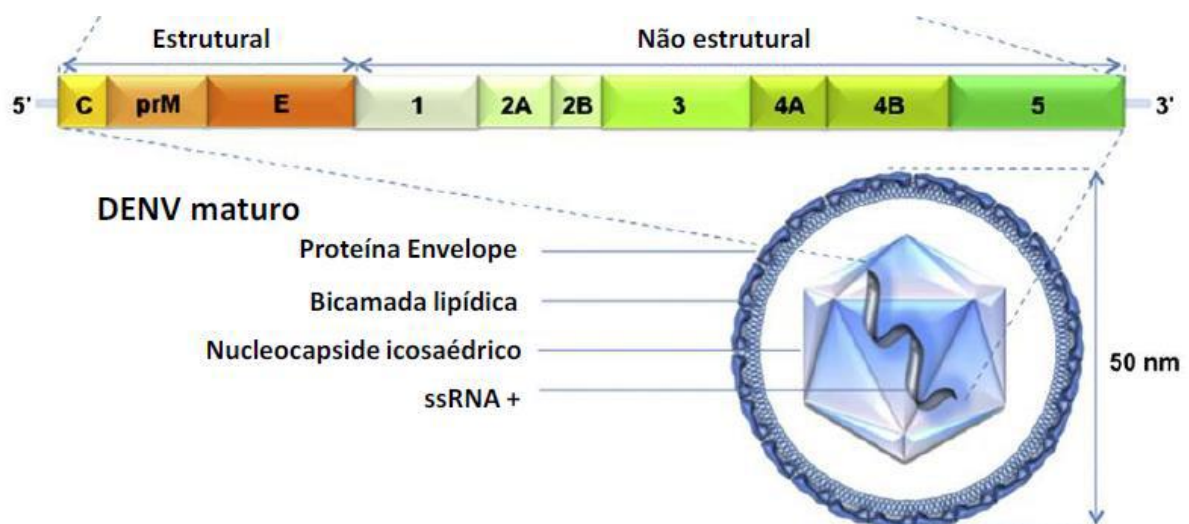


Figura 1.1. Características estruturais do Vírus Dengue (DENV). A partícula viral mede cerca de 40-60nm e contém uma molécula de RNA fita-simples que é encapsulado no interior de um nucleocapsídeo envolto por uma membrana constituída por bicamada lipídica e glicoproteínas. Seu genoma codifica três proteínas estruturais: C (capsídeo), M (membrana) e E (envelope) e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Fonte: Murphy & Whitehead, 2011.

As proteínas E e prM são as principais proteínas estruturais e ambas são alvos da resposta imune humoral. A glicoproteína E é a mais abundante na superfície da partícula viral e é responsável pela ligação e entrada do vírus na célula. A proteína prM atua como uma chaperona impedindo a fusão prematura do domínio hidrofóbico de proteína E com a membrana da célula-alvo no momento da infecção (revisado por Silva *et al*, 2016). Os anticorpos específicos para estas duas proteínas podem estar envolvidos na facilitação da infecção mediada por anticorpos que será discutida posteriormente (revisado por Rothman, 2011).

A proteína NS1 é traduzida inicialmente como um monômero que sofre glicosilação no retículo endoplasmático (RE) na célula do hospedeiro e em seguida, forma dímeros que se associam ao complexo de replicação na membrana do RE. Assim, NS1 atua ativamente no processo de replicação viral. Além disso, as NS1 podem permanecer ancoradas à membrana plasmática da célula hospedeira infectada ou ainda, formar hexâmetros lipofílicos que serão secretados e que posteriormente, poderão se ligar à membrana de células não-infectadas (Gutsche *et al*, 2011; Somnuk *et al*, 2011). Devido a sua capacidade de induzir a cascata de ativação do Sistema Complemento e ao fato de que anticorpos específicos para NS1 podem reagir de forma cruzada com células endoteliais, esta proteína poderia estar envolvida no extravasamento vascular observado nos pacientes apresentando diferentes quadros clínicos (revisado por Herrero *et al*, 2013).

A proteína NS3 é multifuncional e possui atividades enzimáticas envolvidas na replicação do RNA viral. Seu domínio C-terminal atua na síntese de RNA viral e o domínio N-terminal é responsável pela clivagem da poliproteína viral, dando origem às proteínas estruturais e não-estruturais do DENV (revisado por Luo *et al*, 2015). As proteínas NS4A, NS4B e NS2A atuam como antagonistas da sinalização de interferon tipo I, citocina envolvida no controle da infecção inibindo a replicação do DENV (Jones *et al*, 2005). Já a NS5 é a proteína mais conservada entre os quatro sorotipos virais e tem papel fundamental na replicação viral devido seu domínio C-terminal apresentar atividade de RNA-polimerase, auxiliando na síntese de novas fitas de RNA (revisado por Lim *et al*, 2015).

1.2.2 Replicação do DENV

Os principais alvos da infecção pelo DENV são as células mononucleares fagocíticas, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (DC). Além disso, já

foram detectados antígenos virais em hepatócitos, células endoteliais, células de Kupffer, fibras cardíacas e pneumócitos tipo 2 em amostras de tecidos de casos fatais de Dengue (Póvoa *et al*, 2014). Em modelos de infecção *in vitro*, DENV infecta hepatócitos de linhagem HepG2 e Huh7 (revisado por Fang *et al*, 2013), e células endoteliais da veia umbilical humana EA.hy926, HUVEC e as células endoteliais da microvasculatura dermal humana HMVEC-d e HMEC-1 (Kanlaya *et al*, 2009; Dewi *et al*, 2004; Kelley *et al*, 2012, Talavera *et al*, 2004).

A ligação da partícula viral pode ocorrer diretamente ao seu receptor na membrana da célula-alvo ou, no caso de uma infecção secundária, através da interação da porção Fc de anticorpos ligados a partícula viral (imunocomplexo) ao receptor Fc na célula-alvo. Vem sendo descrito que o DENV utiliza diferentes receptores para infectar células-alvo, como descrito resumidamente no Quadro 2 (Fang, 2013). A infecção é mediada por endocitose dependente de clatrina (van der Schaar *et al*, 2008). Uma vez no interior da célula, a vesícula endossomal torna-se acidificada e a partícula viral, mais especificamente a proteína E, sofre alterações conformacionais que permitem a sua fusão com a membrana do endossoma. Em seguida, ocorre liberação do RNA viral fita simples no citoplasma da célula infectada. O RNA viral é então traduzido e replicado no RE e depois empacotado com a proteína do capsídeo, gerando vírions imaturos. Os virions imaturos são envolvidos pelo envelope contendo as proteínas prM e E e transportados para o aparelho de Golgi através de vesículas. Neste local, a protease furina da célula hospedeira cliva a prM para gerar partículas virais maduras ou parcialmente maduras que são liberadas da célula hospedeira por exocitose. A clivagem de prM em M é fundamental à infectividade, uma vez que partículas imaturas são incapazes de promover a fusão do vírus com as membranas celulares (Green *et al*, 2013) (Figura 1.2).

Quadro 2: Receptores do DENV em diferentes tipos celulares

Célula-alvo	Receptor
Células dendríticas	DC-SIGN, L-SIGN
Macrófagos/Monócitos	DC-SIGN, CLEC5A, FcγR
Células endoteliais	Heparan-sulfato, HSPGs e integrina β3

Siglas: DC-SIGN (Ligante de Molécula de Adesão Intercelular Não Integrina Específica de célula dendrítica); CLEC5A (Membro A Família 5 do domínio de lectina tipo-C), HSPG (proteoglicanos de heparan sulfato); FcγR (Receptor da porção Fcγ). Fonte: Fang *et al*, 2013.

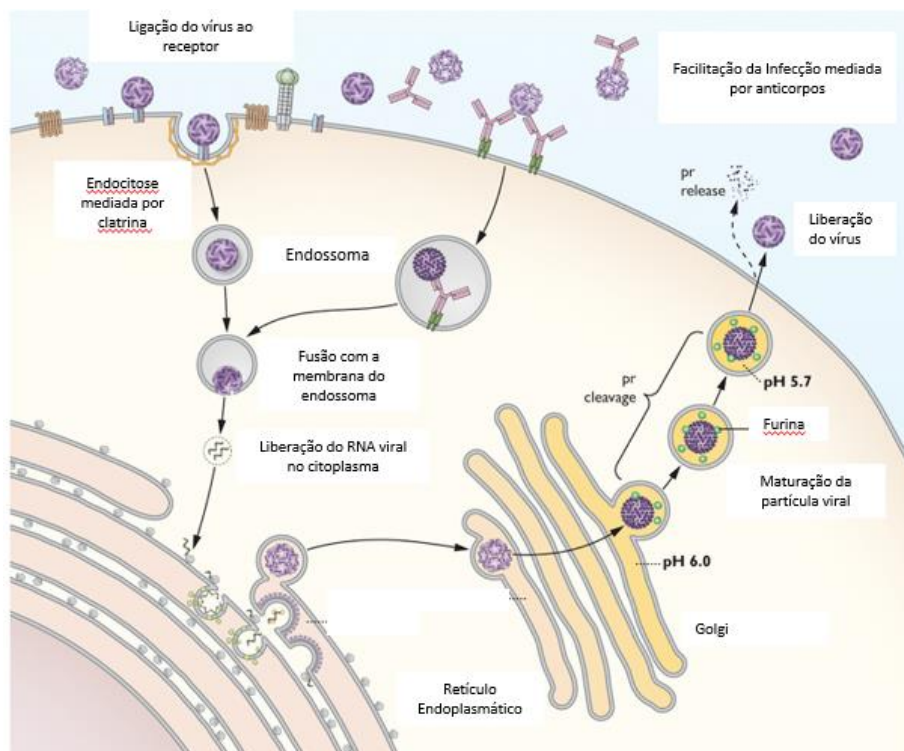


Figura 1.2. Ciclo de replicação do vírus Dengue. O DENV invade a célula através de sua ligação com diferentes receptores, via endocitose mediada por receptor. A acidificação do endossoma resulta em alterações na estrutura da proteína E, expondo o domínio de fusão. Com a perda do capsídeo, o RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido nas membranas do retículo endoplasmático (RE) onde é processado em três proteínas estruturais e sete não estruturais. Após a síntese do complexo de replicação viral, a tradução do RNA se encerra e inicia a síntese de RNA. Após ciclos de tradução sucessivos, ocorre a montagem da partícula viral no RE, maturação do vírion no complexo de Golgi e a partícula viral é então liberada das células via exocitose. Fonte: Adaptado de Pierson & Diamond, 2012.

1.3. Manifestações clínicas e Classificação da Dengue segundo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde.

A dengue tem um amplo espectro de manifestações clínicas, muitas vezes com evolução clínica imprevisível. A maioria dos pacientes apresenta um quadro febril auto-limitado, brando. Em contraste, uma pequena proporção progride para a forma grave da doença, caracterizada por extravasamento plasmático e/ou hemorragia, podendo evoluir para o choque (Srikiatkachorn *et al*, 2011). Não existe um tratamento específico para a Dengue e a conduta clínica visa o alívio dos

sintomas, com reposição de líquidos e administração de paracetamol e/ou dipirona, seguindo as recomendações do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2016).

Em 1997, as infecções pelo DENV foram agrupadas em categorias de acordo com quadro clínico dos pacientes: Febre da dengue (FD) e Febre Hemorrágica do Dengue (FHD). A FHD era subdividida em quatro graus de gravidade, sendo os graus III e IV definidos como Síndrome do choque da dengue (SCD). Com a dispersão da Dengue pelo mundo, tornou-se evidente que esta classificação não era aplicável no manejo clínico em todas as regiões do globo. Isto foi revelado no estudo realizado pela TDR/OMS (Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial da Saúde) que realizou uma comparação das diretrizes clínicas da doença em diferentes países em 2009, com o objetivo de avaliar variações dessa classificação na América Latina e na Ásia. As diferenças encontradas sugeriram a necessidade de uma reanálise e padronização de novas diretrizes. Então, a partir de 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) adotou novos critérios de classificação e dividiu os quadros da doença em Dengue com ou sem Sinais de Alarme e Dengue Grave. Os novos critérios de classificação encontram-se na Figura 1.3.



Figura 1.3. Classificação da Dengue quanto à gravidade clínica de acordo com as diretrizes da OMS 2009. Fonte: Adaptado de OMS, 2009.

Dois estudos compararam as classificações de 1997 e 2009 e tiveram conclusões interessantes. No estudo de Barniol e colaboradores, em 2011, foi verificado que a aplicabilidade da classificação de 1997 era limitada, pois 13,7% dos

casos avaliados não se encaixavam em nenhum dos quadros FD, FHD e SCD, enquanto que na atual de 2009, apenas 1,36% não puderam ser classificados adequadamente. Outro estudo avaliou casos de dengue em uma coorte de pacientes de Cingapura (Gan *et al*, 2013). Primeiramente, verificaram que na classificação de 1997, 92,5% dos casos poderiam ser encaixados em algum dos quadros clínicos, enquanto que na de 2009 essa taxa subiu para 99,3%.

1.3.1. Fases Febril, Crítica (Defervescência) e de Recuperação (Convalescente) e Nova Classificação da Dengue de acordo com a OMS 2009.

Segundo o Tratado de Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle (TRS/OMS, 2009), o curso clínico da dengue pode ser dividido em três fases: febril, crítica (defeverscência) e recuperação (convalescente) (Figura 1.4).

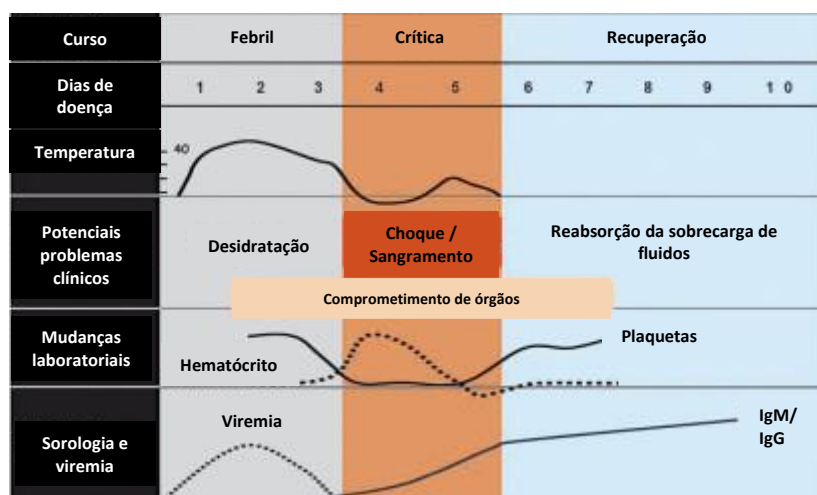


Figura 1.4. Curso da Dengue. O curso clínico da Dengue e as diferentes fases: febril, crítica (defeverscência) e recuperação (convalescente), assim como as cinéticas de temperatura, parâmetros laboratoriais, sorologia e viremia estão representados na figura. Fonte: Adaptado de OMS/TDR, 2009.

Tipicamente, na fase febril os pacientes desenvolvem febre alta de forma abrupta que dura de 2 a 7 dias e é comumente acompanhada de rubor facial, eritemas, mialgia, dor no corpo, artralgia e dor de cabeça. Alguns pacientes apresentam dor de garganta, faringite e irritação conjuntival. Anorexia, náuseas e vômitos são comuns. É difícil distinguir a Dengue de outras doenças febris nesta fase. No entanto, a prova do laço positiva aponta maiores indícios de que o quadro é de Dengue. As manifestações clínicas iniciais não distinguem a evolução clínica dos casos, na tentativa de apontar se a doença será branda ou se vai progredir para a forma grave. O monitoramento dos sinais de alarme e outros parâmetros clínicos nesta fase é crucial para o reconhecimento do desfecho clínico. Podem ser

detectadas algumas manifestações hemorrágicas, como petéquias e sangramentos de mucosas (nariz e gengiva). Também podemos encontrar sangramento vaginal, em mulheres com idade reprodutiva, e gastrointestinal. O fígado pode apresentar hipertrofia e sensibilidade após alguns dias de febre (OMS, 2009).

Na fase seguinte, conhecida como fase crítica ou de defervescência, a temperatura do corpo cai para, em média, 37,5 - 38°C ou menos. Do 3º ao 7º dia de doença, pode ser observado um aumento na permeabilidade vascular em paralelo ao aumento do hematócrito. Isto, juntamente com um decréscimo acentuado na contagem de plaquetas, caracteriza a fase crítica, período com extravasamento plasmático significativo e que dura em média de 1-2 dias. Pacientes que apresentam aumento de permeabilidade vascular podem ter seu quadro agravado como resultado da perda de volume de plasma. O grau de extravasamento varia e podem ser diagnosticados derrame pleural e ascites dependendo do grau de extravasamento. Raio-X de tórax e Ultrassom de abdômen são ferramentas muito úteis no diagnóstico (OMS, 2009).

O choque hipovolêmico ocorre quando um volume crítico de plasma é perdido durante o extravasamento e é quase sempre precedido de sinais de alarme. Se este quadro permanecer por tempo prolongado, o aporte reduzido de sangue para os tecidos resulta no comprometimento progressivo dos órgãos, acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada. Isto leva a hemorragia grave com consequente aumento do hematócrito. Ao invés de leucopenia, usualmente vista nessa fase, a contagem de leucócitos totais pode aumentar em pacientes com sangramento grave. No entanto, o comprometimento grave dos órgãos, como hepatite, encefalite e miocardite e até mesmo hemorragias graves podem se desenvolver sem extravasamento plasmático ou choque hipovolêmico aparentes (OMS, 2009).

Os pacientes que se recuperam após a fase de defervescência são classificados como dengue não-grave, o que inclui os **grupos sem Sinais de Alarme (FD) e com Sinais de Alarme (FDSA)**. Alguns indivíduos progridem para a fase crítica de extravasamento plasmático sem que a temperatura corporal caia, e nestes pacientes, as alterações hematológicas devem ser utilizadas para avaliar o momento de início desta fase (OMS, 2009).

Alguns indivíduos podem evoluir para a **Dengue Grave**, que é definida por um ou mais dos seguintes sintomas: (i) extravasamento plasmático, que pode levar ao choque e/ou acúmulo de fluidos em compartimentos extravasculares; (ii) hemorragia grave; (iii) comprometimento dos órgãos. Conforme a permeabilidade vascular progride, a hipovolemia piora e resulta no choque. Durante o estágio inicial, o mecanismo compensatório que mantém a pressão sanguínea sistólica em níveis normais induz taquicardia e vasoconstrição periférica com perfusão sanguínea diminuída nas extremidades. Por fim, ocorre uma descompensação nas pressões sistólica e diastólica, que caem drasticamente e este quadro de hipotensão e hipóxia, quando prolongado, resulta em falência múltipla de órgãos. Ainda, pacientes Graves podem apresentar alterações na coagulação, mas normalmente não são suficientes para causar grandes hemorragias. Quando o quadro hemorrágico grave ocorre, quase sempre é acompanhado de choque hipovolêmico. Este quadro, em combinação com a trombocitopenia, hipóxia e acidose, pode levar a falência múltipla de órgãos e coagulação intravascular disseminada. Grandes hemorragias podem ocorrer sem o choque hipovolêmico quando se é administrado ácido acetilsalicílico, ibuprofeno ou corticosteróides no paciente. Algumas manifestações incomuns podem ocorrer, incluindo insuficiência hepática aguda e encefalopatias, que acontecem mesmo na ausência de extravasamento plasmático e choque. Cardiomiopatias e encefalite também já foram detectadas. No entanto, a maior parte das mortes por Dengue ocorre em pacientes com choque profundo, particularmente se houver sobrecarga de líquidos (OMS, 2009).

Por fim, na fase de recuperação ou convalescente, ocorre uma reabsorção gradual dos fluidos dos compartimentos extravasculares nas 48-72 horas seguintes. O bem-estar geral e o apetite retornam, os sintomas gastrointestinais cessam e o estado hemodinâmico se estabiliza. O hematócrito volta a níveis normais e a contagem de leucócitos e plaquetas retorna a valores normais. Alguns indivíduos apresentam prurido generalizado, bradicardia e alterações no eletrocardiograma. Problemas respiratórios devido ao derrame pleural e ascite podem ocorrer se a administração intravenosa de fluidos for excessiva, além de hipervolemia (OMS, 2009).

1.4. Patogênese

As diferenças nos quadros clínicos dos pacientes, até mesmo dentro de uma mesma população, continua sendo alvo de intensas investigações. Acredita-se que a

patogênese da Dengue não está relacionada apenas aos aspectos do vírus, mas de uma interação de fatores do hospedeiro, virais e ambientais, como a densidade do vetor e co-circulação de sorotipos (Halstead, 2007; Guzman & Kouri, 2008).

1.4.1. Teoria da virulência viral

Defendida por Rosen (1977) a virulência de determinadas cepas virais estaria relacionada as formas graves da Dengue. De fato, estudos filogenéticos e epidemiológicos vêm demonstrando que determinados genótipos são capazes de produzir maior incidência de dengue grave, como no caso da cepa DENV-2 do Sudeste Asiático quando comparada à cepa DENV-2 Americana (Watts *et al.*, 1999). Faria e colaboradores, em 2013, realizaram análises filogenéticas de cepas virais de DENV-2 isoladas de pacientes com diferentes manifestações, oriundas de 6 Estados brasileiros de 1990 a 2010. Os autores não observaram diferenças consistentes no gene da proteína E, mas as análises de sequenciamento do genoma parcial e/ou completo identificaram duas linhagens de DENV-2, dentre elas, as cepas circulantes antes da emergência do DENV-2 (1990-2003) pertencem ao genótipo do Sudeste Asiático, Linhagem II. Estas cepas apresentavam uma aspargina (N) na região E390, previamente identificada como um marcador genético para a virulência observada em cepas causadoras de FHD de origem asiática.

Tem sido observado que infecções sequenciais por diferentes sorotipos podem estar relacionadas à gravidade. Um estudo prospectivo da epidemia de 1980 na Tailândia revelou que infecções primárias por DENV-1, 3 ou 4, em ordem descendente de magnitude, seguido da secundária pelo DENV-2, são fatores de risco potenciais para a SCD (Sangkawibha *et al.*, 1984). Fried e colaboradores (2010) observaram que DENV-2 é mais frequente em casos de FHD grau I quando comparado com DENV-1. Os mesmos autores também observaram que DENV-2 e 3 eram duas vezes mais relacionados a FHD do que DENV-4. Dos 4 sorotipos, DENV-2 e 3 têm sido associados a surtos de dengue grave, enquanto que DENV-1 e 4 são mais frequentemente a doença branda (Yacoub *et al.*, 2013).

Além destes fatores, algumas teorias foram propostas com o objetivo de tentar compreender os mecanismos que levariam ao quadro grave da dengue. Dentre elas, destacaremos a teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos, a teoria do pecado antigênico original e a tempestade de citocinas.

1.4.2. Teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (ADE)

A Teoria da Facilitação Dependente de Anticorpos (do inglês *antibody dependent enhancement* - ADE) foi proposta por Halsted e O'Rourke em 1977. Esta teoria propõe que a ocorrência de casos graves está associada a pelo menos duas infecções sequenciais por sorotipos distintos. Na infecção primária por um determinado sorotipo seriam gerados anticorpos subneutralizantes com reatividade cruzada a sorotipos distintos. Com a ocorrência de uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo, anticorpos subneutralizantes de reatividade cruzada se ligariam a partícula do vírus infectante, formando um complexo antígeno-anticorpo. Esse complexo imune, através da porção Fc dos anticorpos, se ligaria aos receptores FcR γ expressos nas células-alvo, como monócitos e macrófagos, facilitando sua internalização por endocitose, e conseqüentemente, aumento da replicação e da carga viral (revisado por Halstead, 2003). No entanto, outras evidências mostram que este mecanismo não é suficiente para explicar o desenvolvimento da forma grave. Primeiramente, porque infecções primárias também podem causar quadros graves. Além disso, apesar de uma alta carga viral estar associada à gravidade da doença, no período em que ocorre o extravasamento plasmático e/ou a hemorragia, o título viral é em geral baixo (revisado por Whitehorn & Simmons, 2011). Assim, outros mecanismos associados à gravidade vêm sendo demonstrados.

1.4.3. Teoria do pecado antigênico original

Em 2003, foi postulada a Teoria do Pecado Antigênico Original para explicar a participação das células T específicas para o DENV na gravidade em infecções secundárias (Mongkolsapaya *et al*, 2003). Esta teoria defende que durante uma infecção primária ocorre expansão clonal de população de células T específicas para o sorotipo infectante, ou seja, com grande afinidade pelos seus epítomos, e geração de células de memória específicas. Quando numa infecção secundária por um sorotipo distinto, as células T de memória específicas ao sorotipo anterior responderiam de forma cruzada, mais rapidamente que as células T específicas ao sorotipo infectante. No entanto, devido à baixa afinidade com que reconhecem os epítomos dos antígenos virais da infecção atual, a resposta cruzada das células de memória não seria tão efetiva, com uma menor capacidade citotóxica e de produção de citocinas antivirais, resultando num *clearance* viral menos eficiente (Mangada & Rothman, 2005; Mongkolsapaya *et al*, 2006; revisado por Remy, 2014). Por outro lado, existe uma produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios por estas

células, que dentre outras consequências, levaria a uma ativação constante e desregulada do endotélio com o aumento da permeabilidade vascular.

1.4.4. “Tempestade” de citocinas.

A tempestade de citocinas refere-se à liberação exacerbada ou descontrolada de citocinas pró-inflamatórias e tem sido associada tanto a doenças infecciosas, como as não-infecciosas. Uma das principais consequências da tempestade de citocinas na dengue é seu possível envolvimento no extravasamento plasmático (Tisoncik *et al.*, 2012). No entanto, os mecanismos ainda não são muito bem compreendidos. Vale ressaltar que estes mediadores são necessários no controle do agente infeccioso, porém, a desregulação na sua produção pode levar a efeitos deletérios.

Moléculas pró-inflamatórias, como MIF (Chuang *et al.*, 2011), CCL2/MCP-1 (Lee *et al.*, 2006), CXCL8/IL-8 (Talavera *et al.*, 2004), HGMB (high-mobility group protein 1) e MMPs (metaloproteinases de matriz, do inglês *Matrix Metalloproteinase*) participariam da hiperpermeabilidade vascular pelo rompimento das junções oclusivas e degradação da matriz extracelular (Ong *et al.*, 2012). Além disso, altas concentrações de TNF- α em amostras de soro de pacientes na fase aguda parece ter envolvimento na ativação de células da microvasculatura, levando-as à apoptose (Cardier *et al.*, 2005).

Citocinas como IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-13, IL-7, MIF, IL-10, e outras foram detectadas em níveis elevados em pacientes FHD quando comparadas aos pacientes FD (Chen *et al.*, 2006; Green *et al.*, 1999; de-Oliveira-Pinto *et al.*, 2012; Bozza *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012). Alguns estudos têm demonstrado que o MIF, IL-10, IL-6, MIP-1 β e IFN- γ tem valor no prognóstico de dengue grave (Malavige *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2008). Em crianças FHD e FD mostrou-se que níveis de IL-10 séricos foram mais elevados na fase de defervescência, justamente naqueles que progrediram para SCD (Butthep *et al.*, 2012). Portanto, além de citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras, como IL-1Ra, TGF β -1 e IL-10 também parecem participar significativamente na patogênese da dengue grave. Muitas citocinas são predominantemente produzidas por células T, monócitos, macrófagos, mastócitos e células endoteliais (revisado por Guzman & Harris, 2014).

Desta forma, as manifestações clínicas da dengue podem ser mediadas pela ação conjunta de vários fatores.

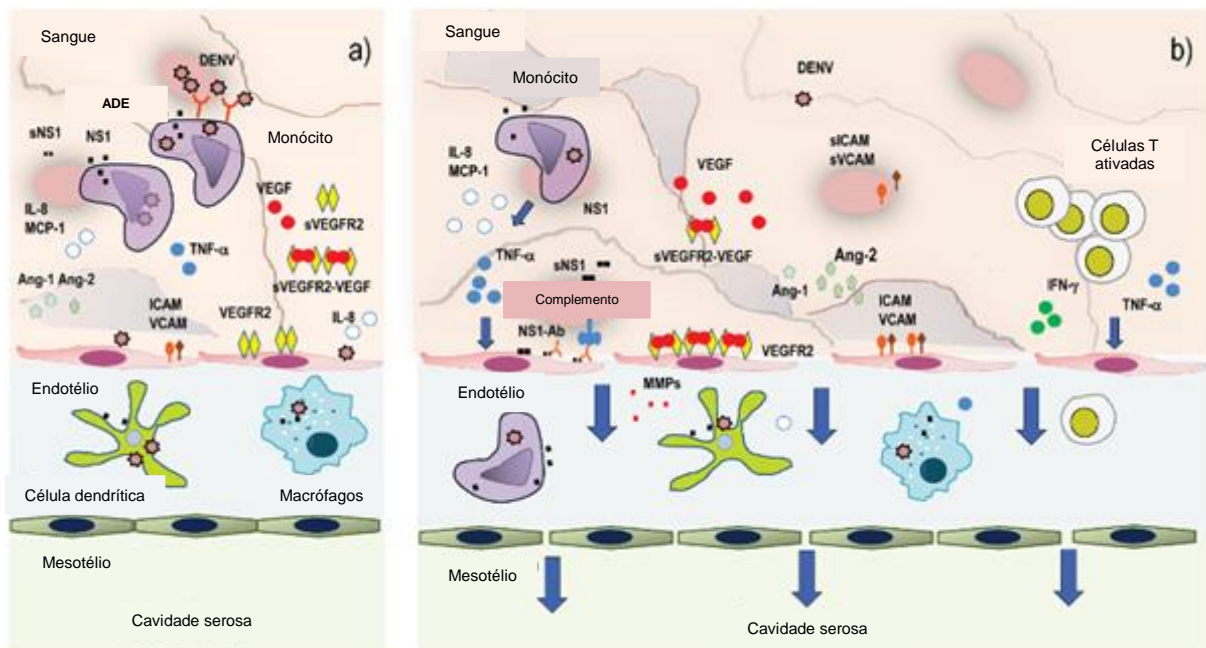


Figura 1.5. Modelo proposto para a progressão do extravasamento plasmático, hemorragia e envolvimento das células endoteliais durante a infecção pelo DENV. (A) Fase aguda (pré-extravasamento): Monócitos, células dendríticas (DCs), macrófagos e células endoteliais infectadas, resultando em viremia aumentada. Estas células produzem quimiocinas como IL-8 e CCL2/MCP-1 e citocinas como TNF- α , ativando a resposta imune inata. A proteína viral NS1 é expressa na superfície de células infectadas e a sNS1 pode ser detectada no sangue. Níveis basais de angiopoietina-1 (ang)-1 e ang-2, VEGF e sVEGFR2 são encontrados no sangue e a expressão de ICAM e VCAM na superfície de células endoteliais. Durante essa fase inicial, o endotélio não está comprometido e não há extravasamento plasmático. (B) Fase de extravasamento plasmático: a sNS1 e complexos anticorpo anti-NS1/NS1 podem interagir com células endoteliais e ativar o sistema complemento. Citocinas como TNF- α , IFN- γ e outros mediadores do aumento da permeabilidade endotelial são produzidos por células infectadas pelo DENV e células T de memória ativadas. Altos níveis de VEGF e níveis mais baixos de sVEGFR2 se correlacionam com o extravasamento plasmático. Ang-1, que antagoniza os efeitos de VEGF encontra-se em níveis mais baixos, enquanto os níveis de seu antagonista ang-2 estão aumentados. A secreção de MMPs por células dendríticas pode causar danos às células endoteliais enquanto a expressão diferencial de ICAM e VCAM entre as células quiescentes e ativadas influencia a adesão e transmigração de leucócitos circulantes. Os níveis circulantes de sICAM e sVCAM são evidência de ativação endotelial e/ou dano. O resultado deste cenário são células endoteliais alteradas e uma barreira enfraquecida, levando ao extravasamento fluidos para as cavidades serosas. Fonte: Srikiatkachorn & Kelley, 2014.

1.5. Vacinas

O desenvolvimento de vacinas para a Dengue é considerado uma das prioridades da Organização Mundial de Saúde. Em dezembro de 2015, saiu a aprovação do registro da primeira vacina contra a Dengue no Brasil: a Dengvaxia, da francesa Sanofi Pasteur pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Inicialmente, a vacina está sendo disponibilizada para a rede particular e a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS vai avaliar se vale a pena incorporar o produto ao sistema público de imunizações. A vacina é indicada para pessoas entre 9 e 45 anos. A promessa do fabricante é de proteção de 93% contra casos graves da doença, redução de 80% das internações e eficácia global de 66% contra todos os tipos do vírus. O imunizante deverá ser aplicado em três doses, com intervalos de seis meses, porém, de acordo com a diretora médica da Sanofi, Sheila Homsani, a partir da primeira dose o produto protege quase 70% das pessoas. A vacina foi criada inserindo os genes que codificam as proteínas prM e E do DENV na vacina atenuada para a febre amarela, 17D. É tetravalente, administrada pela via subcutânea e seus resultados na fase clínica III mostraram eficácia de até 60%. Outras vacinas estão sendo desenvolvidas e em geral, encontram-se na fase clínica I de desenvolvimento.

O risco de desenvolver a forma da grave da Dengue pode ser maior em infecções secundárias por sorotipos heterólogos, o que torna necessário que a vacina seja capaz de gerar imunidade contra os quatro sorotipos simultaneamente. Desta forma, ainda é preciso esforços contínuos para compreender o modo de ação das vacinas em desenvolvimento, para que a população não corra risco de tornar-se mais susceptível as formas graves da Dengue.

1.6. Endotélio Vascular.

1.6.1. Função

O endotélio vascular está envolvido em diferentes processos. Dentre eles, destacam-se: regulação da troca seletiva entre sangue e tecidos de fluidos, macromoléculas e células, coagulação, indução de respostas inflamatórias e angiogênese. O endotélio ainda responde ao microambiente, sintetizando e metabolizando produtos que atuam de maneira autócrina e parácrina, a fim de manter a homeostase (Pries & Kuebler, 2006; Page & Liles, 2013).

A permeabilidade dos vasos a elementos presentes na circulação é caracterizada por um processo altamente coordenado e controlado, regulado ativamente pelas vias transcelular e paracelular de transporte (Figura 1.6) e que integra tráfego de vesículas, rearranjo de junções intercelulares e do citoesqueleto celular (Vestweber *et al*, 2010). Existe um controle dinâmico, altamente sensível às alterações do microambiente vascular, que regula a velocidade de transporte de macromoléculas, vigilância de células do sistema imune e deposição de proteínas de matriz próximo a parede dos vasos no processo de reparo tecidual (Goddard & Iruela-Arispe, 2013).

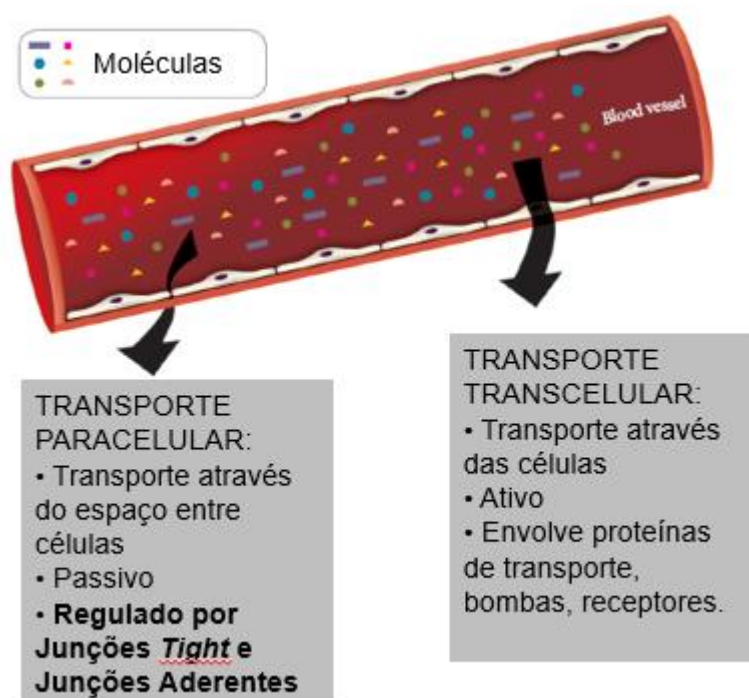


Figura 1.6: Vias de transporte paracelular e transcelular Representação esquemática das vias paracelular e transcelular de transporte de moléculas e células do espaço intravascular para os tecidos adjacentes. Fonte: Yoon *et al*, 2014.

1.6.1.1. Transportes Transcelular e Paracelular

A via transcelular ocorre através do interior das células e é caracterizada pelo transporte de macromoléculas do interior dos vasos para o espaço intersticial através de vesículas, principalmente das cavéolas, e também de organelas vacúolo-vesiculares (VVOs) e canais transcelulares (Mehta & Malik, 2006; Dvorak & Feng, 2001) (Figura 1.7).

As **Cavéolas** são vesículas formadas por grande quantidade de unidades de uma proteína chamada caveolina-1 e tem em média 70nm. Atua no transporte de albumina e outras proteínas do plasma através do endotélio, além de regular o transporte de substâncias hidrofóbicas, como o colesterol, ácidos graxos e hormônios (revisado por Mehta & Malik, 2006). Após a formação da cavéola, esta vesícula é transportada para a membrana baso-lateral, onde o conteúdo é liberado por exocitose (revisado por Yoon *et al*, 2014).

As **organelas vacúolo-vesiculares (VVOs)** são grandes estruturas citoplasmáticas que variam de 80 a 140nm de diâmetro e também estão envolvidas no transporte de macromoléculas. Realizam esta função em sua forma vesicular, porém, diferente das cavéolas, não necessitam de caveolina-1 e podem alterar seu formato e se interconectar, formando canais paracelulares que se abrem na superfície luminal das células endoteliais e na região basolateral da membrana plasmática (revisado por Mehta & Malik, 2006).

Já a via paracelular ocorre através de espaço intercelular, regulada principalmente pela abertura das junções intercelulares *tight* e aderentes, que atuam como uma barreira seletiva de solutos e células. O transporte de íons e pequenas moléculas por essa via se dá pela diferença no gradiente eletroquímico entre o interior dos vasos e o meio extravascular, sendo um transporte passivo (revisado por Gunzel & Yu, 2013). Os mecanismos que regulam esta via serão melhor abordados no tópico a seguir (Figura 1.7).

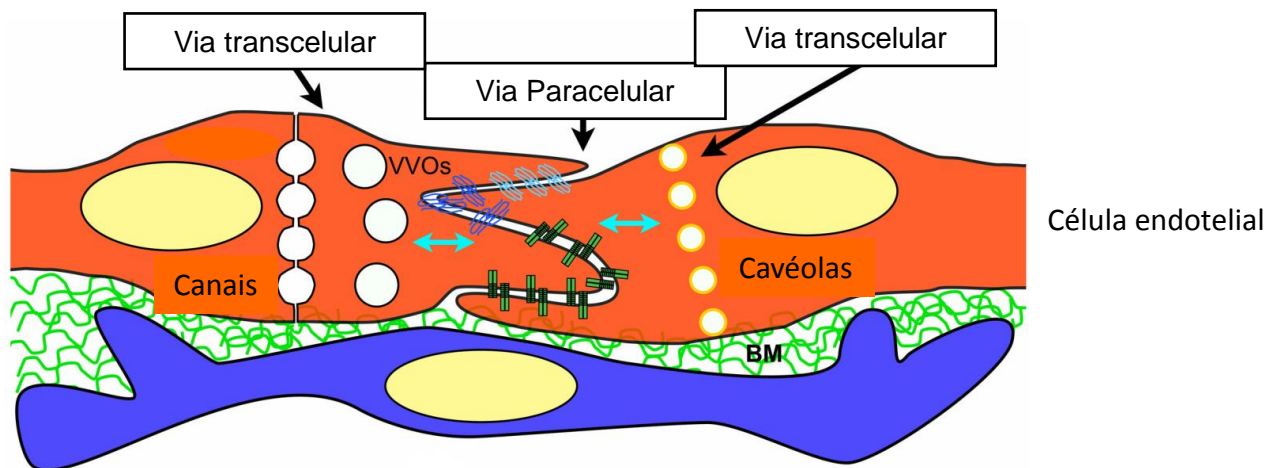


Figura 1.7: Vias que regulam a barreira endotelial. O esquema mostra duas células endoteliais e espaço subendotelial. A permeabilidade vascular é regulada e mantida por três compartimentos: junções paracelulares, vias transcelulares (canais, VVOs e cavéolas) e interações heterotípicas entre células (endotelial e pericitos). Os três mecanismos estão interconectados molecularmente (setas azuis); entretanto os detalhes desta interação ainda não estão esclarecidos. Fonte: Goddard & Iruela-Arispe, 2013.

1.7. Junções intercelulares

As células endoteliais permanecem conectadas umas às outras por um conjunto complexo de proteínas transmembranares, que por sua vez, estão ligadas a proteínas intracelulares ancoradas ao citoesqueleto de actina. Toda essa interação promove estabilidade das junções intercelulares (Bazzoni & Dejana, 2004), regulação dinâmica de abertura e fechamento das mesmas e além disso, acredita-se que é necessária à manutenção da morfologia e polaridade das células endoteliais (Stevens *et al*, 2000; Sheldon *et al*, 1993). Esse conjunto de proteínas envolvidas na função da barreira endotelial e na comunicação célula-célula formam estruturas complexas, conhecidas como Junções Aderentes, Junções *Tight* e Junções Gap (Wallez & Huber, 2008). (Figura 1.8).

As **Junções Aderentes** (JAs) no endotélio estão distribuídas ao longo de toda a vasculatura e são expressas em vasos linfáticos e sanguíneos. São formadas por diversas proteínas, dentre elas, a VE-caderina. A VE-caderina é uma proteína de adesão transmembranar da família das Caderinas, e é específica de células endoteliais. A cauda citoplasmática da VE-caderina apresenta sítio de ligação para a β -catenina e γ -catenina, duas proteínas que se ligam a α -catenina, que promovem a interação deste complexo proteico ao citoesqueleto de actina. A p120-catenina é outra molécula acessória das junções aderentes, que se liga à VE-caderina em uma

região mais próxima da membrana e promove sua associação aos filamentos de actina, sem a necessidade de interação com a α -catenina (revisado por Bazzoni & Dejana, 2004).

Assim como as JAs, as **Junções Tight** (JTs) também são formadas por proteínas transmembranares e intracelulares. Dentre as proteínas com domínio intra- e extracitoplasmático, temos a ocludina, a claudina e as JAM (do inglês *Junctional adhesion molecule*). A família das claudinas compreende mais de 20 membros, sendo a claudina-5 específica de células endoteliais. São os maiores constituintes das JTs e já foi demonstrado que alteração na expressão de claudina-5 no endotélio da barreira hematoencefálica aumenta a permeabilidade desta estrutura. A ocludina é encontrada exclusivamente nas JTs de células epiteliais e endoteliais (revisado por Bazzoni & Dejana, 2004). No endotélio, a expressão desta proteína varia de acordo com a permeabilidade dos leitos vasculares. Por exemplo, o endotélio próximo a tecido nervoso expressa muito mais ocludina do que o endotélio de outros tecidos (Hirase *et al*, 1997). Claudina e ocludina apresentam em sua cauda citoplasmática sítios de ligação para as proteínas ZO (*zonula occludens*). Estas promovem a ancoragem da claudina e ocludina ao citoesqueleto através, por exemplo, da interação de ZO-1, ZO-2 e ZO-3 com os microfilamentos de actina (revisado por Bazzoni & Dejana, 2004). Quanto as proteínas JAM, já foram descritas JAM-1, expressa em células epiteliais e endoteliais, JAM-2 e JAM-3, presentes exclusivamente em células endoteliais. Suas caudas citoplasmáticas apresentam domínio de ligação a ZO-1, que a ancora ao citoesqueleto e, desta forma, regula a integridade da barreira endotelial (revisado por Mehta & Malik, 2006).

Por fim, as **Junções Gap** (JGs) são formadas por agrupamentos de proteínas transmembranares, as conexinas. As conexinas formam canais diretos de comunicação entre as células endoteliais, permitindo a troca direta de moléculas de sinalização e íons. Desta forma, as JGs são consideradas um mecanismo crucial à manutenção da homeostasia celular, além de regulação do crescimento e diferenciação celular, resposta vasoativa das células endoteliais e condução elétrica nos tecidos excitáveis por permitir a passagem de potencial elétrico (revisado por Mehta & Malik, 2006).

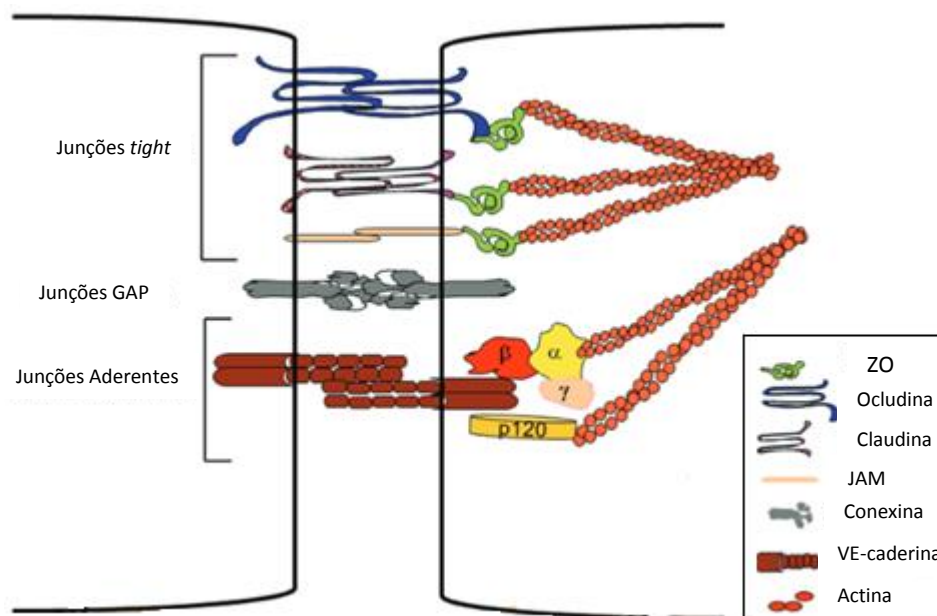


Figura 1.8. Organização estrutural das interações intercelulares entre células endoteliais. As junções intercelulares são compostas pelas junções *tight*, aderentes e junções gap. Interagem através do citoesqueleto de actina permitindo a adesão de células endoteliais com outras do mesmo tipo celular e com a matriz extracelular. Ocludinas, claudinas e moléculas de adesão juncional, JAM, são os principais componentes das junções *tight*, enquanto a VE-caderina é necessária para a formação das junções aderentes. Conexinas formam as junções gap. A estabilidade das junções se dá pela interação do domínio citoplasmático destas proteínas com o citoesqueleto de actina através das cateninas (α , β , γ e p120) e a proteína ZO-1. Junções gap permitem a rápida troca de “informações” entre as células. Fonte: Adaptado de Sukriti, *et al*, 2014.

1.7.1. Mecanismos que regulam as Junções intercelulares

Recapitulando, o endotélio atua no controle da passagem de moléculas e células do espaço intravascular para os tecidos adjacentes e vice-versa. Em casos de dano vascular, ou seja, a monocamada de células endoteliais foi comprometida, há aumento da permeabilidade vascular, rompimento dos vasos, podendo gerar quadros de hemorragia. Essa condição pode ser irreversível, levando às alterações na homeostase vascular e tecidual. Entretanto, mediadores como histamina, trombina, citocinas e quimiocinas produzidos durante respostas inflamatórias, podem atuar no aumento da permeabilidade vascular de maneira reversível, não comprometendo a viabilidade e/ou a funcionalidade das células endoteliais. Nesse caso, a alteração da permeabilidade tem efeitos benéficos, uma vez que promovem aumento do aporte de oxigênio e nutrientes aos tecidos e aumento da migração de leucócitos para sítios inflamatórios no combate a infecções (revisado por Sukriti *et al*, 2014).

Os mecanismos que levam a variações na permeabilidade vascular envolvem tanto proteínas das junções *tight* quanto das junções aderentes. No segundo caso, os melhores descritos envolvem a VE-caderina. A fosforilação da VE-caderina e das cateninas, por exemplo, está associada ao enfraquecimento da barreira endotelial. Já foi visto que o VEGF (revisado por Gavard & Gutkind, 2006) e TNF- α induzem a fosforilação de VE-caderina, β -catenina e p120 catetina (Esser *et al*, 1998; Angelini *et al*, 2006). Além disso, a fosforilação de tirosinas específicas da VE-caderina é também induzida pela adesão de leucócitos às células endoteliais e é essencial para a diapedese (Allingham *et al*, 2007). Outra forma de regulação é a internalização da VE-caderina, processo que se acredita ser dependente de clatrina e que também necessita de fosforilação da VE-caderina, não em tirosinas, mas em um resíduo específico Ser⁶⁶⁵. A exposição da VE-caderina às metaloproteinases também é um mecanismo importante neste contexto, já que induz a quebra do domínio extracelular da proteína e conseqüentemente, sua clivagem. Citocinas e quimiocinas causam aumento de Ca²⁺ intracelular, promovendo a contração do complexo actinmiosina do citoesqueleto, provocando forças de retração que desconectam as junções intercelulares (revisado por Dejana *et al*, 2008) (Figura 1.9).

Alterações nas junções *tight* também são descritas. Uma das vias de ativação envolve a quinase ROCK (proteína quinase associada a Rho, do inglês *Rho-associated protein kinase*) que leva a fosforilação da ocludina nos resíduos Ser⁵⁰⁷ e Tir³⁸² e da claudina em Tir²⁰⁷, descrito como responsável pela diminuição na função da barreira em células endoteliais do cérebro de camundongos. Além disso, ROCK gera a fosforilação de miosina, promovendo a contração do citoesqueleto de actina, induzindo retrações das células em direções opostas e enfraquecimento das junções (revisado por Mehta & Malik, 2006). Em relação as citocinas, IFN- γ pode comprometer a função da barreira endotelial em células epiteliais intestinais humanas pela internalização de ocludina e claudina pela via ROCK, enquanto que TNF- α , ativa células endoteliais pelo NF- κ B, levando a endocitose da ocludina, enfraquecendo as junções (Hu *et al* 2013).

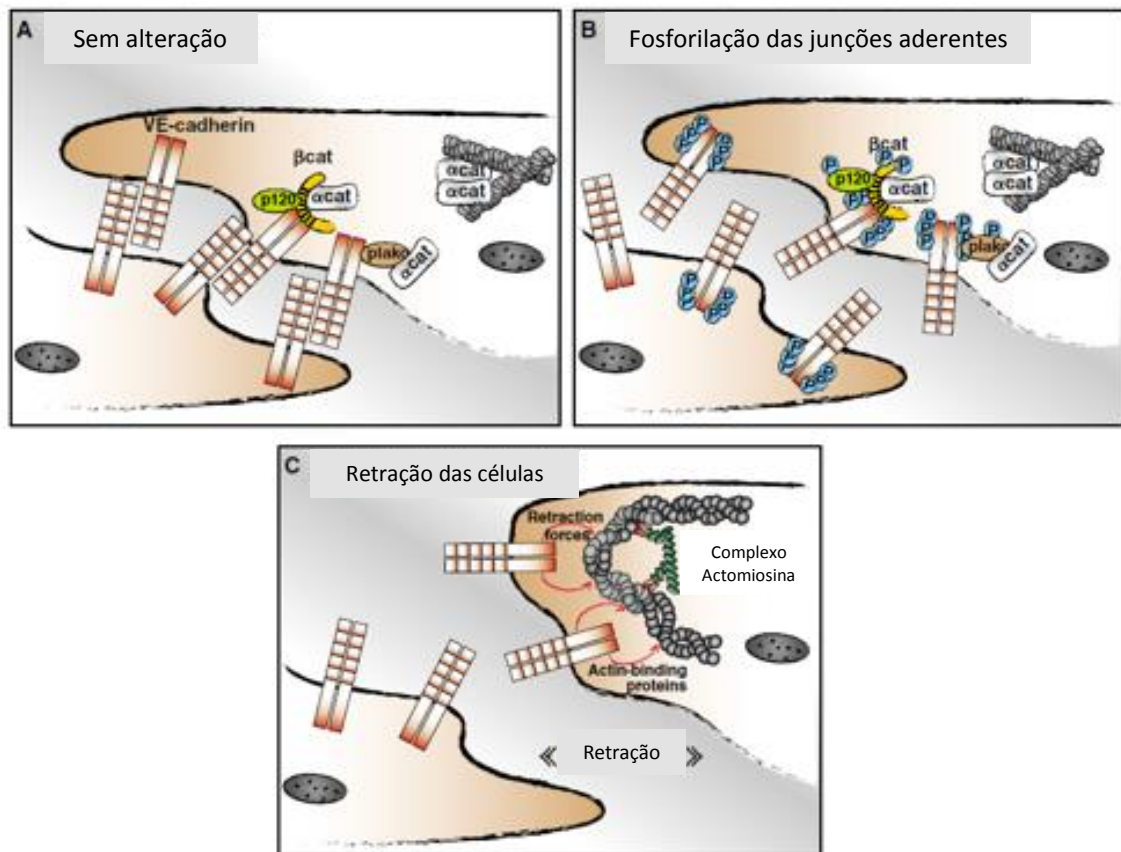


Figura 1.9. Modificações nas junções intercelulares que estariam envolvidas com a permeabilidade endotelial. (A) Em condições normais, os dímeros de VE-caderina se agrupam, formando estruturas “zíper-like”. As cateninas p120 e β-catetina (βcat) e placoglobina (plako) podem se ligar diretamente a VE-caderina. Já a α-catenina (αcat) se liga indiretamente através da associação com a β-catetina ou placoglobina. (B) Fosforilação (P) de resíduos de tirosina da VE-caderina, β-catetina, placoglobina e p120 enfraquecem as junções. A fosforilação de VE-caderina em Ser⁶⁶⁵ leva a sua internalização, promovendo o mesmo efeito. (C) Em condições inflamatórias, com ativação do endotélio, há ativação do complexo actomiosina que se liga a estrutura das junções e induz a retração das células em direções opostas. Fonte: Dejana *et al*, 2008.

1.8. Transmigração de leucócitos

1.8.1. Proteínas de adesão a leucócitos

O recrutamento de células imunes para os sítios inflamatórios caracteriza um mecanismo de defesa do nosso organismo. Este processo é altamente organizado em uma cascata de eventos, que vai desde a captura de leucócitos circulantes pela parede do vaso sanguíneo, seguida de rolamento e adesão desses leucócitos nas células endoteliais ativadas, fortalecimento da interação celular heterotípica e transmigração (Herter & Zarbock, 2013). As células endoteliais participam e regulam ativamente esse processo. Como os leucócitos, as células endoteliais são ativadas por mediadores inflamatórios para aumentar a expressão de moléculas de adesão em sua superfície. Além de mediar a adesão, as moléculas de adesão estão envolvidas na sinalização intracelular (Ley *et al*, 2007).

A transmigração se inicia com rolamento dos leucócitos sobre as células endoteliais, mediado pelas Selectinas (CD62). Células endoteliais expressam as Selectinas-E (CD62E) e -P (CD62P) que interagem com a Selectina-L e PSGL1 (glicoproteína ligante de P-selectina -1, do inglês *P-selectin glycoprotein ligand 1*) presentes na membrana dos leucócitos (Ley *et al*, 2007) (Figura 1.10).

Em seguida, a CD54/ICAM-1 (Molécula de adesão intercelular -1, do inglês *Intercellular adhesion molecule-1*) promove a adesão de leucócitos na superfície luminal das células endoteliais através de interações, principalmente com CD11a/LFA-1 (antígeno associado a função de linfócitos -1, do inglês *Lymphocyte function-associated antigen 1*) da superfície das células do sistema imune (Reilly *et al*, 1995). Uma vez o leucócito aderido, mais moléculas de ICAM-1 são recrutadas na membrana da célula endotelial, próximo ao sítio de interação, fortalecendo essa interação (Shaw *et al*, 2004). A fosforilação da cortactina, uma proteína envolvida no remodelamento do citoesqueleto de actina, induz o recrutamento de mais moléculas de ICAM-1 para o sítio de adesão (Yang *et al*, 2006). Maior expressão de ICAM-1 induz aumento na concentração de cálcio intracelular, contração das fibras de actina-miosina, levando a retração das células endoteliais em direções opostas, enfraquecendo desta forma, as junções intercelulares (Hixenbaugh *et al*, 1997). Além disso, a via ativada pela interação CD54/ICAM1 e CD11a/LFA-1 leva a fosforilação da VE-caderina, pré-requisito para a desorganização das junções aderentes (Turowski *et al*, 2008; Allingham *et al*, 2007).

CD106/VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1, do inglês *Vascular cell adhesion molecule-1*) expressa na membrana da célula endotelial, está envolvida na adesão de leucócitos através de VLA-4 (do inglês *Very Late Antigen-4*). Essa interação também promove agrupamento de VCAM-1 no sítio de adesão, aumento na concentração de cálcio intracelular e por fim, enfraquecimento das junções intercelulares (revisado por Muller, 2011). Além disso, a interação com VCAM-1 ativa uma via de sinalização relacionada a fosforilação de VE-caderina no resíduo de Ser⁶⁶⁵, o que leva à internalização mediada por clatrina desta proteína, desfazendo as junções aderentes (van Wetering *et al*, 2002; Gavard & Gutkind, 2006).

Por fim, a CD31/PECAM-1 (molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais -1, do inglês *Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) que é expressa em todas as células endoteliais, assim como em plaquetas e leucócitos. A interação de células endoteliais e leucócitos através da ligação CD31-CD31 é necessária para a transmigração endotelial de células imunes (Muller *et al*, 1993). Juntamente com CD99, CD31/PECAM-1 atua em etapas mais tardias do processo de transmigração, a partir do momento em que o leucócito inicia a passagem pelo espaço intercelular até o término da diapedese (revisado por Muller, 2011).

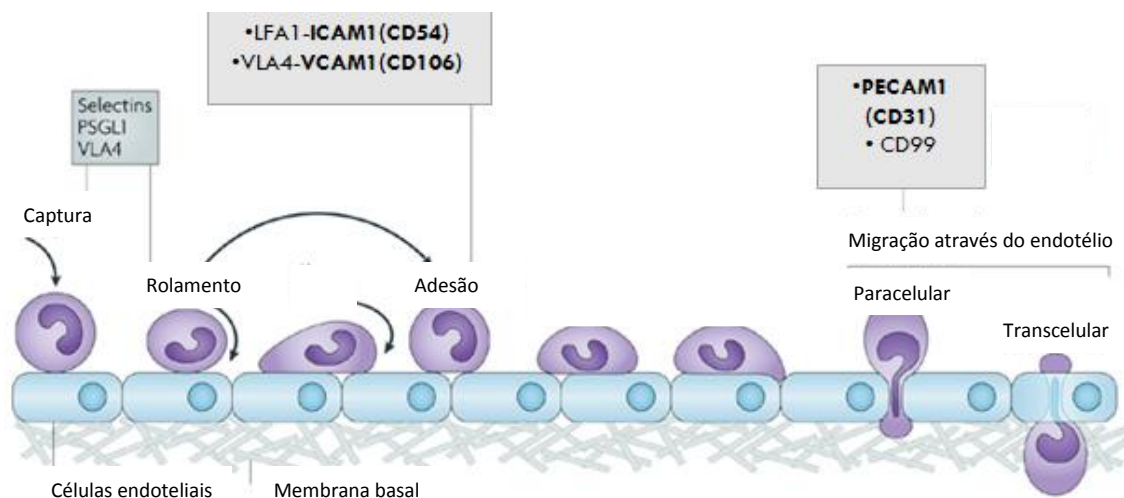


Figura 1.10. Etapas do processo de transmigração leucocitária. Captura e rolamento dos leucócitos pela monocamada de células endoteliais mediados principalmente pelas Selectinas, VLA4 (*Very late antigen 4*) e PSGL1. Em seguida, firme adesão dos leucócitos através das moléculas LFA-1 e VLA-4 expressas nos leucócitos com as CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 expressas nas células endoteliais. Depois, ocorre o fortalecimento da adesão e a invasão do espaço intercelular pela célula imune, seguida da passagem pela barreira endotelial através das vias paracelular ou transcelular mediadas por CD31/PECAM-1 e CD99. Fonte: Ley *et al*, 2007.

1.9. Matriz Extracelular e Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

Na interface vasos sanguíneos e tecidos, podemos encontrar a matriz extracelular (MEC). MEC é composta por diversas proteínas, como colágeno, laminina, elastina e fibronectina, que são sintetizadas principalmente por fibroblastos e osteoblastos, assim como por células imunes e endoteliais. A interação da MEC e células endoteliais se dá através de integrinas e pode estar relacionada a transdução de sinais que impedem a proliferação celular, mas estimulam o fortalecimento do contato célula-célula e célula-MEC (revisado por Rojas *et al*, 2011).

O processo de transmigração de células dos vasos para os tecidos necessita da degradação da MEC, visto que esta estrutura constitui uma barreira física para a passagem das células. A proteólise das proteínas da MEC, além de facilitar fisicamente a passagem dos leucócitos pelo emaranhado de proteínas, também gera fragmentos biologicamente ativos que atuam como fatores quimiotáticos para os leucócitos e de outros processos fisiológicos, como proliferação celular e angiogênese (Lohr *et al*, 1990).

O remodelamento da MEC é mediado por diferentes classes de enzimas, dentre elas, as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) (revisado por Rojas *et al*, 2011). As MMPs pertencem a família de endopeptidases dependentes de Zinco, são compostas de 24 enzimas conhecidas em humanos e podem ser solúveis ou acopladas às membranas celulares (MT-MMP do inglês *Membrane-type MMPs*) (Singh *et al*, 2015). São produzidas por fibroblastos, células tumorais, epiteliais, endoteliais e leucócitos. São indispensáveis ao remodelamento da MEC em condições fisiológicas ou patológicas, como artrite reumatóide, doenças inflamatórias e progressão de tumores (Gialei *et al*, 2011). No quadro 3 segue a classificação das MMP.

Quadro 3. Classificação das Metaloproteinases, MMPs.

Tipo	MMPs	Alvo
Colagenases	MMP-1, -8 e -13	Colágeno
Gelatinases	MMP-9 e -2	Colágeno e gelatina desnaturada
Estromelisinases	MMP-3, -10 e -11	Proteoglicanas
Matrilisinases	MMP-7, -26	Proteoglicanas, fibronectina e laminina
MT-MMP	MMP-14, -15, -16, -17, -23, -24, -25	Gelatina, fibronectina e outros
Outras	MMP-12, -19, -20, -21, -27 e -28	Todos componentes da MEC e tecido conjuntivo

Diferentes grupos de MMPs, seus representantes e os alvos de degradação.

A ação das MMPs é rigidamente controlada pela regulação da transcrição de genes, que se dá em resposta a estímulos de citocinas, como TNF- α e IL-6, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, hormônios e fatores de crescimento. Esses estímulos se ligam a receptores celulares, desencadeiam cascatas de sinalização intracelulares que ativam fatores de transcrição. Esses fatores de transcrição se ligam aos genes que codificam as MMPs, regulando sua transcrição (revisado por Rojas *et al*, 2011).

Outro mecanismo de regulação das MMPs, é que normalmente elas encontram-se no citosol inativas e apenas quando clivadas por proteases, como plasmina ou outras MMPs, tornam-se ativas. Por último, a ação exacerbada das MMPs pode comprometer a integridade dos tecidos, assim sua atividade pode ser regulada pelos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs - do inglês *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) (Brew & Nagase, 2010; Brew *et al*, 2000). Os TIMPs constituem um conjunto de proteínas inibidoras das MMPs solúveis através de complexos TIMP-MMP, que não permitem a ligação da protease ao substrato. São conhecidos quatro membros das famílias TIMP e as MMPs podem ser inibidas por

um número diferente deles. Cada TIMP tem características únicas: TIMP-1, -2 e -4 estão presentes na forma solúvel e TIMP-3 fortemente vinculado a MEC (revisado por Rojas *et al*, 2011).

1.9.1. CD147/EMMPRIN: Indutora da produção de Metaloproteínas de Matriz

A procura por fatores indutores da produção de MMPs em células tumorais permitiu a identificação da molécula CD147/EMMPRIN (do inglês *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*). CD147/EMMPRIN é membro da superfamília das imunoglobulinas e é uma glicoproteína transmembranar de 27 kDa. É composta de domínios extracelular (EC) altamente glicosilados, domínio transmembranar (TM) e citoplasmático (C). Apresenta 4 isoformas que se diferem apenas nos domínios EC. A isoforma mais conhecida é a apresentada na Figura 1.11, composta por dois domínios EC (EC1 e EC2) unidos por ligações dissulfeto. O domínio TM apresenta uma região altamente conservada com um resíduo de ácido glutâmico e acredita-se que pode interagir com diferentes proteínas ancoradas à membrana plasmática. O domínio C, apesar de composto por apenas 40 aminoácidos, está envolvido na iniciação de diversas vias de sinalização. Apesar de ancorada à membrana, CD147/EMMPRIN pode ser clivada pela MMP-14 na região do domínio EC1, liberando uma forma solúvel de 22 kDa. Além disso, a molécula inteira pode ser endocitada e em seguida, secretada pelas células por microvesículas (revisado por Hahn *et al*, 2015).

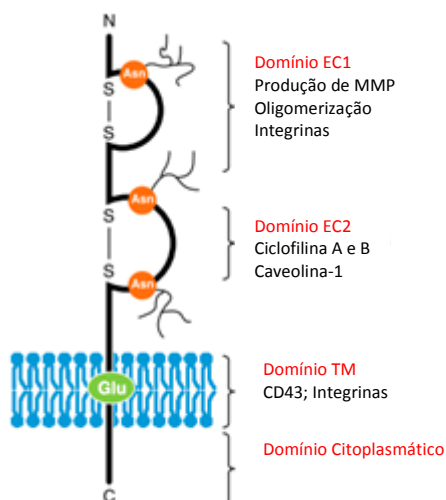


Figura 1.11. Estrutura da CD147/EMMPRIN. Molécula transmembranar com 3 regiões N-glicosiladas ligadas nos resíduos de Asparagina (Asn) na região EC, domínio Transmembranar (TM) contendo resíduo de ácido glutâmico conservado (Glu) e domínio citoplasmático (C). A região EC pode ser dividida em duas EC1 e EC2, unidas por ligações dissulfeto. Cada domínio da molécula interage com diferentes proteínas. Fonte: Adaptado de Hahn *et al*, 2015.

Cada domínio de CD147/EMMPRIN pode interagir com diferentes proteínas e induzir funções particulares. O domínio EC1 é importante na indução da produção das MMP-1, 2, 3, 9, MT1-MMP e MT2-MMP pelos fibroblastos, células endoteliais, tumorais, epiteliais e leucócitos, oligomerização da molécula e ligação às integrinas. Acredita-se que a glicosilação de CD147/EMMPRIN no domínio EC1 é necessária para a indução da produção de MMPs. O domínio EC2 é descrito como ligante de ciclofilinas, envolvidas na adesão e quimiotaxia de leucócitos, e caveolina-1, que atua como um regulador da atividade desta molécula, prevenindo sua glicosilação. O domínio TM se liga a CD43, integrinas $\beta 1$, ambas envolvidas com adesão (revisado por Hahn *et al*, 2015). Pelo fato de CD147/EMMPRIN expressa em células tumorais e na forma solúvel induzirem a produção de MMPs em células vizinhas, foi verificado que ela pode atuar como receptor dela mesma, e desta forma induzir a produção de mais MMPs (revisado por Hahn *et al*, 2015). Um possível mecanismo proposto é encontrado na figura (Figura 1.12).

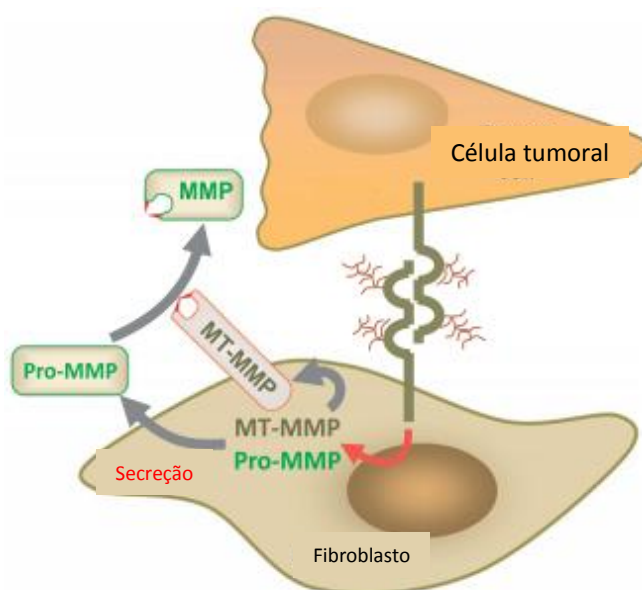


Figura 1.12. Possível mecanismo de indução da produção de MMPs. A interação CD147-CD147 entre fibroblastos e células tumorais leva a produção de MMPs em sua forma inativa (Pro-MMP) e MT-MMP. As MT-MMP são transportadas para a membrana da célula, onde se ancoram. As Pro-MMP são secretadas e, por ação das MT-MMP, são transformadas em sua forma ativa, MMP. Fonte: Joghetaei *et al*, 2013.

2. JUSTIFICATIVA

Um único estudo demonstrou em pacientes infectados pelo DENV a presença de células endoteliais apoptóticas no pulmão e intestinos de casos fatais FHD/SCD, o que segundo os autores, estaria relacionado ao extravasamento plasmático observado nesses indivíduos (Limonta *et al*, 2007). Poucos dados na literatura demonstraram que mediadores solúveis presentes no sobrenadante de cultura de células infectadas (Kelley *et al*, 2012) ou no soro/plasma de pacientes (Puerta-Guardo *et al*, 2013, Jeewandara *et al*, 2015) poderiam induzir alguma alteração na permeabilidade de células endoteliais em ensaios *in vitro*. De fato, é consenso de muitos autores que citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, produzidos tanto por diferentes células do sistema imune como pelas células endoteliais durante a infecção pelo DENV, alterariam a permeabilidade endotelial observada em geral, na fase de defervescência, independentemente do desfecho clínico, e principalmente na forma grave da dengue. O impacto desses mediadores nas células endoteliais levaria à sua ativação e desarranjo das junções intercelulares (Puerta-Guardo *et al*, 2013), tornando o endotélio mais permissivo à adesão e transmigração de leucócitos e a demais trocas de macromoléculas e água do lúmen dos vasos para os tecidos (Muller *et al*, 2011). Dentre os principais receptores expressos pelas células endoteliais ativadas, destacamos as moléculas CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 (Zhang *et al*, 2010). Na dengue, níveis aumentados de CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 na sua forma solúvel já foram demonstrados e ainda, associados ao dano vascular e à gravidade da doença (Khongphatthanayothin *et al*, 2006; Murgue *et al*, 2001). A ação das metaloproteinases, como a MMP-9, cuja produção é induzida pela CD147/EMMPRIN, é um dos mecanismos de clivagem das formas membranares da CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 solúveis (Tong *et al*, 2011; Fiore *et al*, 2002). As MMPs atuam no remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e ainda, na transmigração leucocitária, levando ao aumento da permeabilidade vascular.

Inicialmente, nossa motivação foi quantificar no soro/plasma de pacientes com dengue, nas formas FD e FDSA/Grave, mediadores conhecidamente indutores de alteração endotelial, como o TNF- α , CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8 e VEGF. Além disso, quantificar CX3CL1/Fractalcina, CCL5/RANTES e MMP-9, esses sem ainda comprovação científica como co-atores desse processo. Em seguida, utilizando a célula endotelial primária da microvasculatura dermal humana, HMVEC-d, nós investigamos se o tratamento das monocamadas das HMVEC-d com soro de pacientes era capaz de modular a expressão das moléculas de adesão CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 e da indutora de MMPs, CD147/EMMPRIN. Por fim, no caso de demonstrarmos alguma alteração da permeabilidade endotelial observada pela modificação da expressão das moléculas de adesão e da CD147/EMMPRIN, nós inferimos através de análises estatísticas de correlação, um possível papel das citocinas/quimiocinas circulantes nesta modulação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento de citocinas, quimiocinas e outros mediadores solúveis presentes no soro e plasma de pacientes infectados pelo DENV, na ativação de células endoteliais primárias da microvasculatura dermal humana.

3.2. Objetivos Específicos

I. Correlacionar parâmetros clínicos e laboratoriais e identificar quais parâmetros melhor definiriam o desfecho clínico da dengue;

II. Quantificar níveis séricos de TNF- α , CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CX3CL1/Fractalcina, CCL5/RANTES, VEGF e MMP-9, associando-os aos parâmetros clínicos e laboratoriais, assim como com a clínica dos pacientes;

III. Avaliar a expressão das moléculas de adesão CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 e da molécula CD147/EMMPRIN nas células endoteliais da microvasculatura dermal humana HMVEC-d.

IV. Avaliar as HMVEC-d quando cultivadas na presença de soro de pacientes quanto à expressão de CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1 e CD147/EMMPRIN.

V. Verificar por análises de correlação estatística um efeito potencial dos mediadores solúveis quantificados em pacientes na expressão de CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1 e CD147/EMMPRIN.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. População de Estudo e Diagnóstico Laboratorial.

Amostras de sangue de pacientes com suspeita clínica de dengue foram obtidas em 2010 e 2013 pela equipe do LIV durante trabalho de campo realizado no Hospital-Dia Professora Esterina Corsini na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), coordenado pelo Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, e no Hospital Plantadores de Cana, no Centro de Referência em Dengue localizado em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, com a coordenação do Dr. Luís José de Souza. As amostras de controles sadios foram provenientes de membros do laboratório e de doadores de sangue no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Tabela 4.1: Detalhamento das epidemias utilizadas neste estudo.

Ano	Sorotipo prevalente da epidemia	Local	Nº de pacientes utilizados
2010	DENV-2	RJ e MS	22
2013	DENV-4	RJ e MS	108

Os pacientes foram entrevistados e a participação deles no estudo deu-se após conhecimento dos principais objetivos do projeto e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa 37230.000.009-08 IPEC/FIOCRUZ, 0029.0314.011-09 SMS/RJ e pelo Sistema Plataforma Brasil número CAAE 13318113.7.3001.0021.

Dados laboratoriais bioquímicos, hematológicos e demais informações acerca de sintomas clínicos foram obtidos dos prontuários.

A confirmação do diagnóstico clínico foi feita pela análise de anticorpos IgM específicos anti-DENV por ELISA (PANBIO, Columbia, USA), detecção da proteína NS1 por ELISA (Platelia™ Dengue NS1 Ag Kit – BioRad Laboratories) e/ou detecção de RNA viral por RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). O diagnóstico de Dengue foi confirmado pela positividade em pelo menos um dos testes. Também foi realizada a análise de anticorpos IgG específicos (kit

Dengue Virus IgG DxSelect – EL1500G, Focus Diagnostics, Cypress, CA, USA) afim de determinar se a infecção era primária ou secundária. Estes procedimentos foram feitos em colaboração com o Laboratório de Flavivírus – IOC, Fiocruz, chefiado pela Dra. Rita Nogueira.

A classificação quanto à gravidade clínica foi realizada de acordo com o Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial da Saúde (TDR/OMS) em 2009. Os pacientes foram classificados em três grupos: (1) Febre do Dengue sem sinais de alarme (FD), caracterizado por náusea, vômitos, erupções cutâneas, mialgia, artralgia, cefaléia, leucopenia, prova do laço positivo sem sinais de hemorragia; (2) Febre do Dengue com sinais de alarme (FDSA), incluindo: dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido, letargia, agitação, hepatomegalia (aumento maior que 2 cm), elevação das transaminases hepáticas AST/TGO e ALT/TGP e diminuição drástica 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), dentre outros (Figura 1.3).

4.2. Obtenção de Plasma e Soro dos Pacientes.

Aproximadamente 10 mL de sangue dos pacientes foram coletados entre o 1º e o 15º dias após os primeiros sintomas (dias de doença) em tubos contendo anticoagulante ACD (citrato de sódio 22 d/L, ácido cítrico 8g/L e dextrose 24,5 g/L) (BD Vacutainer®, catálogo #364606), para obtenção de células mononucleares e plasma. Além deste, 5 mL de sangue foi coletado em tubo seco para obtenção de soro. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos e alíquotas de até 300 µL foram armazenadas a -70°C até sua utilização.

4.3. Quantificação dos Níveis Séricos e Plasmáticos de TNF- α e CXCL8/IL-8 pelas Metodologias de Multiplex em Microarranjo Líquido (LUMINEX).

A quantificação de quimiocinas e citocinas foi realizada utilizando-se soro de pacientes com diagnóstico de dengue confirmado. As dosagens de TNF- α e CXCL8/IL-8 foram feitas através de ensaio Multiplex em Microarranjo Líquido, pela tecnologia Luminex® de acordo com as especificações do fabricante (R&D Systems). Esta técnica utiliza microesferas com propriedades espectrais definidas conjugadas a anticorpos de captura específicos para os analitos-alvo. Microesferas específicas para diferentes alvos são incubadas simultaneamente com uma única amostra de soro, permitindo a detecção de várias proteínas no mesmo material.

Primeiramente, a membrana da placa de 96 poços foi umidificada rapidamente com 100 μ L/poço de Wash Buffer. Em seguida, o líquido foi removido utilizando-se sistema à vácuo. Foram adicionados 25 μ L/poço da mistura de micropartículas diluídas (50 μ L de CXCL8/IL-8 + 50 μ L de TNF- α) em 3mL de Diluente de Micropartícula em todos os 96 poços da placa. Sobre as micropartículas, foram adicionados 100 μ L/poço das soluções da curva padrão ou de soros testes de pacientes e controles, previamente diluídos em Diluente Calibrador RD6-40 na proporção 1:2. Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente com agitação, a placa foi lavada 3 vezes em Tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 50 μ L da solução Coquetel de anticorpo-biotina (50 μ L de CXCL8/IL-8 + 50 μ L de TNF- α (anticorpos concentrados 100x) em 6mL de Diluente de Anticorpo-biotina 2) seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente com agitação. A placa foi lavada 3 vezes em Tampão de lavagem e adicionados 50 μ L do reagente Estreptavidina-PE por 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. Após 3 lavagens, as micropartículas foram ressuspensas em 100 μ L/poço do Tampão de lavagem e a leitura da placa foi realizada no aparelho Luminex® Instrumentation System (Luminex, Austin, TX, USA). Este equipamento determina a propriedade espectral das microesferas e a quantidade de fluorescência associada ao fluorocromo PE, conseqüentemente, a concentração das citocinas/quimiocinas presentes nas amostras. A média de intensidade de fluorescência é medida pelo aparelho e as concentrações calculadas em pg/mL. Foi utilizada a Plataforma tecnológica do Programa de Desenvolvimento em Insumos para Saúde (PDTIS) (RPT03C- Luminex) da Fiocruz.

4.4. Quantificação dos Níveis Séricos e Plasmáticos de Mediadores Solúveis por ELISA.

As dosagens de CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CX3CL1/Fractalcina, VEGF e MMP-9 foram realizadas pelo método de ELISA, seguindo as instruções do fabricante (Tabela 4.2). Foram utilizadas placas de superfície inerte com poços onde foram adsorvidos Anticorpos de captura ou Anticorpo primário específico para a sensibilização da placa. Em seguida, foram realizadas lavagens com tampão de lavagem e bloqueio para que sítios inespecíficos fossem ocupados, evitando que sejam gerados resultados falso positivos ou negativos. Novamente foram feitas lavagens. A superfície da placa foi então tratada com solução da proteína em concentrações conhecidas gerando a curva padrão. Nesta etapa, nos poços restantes foram adicionadas as “amostras-testes”. A superfície da placa foi lavada novamente para retirar os anticorpos primários que não foram incorporados. Em seguida, foi adicionado Anticorpo de detecção ou Anticorpo secundário acoplados a uma enzima. A superfície da placa foi lavada novamente para a retirada do anticorpo secundário não ligado ao anticorpo primário. Adicionou-se um substrato de ligação para a enzima produzir uma substância corada e, assim, permitir a verificação e quantificação da presença da proteína de interesse.

Os dados foram quantificados pela análise das oito diluições da curva padrão pela medida da densidade óptica *versus* concentrações em pg/mL, utilizando análise de 4 parâmetros para CCL2/MCP e CCL5/RANTES e 5 parâmetros para CX3CL1/Fractalcina (GraphPad Prism 5). Os valores de cada curva padrão, diluição do soro dos pacientes e maiores detalhes encontram-se na tabela 4.2 e a composição das soluções preparadas na tabela 4.3.

Tabela 4.2. Especificações dos kits de ELISA e diluição das amostras.

Quimiocina	Fabricante Catálogo	Curva Padrão pg/mL	Anticorpo captura µg/mL	Anticorpo detecção µg/mL	Enzima/ Substrato Revelador	Comprimento de onda	Diluição da amostra sérica
CCL2/ MCP-1	Peprtech 900-K31	1000- 15,62	0,25	0,25	Avidina- HRP/TMB	405/605 nm	1:10
CCL5/ RANTES	Peprtech 900-M33	2000- 31,25	0,5	0,5	Avidina- HRP/TMB	405/605 nm	1:100
CXCL3/ Fractalcina	R&D Systems DCX310	10000- 156,25	n.i.	<i>Human Fractalkine- HRP conjugate n.i.</i>	HRP / TMB	450/540 nm	1:2
VEGF	Peprtech 900-M10	1000- 15,62	0,5	0,25	Estreptavidina- HRP/TMB	620 nm	1:2
MMP-9	Invitrogen KHC3061	1500- 23,5	n.i.	<i>Human MMP-9 biotin conjugate n.i.</i>	Estreptavidina- HRP/ TMB	450 nm	1:80

A tabela mostra os mediadores avaliados e os fabricantes, catálogo e outras características de cada kit. n.i. significa não informado. HRP significa Horseradish Peroxidase. TMB significa Tetrametilbenzidina.

Tabela 4.3. Soluções para os kits de CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e VEGF:

Solução	Composição
Solução de lavagem	0,05% de Tween-20 em PBS pH 7,4
Solução de bloqueio	1% de BSA em PBS pH 7,4
Reagente Diluente	0,05% de Tween-20, 0,1% de BSA em PBS pH 7,4

4.5. Manutenção das Culturas de Células Primárias da Microvasculatura Dermal HMVEC-d (*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*).

Células endoteliais HMVEC-d "*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*" foram adquiridas da Lonza (cat: CC-2543 Rochester, NY, USA). Essas células foram isoladas de pequenos vasos da pele de indivíduos adultos, comercializadas em ampolas contendo 5×10^5 células por mL, criopreservadas na 3^o passagem. As células foram descongeladas seguindo protocolo do fabricante e cultivadas em garrafas de 25cm² com filtro (Corning Life Sciences), em meio EGM-2MV (Meio de crescimento de células endoteliais -1, do inglês *Endothelial Cell Growth Medium-2*) **suplementado** com 10% de SFB (soro fetal bovino) (Lonza, Rochester, NY, USA) e 1% de Glutamina (Gibco). O meio utilizado nas culturas é o EBM-2 (*Endothelial Basal Medium*) suplementado com rhFGF-B (*Human Fibroblast Growth Factor-B*), rhEGF (*Human Epidermal Growth Factor*), R³-IGF-1 (*Recomb. Lung R Insulin-Like Growth Factor-1*), rhVEGF (*Human Vascular Endothelial Growth Factor*), hidrocortisona, ácido ascórbico, anfotericina B, gentamicina, penicilina e estreptomicina. Meio e suplementos foram adquiridos da Lonza.

Após descongelamento, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera com 90% de umidade e 5% CO₂, respeitando a densidade de $1,25 \times 10^5$ HMVEC-d para área de 25 cm². O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e o volume de EGM-2MV utilizado, respeitou as proporções sugeridas pelo fabricante, de 1mL de meio para 5 cm² de área de crescimento quando a confluência das células estiver abaixo de 25%, 1,5mL/5cm² para 25 a 45% de confluência e 2mL/5cm² para uma confluência maior que 45%. Após atingir uma confluência de 80%, realizávamos as passagens das HMVEC-d para ampliar nosso estoque e realizar os ensaios no máximo até a 7^o passagem. Parte das HMVEC-d também eram congeladas em nitrogênio líquido para ampliar nosso estoque.

Para realização dos experimentos, as HMVEC-d aderidas as garrafas eram submetidas a uma rápida lavagem com 4mL de DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Gibco) à temperatura ambiente, para neutralizar a ação do cálcio presente no meio EGM-2MV sobre a solução de Tripsina 0,25% e EDTA 0,2g/L. Em seguida, foram adicionados 2mL por garrafa da solução Tripsina/EDTA e o processo de dissociação da monocamada foi acompanhado por 2-6 minutos. Com as células soltas, foi realizada a neutralização da ação da solução Tripsina/EDTA utilizando 4mL de meio EGM-2MV suplementado com 10% de SFB e 1 % de glutamina a 4°C.

A suspensão com células foi transferida para um tubo de 50 mL, seguido de centrifugação a 250g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi desfeito e diluído em 1mL de meio fresco. Então, as células foram contadas em câmaras de Neubauer, utilizando-se o corante de viabilidade azul de Trypan na proporção 1:10. As células HMVEC-d foram utilizadas nos experimentos na 6° ou 7° passagem.

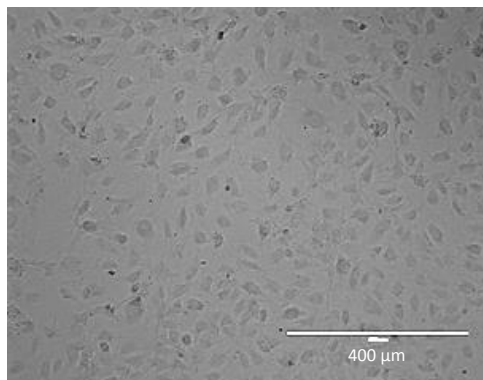


Figura 4.2. Imagem da cultura de HMVEC-d. A imagem mostra a cultura de HMVEC-d com quase 80% de confluência na 3° passagem. Imagem obtida no microscópio EVOS no Laboratório de Imunologia Viral.

4.6. Cultivo das HMVEC-d com Soro de Pacientes infectados.

Primeiramente, 1×10^5 células/poço foram plaqueadas em placas de 24 poços em duplicata em meio EGM-2MV suplementado (10% SFB, 1% Glutamina). Após 48 horas com formação da monocamada, o meio de cultura foi removido e as células foram cultivadas por 1 ou 24 horas com 400 µL de soro de pacientes diluído a 20% em meio EGM-2MV suplementado. Os controles eram as HMVEC-d cultivadas com 400 µL de meio EGM-2MV suplementado.

Após o período de cultura, o soro de paciente ou o meio foi removido dos poços e lavados com 500 µL de DPS. Em seguida, 300 µL de solução de Tripsina/EDTA foi adicionado por poço para realizar novo processo de dissociação da monocamada como descrito no item 4.5. As suspensões celulares foram transferidas para tubos de 15 mL seguido de centrifugação a 250g por 7 minutos a 25°C para marcação extracelular por citometria de fluxo.

4.7. Marcação Extracelular por Citometria de fluxo.

Após centrifugação, o pellet de células foi ressuspensão em solução de bloqueio (1% BSA, 0,1% NaN₃ e 5% de plasma humano inativado em PBS pH 7,2) seguido de incubação por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, 100 µL/poço da suspensão celular em solução de bloqueio foram distribuídos em placa de 96 poços, seguido de centrifugação a 250g por 7 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Sobre o pellet foram adicionados 20 µL da solução contendo a combinação de dois anticorpos monoclonais diluídos em solução de lavagem (BSA 1%, NaN₃ 0,1% em PBS pH 7,4) por 30 minutos a 4°C. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 100 µL de solução de lavagem, seguidas de centrifugação a 250g por 7 minutos a 4°C. Por fim, as células foram fixadas em 200 µL de solução de paraformaldeído a 2% por 20 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas com 100 µL de solução de lavagem e centrifugadas a 250g por 7 minutos a 4°C, e o precipitado de células foi ressuspensão em 500 µL de PBS. As amostras foram armazenadas na geladeira a 4°C em tubos até aquisição nos citômetros BD Accuri™ (BD Bioscience) ou FACS CyAn (Dako) da plataforma de citometria do IOC/FIOCRUZ. As análises foram realizadas utilizando o software FlowJo versão 7.6.

Tabela 4.4. Anticorpos Monoclonais utilizados.

Especificidade	Clone	Isotipo	Fabricante	Número de catálogo	Diluição
CD31-FITC	MBC 78.2	IgG1	Southern Biotech	9381-02	1:25
CD54-FITC	BBIG-I1	IgG1	R&D Systems	BBA20	1:50
CD106-PE	1.G11B1	IgG1	Southern Biotech	9510-09	1:25
CD147-FITC	HIM6	IgG1 _k	Biolegend	306204	1:50

4.8. Análise Estatística

Diferenças entre os grupos de pacientes e controles em relação aos dados demográficos, laboratoriais e clínicos, níveis circulantes de mediadores solúveis e razão de células expressando as moléculas de interesse foram avaliadas pelo teste t não-paramétrico Mann-Whitney. Análises de correlação pelo Spearman. Comparação dos níveis séricos de mediadores solúveis entre os grupos controles e pacientes foi utilizado o teste t não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido de pós teste Dunn. Na comparação da frequência de células expressando as moléculas de interesse foi utilizado o T teste para análise estatística. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Utilizamos o software de análise GraphPad Prism versão 5 (GraphPad, US).

5. RESULTADOS

5.1. Perfis Demográfico, Clínico e Laboratorial dos Pacientes

Nos anos de 2010 e 2013 foram coletadas, no total, 373 amostras de sangue de pacientes suspeitos de dengue pela equipe do Laboratório de Imunologia Viral (LIV). Destes, 130 casos confirmados foram utilizados neste estudo. A classificação dos pacientes foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo Programa de Treinamento e Investigação de Enfermidades Transmissíveis da Organização Mundial da Saúde (TDR/OMS, 2009). O primeiro grupo foi constituído por 82 pacientes com características da Febre do Dengue sem Sinais de Alarme (FD), por apresentarem cefaleia, febre, dor na região retroorbital, mialgia, artralgia, anorexia, náuseas e leucopenia. O segundo grupo foi formado por 43 pacientes FD com Sinais de Alarme (FDSA) e 5 pacientes Graves, constituindo o grupo FDSA/Grave. Os indivíduos deste grupo apresentavam sinais/sintomas do grupo FD, mais dores abdominais e/ou vômitos persistentes, sangramento de mucosa e plaquetopenia.

Dentre os pacientes FD, 44% são do sexo feminino e 56% masculino e no grupo FDSA/Grave, 62,5% feminino e 37,5% masculino. Com relação aos dias de doença contados a partir dos primeiros sinais/sintomas, observamos que o grupo FD tem menor curso da dengue comparado ao grupo FDSA/Grave ($p=0,0007$).

Em relação a ocorrência de sinais/sintomas característicos de extravasamento plasmático e manifestações hemorrágicas, apenas o grupo FDSA/Grave apresentou alguns desses sintomas. Dois pacientes graves apresentaram derrame pleural. Onze pacientes FDSA e 3 Graves exibiram gengivorragia, hematúria, petéquias e/ou melena.

Pelo fato de trombocitopenia ser uma alteração hematológica frequente na Dengue, observamos em ambos os grupos FD e FDSA/Grave que a contagem de plaquetas foi inferior ao grupo controle ($p=0,0008$ e $p=0,0008$, respectivamente). Entre os pacientes, a contagem de plaquetas no grupo FD foi maior comparado aos FDSA/Grave ($p=0,0329$), confirmando que a plaquetopenia é um parâmetro diretamente relacionado a gravidade na Dengue.

Não foram observadas diferenças no percentual de hematócrito entre os pacientes-DENV e controles, o que pode ser explicado pelo fato dos pacientes

FDSA/Graves terem sido rapidamente submetidos à hidratação venosa, reduzindo a hemoconcentração.

Ao avaliar os níveis das transaminases AST/TGO (aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico-oxalacética) e ALT/TGP (alanina aminotransferase/transaminase glutâmico-pirúvica), observamos que os níveis de AST/TGO estavam aumentados no grupo de pacientes FDSA/Grave quando comparada ao grupo FD ($p=0,0031$). Em relação aos níveis de ALT/TGP, não observamos diferenças entre os grupos.

Além de alterações na contagem de plaquetas e níveis de transaminases, leucopenia e em alguns casos, leucocitose precoce são comuns na Dengue. O número de leucócitos totais foi menor nos grupos FD ($p=0,0306$) e FDSA/Grave ($p=0,0094$) quando comparados aos controles, mas não observamos diferença estatística entre os grupos de pacientes. Com relação a contagem de linfócitos, os FDSA/Grave apresentaram contagem menor quando comparado aos FD ($p=0,0302$) e controles ($p=0,0124$). Já para os monócitos, observamos maior número nos FD comparado aos FDSA/Grave ($p=0,0084$). Não observamos diferença estatística na contagem de monócitos entre os dois grupos de pacientes e os controles.

Dentre os testes utilizados para confirmação do diagnóstico clínico-laboratorial, 62,3% dos pacientes confirmaram a infecção pela sorologia anti-DENV IgM positiva. Sessenta e seis % dos pacientes FD foram anti-DENV IgG positivos, indicando infecção secundária, e a maioria dos FDSA/Graves com 92,5% confirmou infecção secundária. A presença de NS1 circulante foi confirmada em 63,8% dos pacientes. O sorotipo viral foi identificado em 33,8% por RT-PCR no grupo FD, 1 paciente infectado pelo DENV-1, 5 pelo DENV-2, e a maior predominância foi de DENV-4 com 27 pacientes. Já para o grupo FDSA/Grave, foi identificada a infecção pelo DENV-2 em 5 pacientes e por DENV-4, 7. Os pacientes infectados com os sorotipos DENV-1 e -4 pertenciam à epidemia de 2013, enquanto que os infectados por DENV-2, à epidemia de 2010.

Os resultados descritos são apresentados na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes.

	Controles n=19	FD n=82	FDSA/Grave n=48
Sexo (Fem/Masc)	8/2	36/46	30/18
Idade (anos) ^a	29,6 ± 6,6	38,6 ± 17,0	39,8 ± 18,4
Dias de doença ^{a, b}	--	4,6 ± 2,7***	6,5 ± 3,3 ***
Extravasamento Plasmático ^{c, d}	--	0/82; 0	5/48; 10,4%
Sangramentos ^{d, e}	--	0/82; 0	14/48; 29,1%
Plaquetas x 10³/mm³ ^{a, f}	287 ± 42,7 (244 – 323,5) ^{ccc, ###}	157,8 ± 61,4 (122 – 205) ^{*, ccc}	118,0 ± 75,1 (48,5 – 184,5) ^{*, ###}
Hematócrito % ^{a, f}	40,7 ± 2,6 (38,3 – 43,5)	42,2 ± 4,4 (39,9 – 44,9)	42,5 ± 3,9 (39,9 – 46)
AST/TGO U/L ^{a, f}	--	47,4 ± 39,4 (26 – 50) ^{**}	144,5 ± 259,4 (36 – 136) ^{**}
ALT/TGP U/L ^{a, f}	--	54,3 ± 33,4 (34 – 58)	142,5 ± 277,2 (33 – 129,3)
Leucócitos x 10³/mm³ ^{a, f}	5772 ± 388,5 (2960 – 10900) ^{c, ##}	4371 ± 2040 (2810 – 5395) ^c	3815 ± 1899 (2530 – 5000) ^{##}
Linfócitos x 10³/mm³ ^{a, f}	1799 ± 270,4 (1540 – 2073) [#]	1445 ± 794,2 (921 – 1727) [*]	1186 ± 889,2 (620,8 – 1551) ^{*, #}
Monócitos x 10³/mm³ ^{a, f}	440,5 ± 152,7 (319 – 600)	482,9 ± 233,3 (310,8 – 611,5) ^{**}	392 ± 261 (235,5 – 478,5) ^{**}
Anti-Dengue IgM ^d	--	31/82; 37,8%	39/48; 81,2%
Anti-Dengue IgG ^d	--	43/65; 66,1%	25/27; 92,5%
NS1 Plasmático ^d	--	48/82; 58,5%	25/48; 52%
DENV-1:DENV-2:DENV-4	--	1:5:27	0:7:5

^a Valores das médias ± desvio padrão; ^b Dias de doença, contados a partir do aparecimento dos primeiros sintomas; ^c Derrame pleural, acúmulo de líquidos; ^d n positivos / n total; % de positivos; ^e Gengivorragia, petéquias, hematúria e melena; ^f Valores dentro dos parênteses representam o intervalo (25%-75%); O teste estatístico utilizado foi o Mann-Whitney: três símbolos representam p<0,001, dois símbolos p<0,01 e um símbolo p<0,05; * representa diferença estatística entre FD vs FDSA/Grave; ^c representa diferença estatística entre FD vs Controles Sadios; # representa diferença estatística entre FDSA/Grave vs Controles Sadios.

Desta forma, em nossa coorte de pacientes os pacientes FDSA/Graves apresentaram um curso clínico maior comparado aos pacientes FD. Dentre os parâmetros estudados, plaquetopenia acentuada, níveis séricos aumentados de AST, linfopenia e monocitopenia diferenciaram estatisticamente os grupos de pacientes-DENV de acordo com a gravidade clínica, portanto, será dada ênfase a associação desses parâmetros com nossas análises posteriores. Em ordem crescente de positividade quanto ao diagnóstico laboratorial, temos anticorpos anti-IgM seguido de NS1 e identificação do sorotipo viral.

5.2. Correlação entre Parâmetros Laboratoriais dos Pacientes

Para melhor avaliar os parâmetros que estariam relacionados ao desfecho clínico e a relação entre eles, realizamos análise de correlação pelo teste Spearman dos dados laboratoriais disponíveis. Como pode ser visto na tabela 5.2, a contagem de plaquetas foi correlacionada negativamente com as transaminases AST e ALT, e diretamente com as contagens de leucócitos, linfócitos e monócitos. Esses dados são esperados, uma vez que plaquetopenia acentuada e níveis altos de transaminases são considerados parâmetros associados à gravidade. Por outro lado, contagem de plaquetas acima de 150 mil/mm³ indicaria um desfecho clínico brando, talvez um status imunológico do paciente eficiente, indicado pelas altas contagens das células imunes do sangue.

Como esperado, as transaminases foram diretamente correlacionadas entre si. Também, as contagens de leucócitos, linfócitos e monócitos foram correlacionadas positivamente entre si. Demais correlações, como dias de doença e hematócrito foram avaliadas, mas os resultados não apontaram significância estatística.

Tabela 5.2. Correlação dos dados laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV.

	Plaquetas	AST/TGO	ALT/TGP	Leucócitos	Linfócitos	Monócitos
Plaquetas	--	-0,459 p<0,001 ⁿ⁼⁶⁸	-0,306 p<0,01 ⁿ⁼⁶⁸	+0,359 p<0,001 ⁿ⁼⁹⁰	+0,259 p<0,02 ⁿ⁼⁸⁶	+0,259 p<0,02 ⁿ⁼⁸⁵
AST/TGO	-0,459 p<0,001 ⁿ⁼⁶⁸	--	+0,793 p<0,001 ⁿ⁼⁶⁹	ns ⁿ⁼⁶⁸	ns ⁿ⁼⁶⁵	ns ⁿ⁼⁶⁵
ALT/TGP	-0,306 p<0,01 ⁿ⁼⁶⁸	+0,793 p<0,001 ⁿ⁼⁶⁹	--	ns ⁿ⁼⁶⁸	ns ⁿ⁼⁶⁸	ns ⁿ⁼⁶⁵
Leucócitos	+0,359 p<0,001 ⁿ⁼⁹⁰	ns ⁿ⁼⁶⁸	ns ⁿ⁼⁶⁸	--	+0,579 p<0,001 ⁿ⁼¹¹⁹	+0,689 p<0,001 ⁿ⁼¹¹⁶
Linfócitos	+0,259 p<0,02 ⁿ⁼⁸⁶	ns ⁿ⁼⁶⁵	ns ⁿ⁼⁶⁸	+0,579 p<0,001 ⁿ⁼¹¹⁹	--	+0,454 p<0,001 ⁿ⁼¹¹⁴
Monócitos	+0,259 p<0,02 ⁿ⁼⁸⁵	ns ⁿ⁼³⁶	ns ⁿ⁼³⁷	+0,689 p<0,001 ⁿ⁼¹¹⁶	+0,454 p<0,001 ⁿ⁼¹¹⁴	--

Correlação de Spearman utilizando o software GraphPad Prism versão 5. Valores de p (two-tailed) foram considerados significativos quando < 0,05. O ns significa correlação não significativa, n representa o número de pares analisados. Plaquetas são expressas em células/mm³; hematócrito em %; AST/TGO e ALT/TGP em U/L; leucócitos, linfócitos e monócitos por células/mm³.

5.3. Avaliação dos Níveis Séricos e Plasmáticos de Mediadores Inflamatórios em Pacientes e Controles.

Como dito anteriormente, acredita-se que a alteração da permeabilidade endotelial na Dengue está relacionada aos níveis de algumas citocinas, quimiocinas e outros mediadores circulantes nos pacientes. Nós decidimos contextualizar rapidamente cada mediador estudado e em seguida descrever o dado encontrado, justificando o porquê de nosso interesse.

Iniciamos pela dosagem de TNF- α . Autores demonstraram que mediadores vasoativos, como o TNF- α , estavam presentes em altos níveis no sobrenadante de células THP-1 (linhagem humana de células monocíticas) infectadas pelo DENV. A adição do sobrenadante na monocamada de células endoteliais HMVECs promoveu alteração da permeabilidade da monocamada através da diminuição da medida da resistência elétrica transendotelial (TEER). Também observaram que a adição de

TNF- α à monocamada diminuiu o TEER, o que foi confirmado após bloqueio desta citocina e recuperação da integridade da monocamada. (Kelley *et al*, 2012). Nossos resultados mostram que, independente do quadro clínico, tanto pacientes FD (11,500 [7,082-50,230] representando as medianas e os intervalos de confiança [25-75%]) como FDSA/Grave (9,796 [5,975-35,450]) apresentaram níveis de TNF- α elevados comparado aos controles (3,380 [2,727-5,756]) (Figura 5.1 A).

Em seguida, realizamos as dosagens das quimiocinas CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8. Lee e colaboradores demonstraram que pacientes com quadro FHD apresentavam níveis circulantes de CCL2/MCP-1 mais elevados que pacientes FD, e os controles sadios níveis mais baixos que os dois grupos de pacientes. Além disso, verificaram que a infecção de monócitos humanos por DENV-2 induzia a produção de CCL2/MCP-1. A exposição de monocamadas de células endoteliais HUVECs ao sobrenadante destes monócitos infectados ou a CCL2/MCP-1 recombinante, aumentou a permeabilidade das monocamadas e induziu uma diminuição na expressão da proteína ZO-1. A neutralização de CCL2/MCP-1 com anticorpos bloqueadores reverteu parcialmente essas alterações, sugerindo a participação desta quimiocina na alteração da permeabilidade endotelial (Lee *et al* 2006). No nosso estudo, verificamos que os pacientes FD (648,1 [966,0-2390,0]) e FDSA/Grave (543,3 [329,6-979,6]) apresentaram níveis mais elevados desta quimiocina quando comparado aos controles (136,7 [42,43-339,8]) (Figura 5.1 B).

Com relação a CXCL8/IL-8, Talavera e colaboradores (2004) infectaram monocamadas de uma linhagem de células endoteliais HMEC-1 (do inglês *human mammary epithelial cells*) com o DENV-2. Após infecção, foi observado que as HMEC-1 apresentaram reorganização do citoesqueleto de actina e da proteína ocludina e essas modificações também foram verificadas em células endoteliais não infectadas da mesma cultura, sugerindo que mediadores secretados pelas HMEC-1, em resposta à infecção, no meio poderiam ser responsáveis por este efeito. CXCL8-IL-8 foi uma das quimiocinas encontradas em maior concentração na cultura e a neutralização desta inibiu parcialmente as modificações na monocamada (Talavera *et al*, 2004). Nossos dados mostram níveis aumentados de CXCL8/IL-8 em pacientes FD (13,960 [6,360-45,99]) e FDSA/Grave (11,01 [3,652-19,090]) quando comparado aos controles (1,945 [1,270-4,549]) (Figura 5.1 C)

Quanto a quimiocina CX3CL-1/Fractalcina, St. John e colaboradores, em 2013, estudaram a resposta de mastócitos a infecção pelo DENV e verificaram que estas células aumentaram a produção de CX3CL-1/Fractalcina em resposta ao vírus. Outro trabalho, fora do contexto da Dengue, mostrou que o estímulo de células endoteliais HUVECs e HMVECs com CX3CL1/Fractalcina promoveu reorganização no citoesqueleto de actina nestas células, (Volin *et al*, 2010). No nosso estudo, encontramos níveis aumentados desta quimiocina CX3CL1/Fractalcina em pacientes, independente da forma clínica, comparado aos controles (Controles: 272,7 [259,0-365,1]; FD: 784,9 [499,5-1620,0]; FDSA/Grave: 641,1 [414,1-1300,0]) (Figura 5.1 D).

CCL5/RANTES está envolvida no processo de transmigração leucocitária, induzindo o recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios (revisado por Appay & Rowland-Jones, 2001). Em 2008, Chau e colaboradores demonstraram que crianças infectadas pelo DENV na fase aguda apresentaram níveis plasmáticos mais baixos de CCL5/RANTES quando comparadas as crianças com outras doenças febris (ODF). Nosso grupo também mostrou uma diminuição nos níveis plasmáticos de CCL5/RANTES em pacientes infectados pelo DENV durante a fase aguda da infecção quando comparado aos controles sadios. Interessante que ao analisarmos o tecido hepático de quatro casos fatais por Dengue, encontramos um aumento de células expressando CCL5/RANTES, sugerindo que linfócitos circulantes expressando CCR5 poderiam estar migrando para outros tecidos periféricos, como o fígado (de-Oliveira-Pinto *et al*, 2012). Nesta coorte de pacientes, não observamos diferença estatística entre os grupos com relação aos níveis de CCL5/RANTES (controles: 18675 [12215-30282]; FD: 15943 [9752-30261]; FDSA/Grave: 13109 [4612-23505]) (Figura 5.1 E).

VEGF é conhecido como importante indutor de aumento da permeabilidade, pois induz a endocitose da VE-caderina, desestabilizando as junções intercelulares (Gavard *et al*, 2006). Em trabalhos prévios, níveis elevados de VEGF foram vistos em pacientes com quadro FHD comparado aos pacientes FD e a pacientes com outras doenças febris (Tseng *et al*, 2005). Thakur e colaboradores também demonstraram que pacientes com quadro Grave também apresentaram níveis circulantes de VEGF mais altos que pacientes FD e FDSA. Além disso, os níveis deste mediador estavam mais baixos nos controles sadios quando comparado aos pacientes, independente da forma clínica (Thakur *et al*, 2016). Surpreendentemente,

pacientes FD (147,4 [82,15-227,6] e FDSA/Grave (134,9 [93,46-284,6]) apresentaram níveis plasmáticos de VEGF mais baixos estatisticamente comparados aos controles (348,2 [274,9-640,1]). (Figura 5.1 F).

Por fim, níveis elevados de MMP-9 foram quantificados no sobrenadante de cultura de células dendríticas infectadas pelo DENV. A adição deste sobrenadante induziu aumento da permeabilidade nas monocamadas de HUVECs, mas este efeito foi revertido quando a atividade de MMP-9 foi inibida pela adição da molécula SB-3CT, que neutraliza especificamente a MMP-9 (Luplerdlop *et al*, 2006). De forma semelhante ao VEGF, níveis plasmáticos de MMP-9 nos dois grupos de pacientes, foram inferiores aos controles (controles: 114519 [73497-119653]; FD: 34152 [24108-57325]; FDSA/Grave: 29360 [16908-51566]) (Figura 5.1 G).

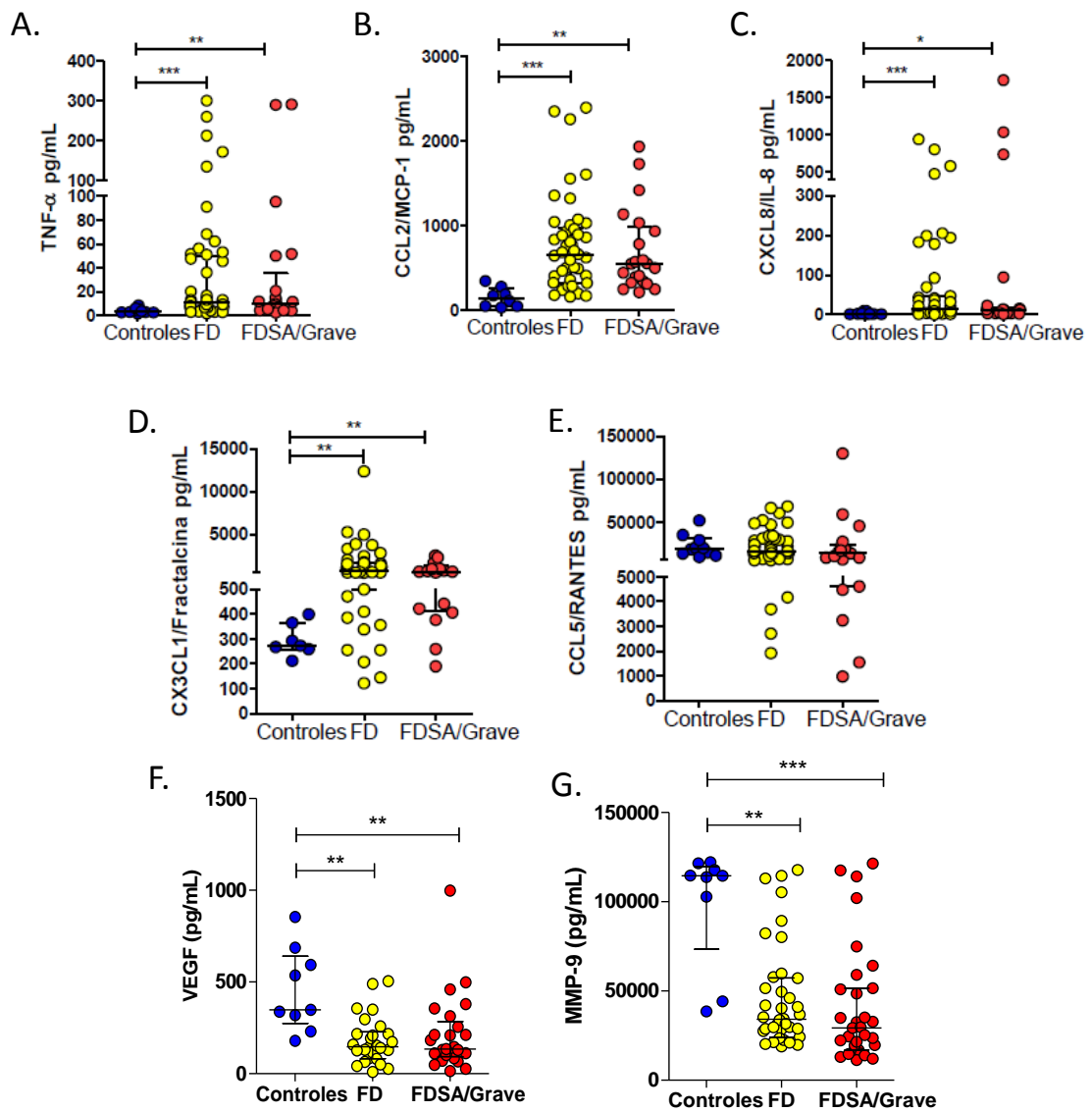


Figura 5.1. Níveis séricos e plasmáticos de mediadores solúveis em pacientes infectados pelo vírus dengue e controles. Gráficos representam a mediana e os intervalos interquartis (25 - 75%) dos níveis séricos (em pg/m) TNF- α , CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CX3CL1/Fractalcina, CCL5/RANTES em pacientes -FD (n=48), FDSA/Grave (n=21) e Controles Sadios (n=10). Níveis plasmáticos (em pg/mL) de VEGF e MMP-9 em pacientes- FD (n=39), FDSA/Grave (n=29) e Controles Sadios (n=9). Resultados foram obtidos através de Luminex ou ELISA. Foi utilizado o *Kruskal-Wallis* seguido do post test *Dunn* para análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 5. Valores de p *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 foram considerados estatisticamente significativos.

5.4. Correlação entre Parâmetros Laboratoriais e Níveis de Mediadores Circulantes.

Nosso objetivo aqui foi avaliar se as alterações clínico-laboratoriais dos pacientes poderiam ser influenciadas direta- ou inversamente pela quantidade de mediadores no soro/plasma dos pacientes, utilizando para isso o teste de correlação Spearman. Como demonstrado na Tabela 5.3, os dias de doença foram correlacionados inversamente com os níveis de TNF- α , CCL2/MCP-1 e CX3CL1/Fractalcina. Já as plaquetas foram inversamente correlacionadas com os níveis de CCL2/MCP-1, mas diretamente com CCL5/RANTES. As contagens de leucócitos e linfócitos foram correlacionadas inversamente com CCL2/MCP-1, mas diretamente com CCL5/RANTES e MMP-9. Apenas para os linfócitos observamos correlação inversa com CX3CL1/Fractalcina e monócitos foram correlacionados diretamente com MMP-9. Não detectamos qualquer correlação estatisticamente significativa entre as transaminases AST e ALT e níveis de VEGF e CXCL8/IL-8.

Como manifestações hemorrágicas e aquelas associadas a alteração da permeabilidade vascular são bastante importantes no desfecho clínico da dengue, reagrupamos os pacientes de acordo com a presença ou ausência dessas manifestações. Todos os mediadores quantificados não discriminaram os grupos de pacientes com ou sem qualquer manifestação hemorrágica. Como é um dado bastante original, representamos essa análise na Figura 5.2 em relação aos níveis de VEGF e MMP-9. Não tivemos grupos de pacientes com um n amostral comparável para esse mesmo tipo de análise em relação ao extravasamento plasmático.

Tabela 5.3. Correlação entre os dados laboratoriais dos pacientes infectados pelo DENV e os níveis circulantes de mediadores solúveis.

	TNF- α	CCL2/ MCP-1	CX3CL1/ Fractalcina	CCL5/ Rantes	MMP-9
Dias de doença	-0,229 $p < 0,03^{n=88}$	-0,354 $p < 0,001^{n=86}$	-0,581 $p < 0,001^{n=61}$	ns $n=84$	ns $n=68$
Plaquetas	ns $n=66$	-0,258 $p < 0,04^{n=64}$	ns $n=42$	+0,418 $p < 0,001^{n=64}$	ns $n=43$
Leucócitos	ns $n=80$	-0,259 $p < 0,03^{n=77}$	ns $n=54$	+0,253 $p < 0,03^{n=75}$	+0,473 $p < 0,001^{n=63}$
Linfócitos	ns $n=77$	-0,351 $p < 0,002^{n=75}$	-0,451 $p < 0,001^{n=53}$	+0,326 $p < 0,005^{n=73}$	+0,284 $p < 0,03^{n=59}$
Monócitos	ns $n=74$	ns $n=71$	ns $n=50$	ns $n=70$	+0,376 $p < 0,003^{n=59}$

Correlação de Spearman utilizando o software GraphPad Prism versão 5. Valores de p (two-tailed) foram considerados significativos quando $< 0,05$. O ns significa correlação não significativa, n representa o número de pares analisados. Plaquetas são expressas em células/mm³; AST/TGO e ALT/TGP em U/L; leucócitos, linfócitos e monócitos por células/mm³.

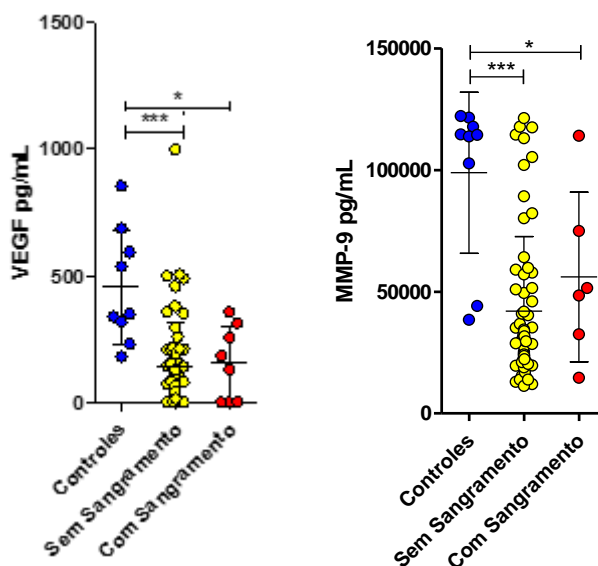


Figura 5.2. Níveis de VEGF e MMP-9 e quadros de sangramento. Gráficos representam a média e o desvio padrão dos níveis séricos (em pg/m) de MMP-9 e VEGF em controles saudáveis (n=9), pacientes Sem Sangramento (n=63) e Com Sangramento (n=8 para VEGF e n=6 para MMP-9). Resultados foram obtidos através de ELISA. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 5. Valores de p * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.5. Caracterização da Expressão da CD147/EMMPRIN e das Moléculas de Adesão CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 nas HMVEC-d e Padronização da Cultura das HMVEC-d na Presença de Soro de Pacientes Infectados pelo DENV.

Como descrito no item 2 da Introdução, células endoteliais são especializadas tanto no controle seletivo da permeabilidade dos vasos às macromoléculas, como na transmigração de células imunes (Pries & Kuebler, 2006). Em particular na transmigração, é necessário inicialmente a ativação das células endoteliais por ação de citocinas, quimiocinas e outros mediadores solúveis. A ativação por estes mediadores leva à indução da expressão de proteínas de adesão leucocitária, desarranjo das junções intercelulares e degradação das proteínas da matriz extracelular no endotélio e por fim, alteração da permeabilidade da monocamada endotelial permitindo a troca entre constituintes intra- e extravasculares (revisado por Ley *et al*, 2007),

Uma vez que nós e outros autores já demonstramos uma alteração dos níveis de citocinas e quimiocinas circulantes em pacientes infectados pelo DENV, neste estudo nós fomos investigar se a adição de soro de pacientes com quantidades conhecidas de algumas dessas moléculas circulantes seria capaz de alterar a expressão das moléculas de adesão CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1, todas envolvidas no processo de transmigração leucocitária, e da molécula CD147/EMMPRIN, que leva à produção de metaloproteínases de matriz, na monocamada de células endoteliais HMVEC-d (do inglês *Human dermal microvascular endothelial cell*).

Primeiramente, fomos caracterizar a expressão destas moléculas em monocamadas de HMVEC-d com 80% de confluência. A Figura 5.3 demonstra a estratégia de análise utilizada. Uma população celular com características morfológicas (tamanho FSC – *forward scatter* e granulosidade SSC – *side scatter*) típicas de célula viáveis foi selecionada. Em seguida, os “doublets” foram excluídos para eliminar das análises células que se sobrepuseram ao passar pelo laser do citômetro. Cada histograma representa a marcação simples dos marcadores. Como podemos observar, a maioria das HMVEC-d expressam em quase sua totalidade CD147/EMMPRIN e CD31/PECAM-1. Em contraste, CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 são expressos em menor percentual nas HMVEC-d cultivadas sem qualquer estímulo, quando comparados aos outros marcadores. Na Figura 5.3 F, o gráfico de

barras demonstra a média da expressão dos quatro marcadores em 4 diferentes experimentos, para os quais temos CD147/EMMPRIN ($83,0 \pm 8,7\%$, representando a média \pm desvio padrão), CD31/PECAM-1 ($89,6 \pm 8,7\%$), CD54/ICAM-1 ($20,6 \pm 6,3\%$) e CD106/VCAM-1 ($13,8 \pm 4,5\%$).

Após a avaliação dos níveis basais das moléculas nas HMVEC-d, fomos avaliar se a adição de 20% de soro de pacientes diluídos em meio de culturas das HMVEC-d era capaz de alterar a expressão delas. O uso de 20% de soro de pacientes foi baseado em dados prévios da nossa equipe que demonstraram que essa concentração foi capaz de induzir alterações da monocamada quando feita medidas de resistência elétrica transendotelial (TEER) (Cipitelli, M.C., 2014).

A próxima etapa foi avaliar a cinética de expressão das moléculas quando as monocamadas de HMVEC-d eram tratadas com 20% de soro dos pacientes. De acordo com nossos dados prévios da medida de TEER, após 1 hora de contato HMVEC-d e 20% soro de pacientes detectamos uma alteração significativa na medida de TEER, principalmente nos pacientes FDSA/Graves. Essa alteração também foi vista nas 24 horas de cultura, porém em sistema de cultura de células sobre um inserto Transwell revestido de membrana de policarbonato, as HMVEC-d apresentavam uma menor viabilidade, indicando que 24h não era o melhor momento neste sistema (Cipitelli, 2014). Nós refizemos uma cinética curta, utilizando apenas os tempos de 1h e 24h para avaliação das modificações da expressão das moléculas de adesão e da CD147 em nosso modelo de estudo, onde as HMVEC-d eram cultivadas em placas de cultura de 24 poços. Primeiramente, após 1 h e também nas 24 horas, a viabilidade das células era superior a 80% de acordo com o método de exclusão do azul de Trypan, diferente do observado nas culturas feitas nos insertos. Dos 3 pacientes utilizados, 1 deles apresentou uma modificação das quatro moléculas mais remarcada nas 24h do que em 1h. Os demais pacientes não induziram alguma modificação nos dois tempos. Dessa forma, decidimos por usar o tempo de 24h para nossas avaliações

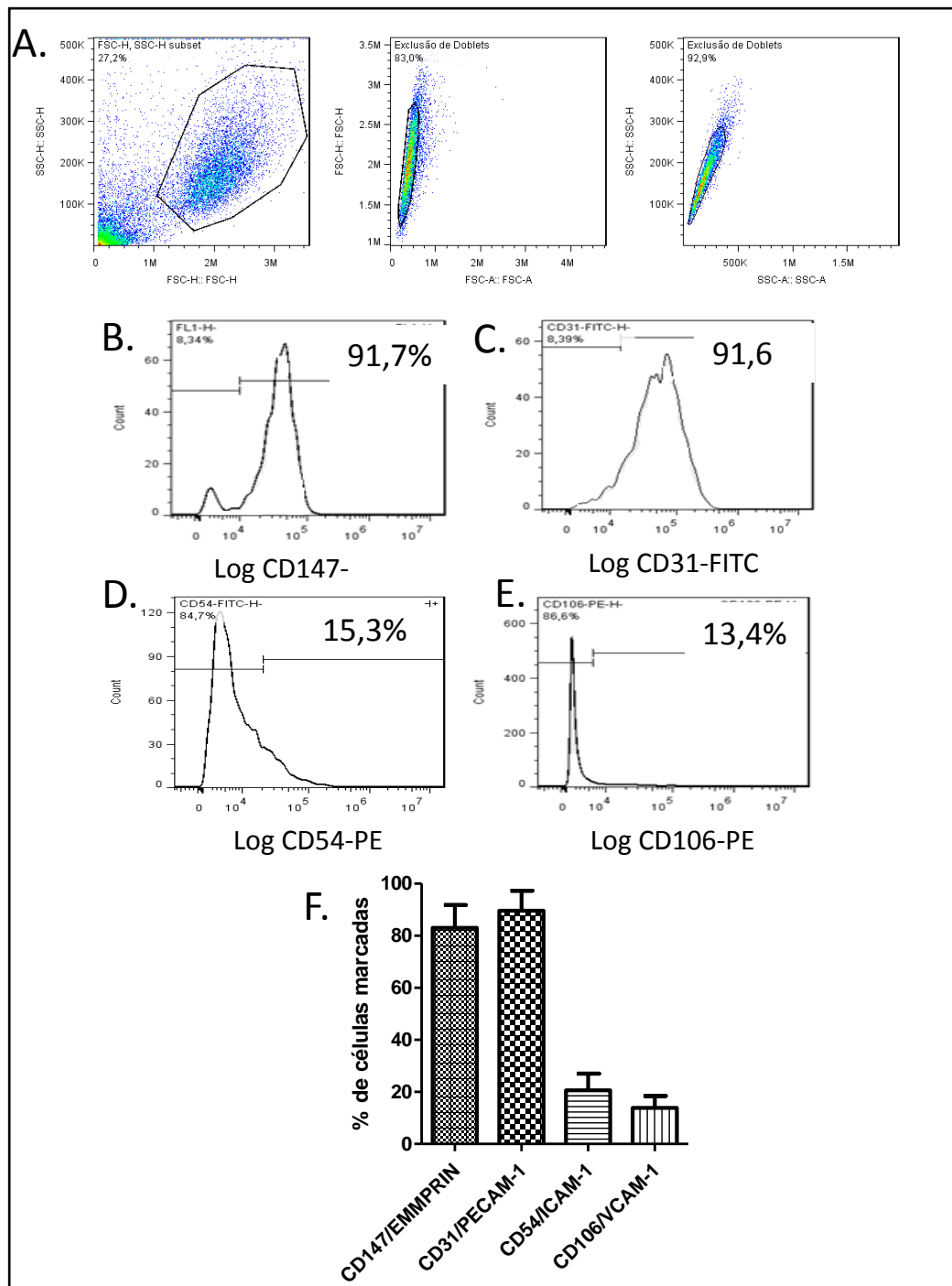


Figura 5.3. Expressão da molécula CD147/EMMPRIN e de moléculas de adesão CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1. (A) Figuras representativas com gráfico de pontos das regiões morfológicas definidas pelo tamanho (FSC), eixo x, e granulosidade (SSC), eixo y, das células endoteliais HMVEC-d cultivadas em meio de cultura suplementado, seguido das estratégias para exclusão de doublets. (B, C, D e E) Histogramas das marcações simples das células endoteliais com CD147-FITC, CD31-FITC, CD54-FITC e CD106-PE, respectivamente. (F) Média e desvio padrão da frequência de células expressando cada uma das moléculas de interesse.

5.6. Modulação da expressão de CD147/EMMPRIN, CD106/VCAM-1, CD54/ICAM-1 e CD31/PECAM-1 em HMEVC-d na presença de soro de pacientes infectados pelo DENV.

Afim de avaliar a existência de alguma alteração na expressão das moléculas nas HMVEC-d cultivadas na presença de 20% de soro de pacientes por 24h, 21 soros de pacientes foram selecionados, sendo 11 deles FD, 7 FDSA e 3 Graves. As características desses pacientes selecionados podem ser vistas na tabela 5.4.

Tabela 5.4. Características dos pacientes infectados pelo DENV.

Pacientes	Dias de Doença	Forma Clínica	TNF- α	CCL2/ MCP-1	CXCL8/ IL-8	CX3CL1/ Fractalcin	CCL5/ Rantes	VEGF	MMP-9	Sorotipo
ADS 18	3	FD	300,6	1600,3	806,8	1185,5	28055,6	--	--	DENV-4
EMFA 15	4	FD	7,0	1038,3	6,3	1498,8	12512,7	349,4	19781,9	DENV-4
IMA 11	8	FD	3,3	283,1	1,3	--	27397,8	258,2	105337,8	n.i.
LCO	4	FD	14,9	805,2	7,5	--	4339,4	173,1	28875,8	DENV-2
LHMAN 04	6	FD	9,0	315,6	5,2	749,6	9744,8	--	--	n.i.
MAA 07	4	FD	7,8	1026,3	8,0	1732,6	5166,4	--	--	DENV-4
MBV	5	FD	30,9	1498,6	--	--	10550,5	208,2	21304,0	DENV-2
MM 18	5	FD	45,7	954,2	32,0	1333,0	12646,1	--	49527,0	DENV-4
OCC 10	2	FD	4,1	800,2	4,3	1262,8	14440,7	--	--	DENV-1
RM 08	2	FD	171,9	657,5	582,0	583,4	17062,3	--	--	DENV-4
SES 08	4	FD	9,4	501,1	24,2	1546,5	5133,3	--	31432,5	DENV-4
ALO 08	11	FDSA	50,0	547,7	93,8	421,5	58575,6	--	--	n.i.
CA	2	FDSA	64,4	8840,1	--	--	5897,7	--	74963,4	DENV-2
CADS 20	3	FDSA	7,3	386,3	3,458	--	130180,9	--	--	n.i.
ISRL	5	FDSA	80,0	1103,7	29,3	--	29801,8	204,9	--	DENV-2
JGSP	3	FDSA	71,2	1603,7	15,9	--	8064,2	998,3	21621,7	DENV-2
VAM	3	FDSA	30,9	2020,9	--	--	5196,4	129,3	50960,6	DENV-2
LFS 08	15	FDSA	4,038	339,2	2,7	258,9738	4478,3	--	--	DENV-4
AOG	3	Grave	--	1265,0	32,2	--	5259,2	355,6	--	DENV-2
LMF	5	Grave	--	268,7	68,6	--	16348,6	--	--	n.i.
GFS 01	12	Grave	4,440	243,4	0,7	189,1	26720,7	134,8	35196,1	n.i.

A tabela mostra os 21 pacientes utilizados neste estudo, a forma clínica apresentada, dias de doença e os níveis séricos/plasmáticos de citocinas, quimiocinas e outros mediadores solúveis (em pg/mL). n.i. significa sorotipo não identificado.

A Figura 5.4 apresenta imagens representativas das HMVEC-d cultivadas em meio suplementado e na presença de soro dos pacientes AOG (figura 5.4 D) e RM08 (figura 5.4 F e H). Como podemos observar na análise morfológica das HMVEC-d cultivadas com 20% soro do paciente RM08, não ocorreu uma diminuição da viabilidade das células nem com a adição deste soro nem com os soros dos demais pacientes (figura 5.4 A e B). Além disso, na mesma figura, apresentamos um esquema representativo de como foi realizada a análise da expressão de cada molécula nas células endoteliais cultivadas em meio suplementado (Figura 5.4 C, E e G) e tratadas com 20% de soro de paciente (Figura 5.4 D, F e H) no formato “dot-plot”.

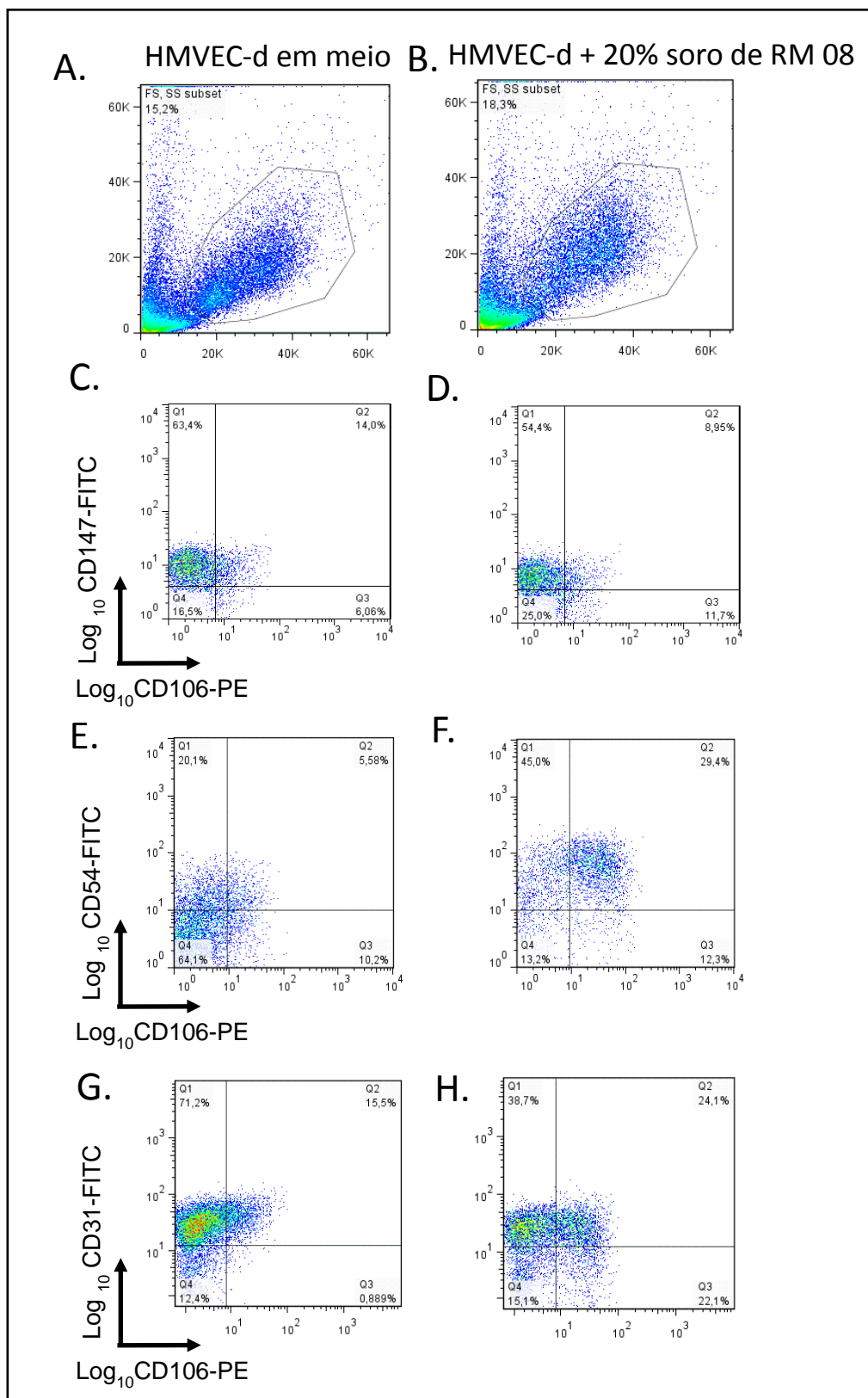


Figura 5.4. Expressão de CD147/EMMPRIN, CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1 e CD31/PECAM-1. Figuras representativas das regiões morfológicas definidas pelo tamanho (FSC), eixo x, e granulidade (SSC), eixo y, das células endoteliais HMVEC-d cultivadas apenas em meio suplementado (A) ou com o soro do paciente RM 08 (B). Abaixo, dot plots representativos das co-marcações CD147CD106, CD54CD106 e CD31CD106 em células cultivadas apenas em meio (C, E e G) ou com soro do paciente AOG (D) e do paciente RM08 (F e H).

As análises de expressão das moléculas estudadas nos 21 pacientes foram avaliadas e apresentadas na Figura 5.5. Como podemos observar, a adição de 20% de soro de pacientes levou a uma redução estatisticamente significativa da expressão da molécula CD147/EMMPRIN. No entanto, não detectamos diferenças estatísticas na expressão das moléculas CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1 ou CD106/VCAM-1. Avaliamos também a co-expressão dessas moléculas. Talvez por influência da diminuição da expressão de CD147/EMMPRIN nas HMVEC-d tratadas com 20% soro, observamos uma diminuição estatística da co-expressão CD147+CD106+ nas HMVEC-d, mas não nas demais co-expressões.

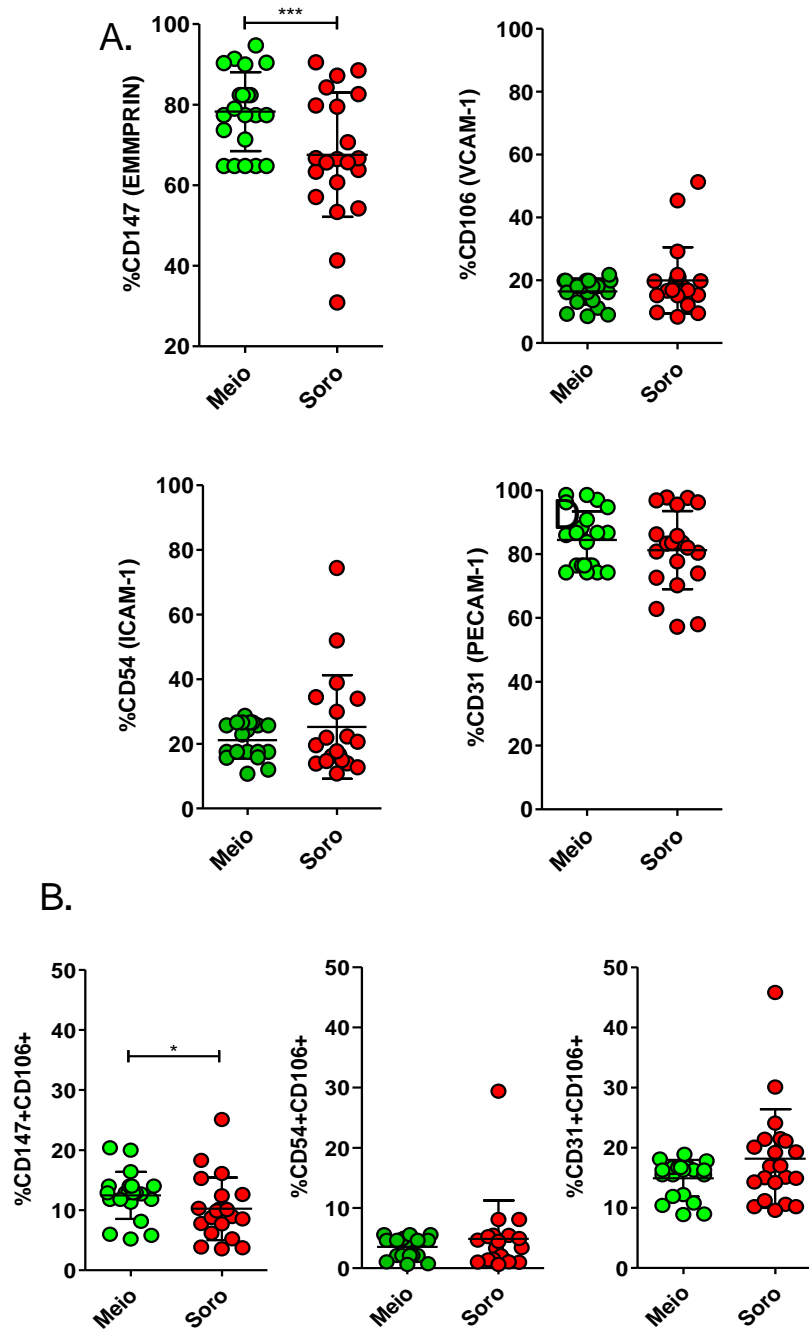


Figura 5.5. Comparação da frequência de HMVEC-d expressando CD147 e as moléculas de adesão em culturas na presença ou não de soro de pacientes. (A) Percentual de expressão de CD147, CD31, CD54, CD106 e **(B)** co-expressão de CD147CD106, CD31CD106 e CD54CD106 nas HMVEC-d em meio suplementado e nas culturas com 20% de soro de pacientes. Foi utilizado o *T test* para análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 5. Valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos.

Utilizamos uma segunda forma de análise da modulação da expressão dessas moléculas calculando a razão entre o % da molécula nas HMVEC-d tratadas com soro sobre o % da molécula nas HMVEC-d cultivadas em meio suplementado. Essa razão diminuiu a variabilidade entre os experimentos e ainda informa o quanto a molécula foi modulada, se negativamente ou positivamente. Como critério para indicar algum tipo de variação, quando a razão era $\geq 1,2$ consideramos que ocorreu um aumento da expressão, enquanto que a razão $\leq 0,8$ foi considerada como uma diminuição da expressão (Figura 5.6).

$$\text{Razão} = \frac{\% \text{ de molécula nas HMVECd tratadas com 20\% soro de paiente}}{\% \text{ de molécula nas HMVECd cultivadas em meio}}$$

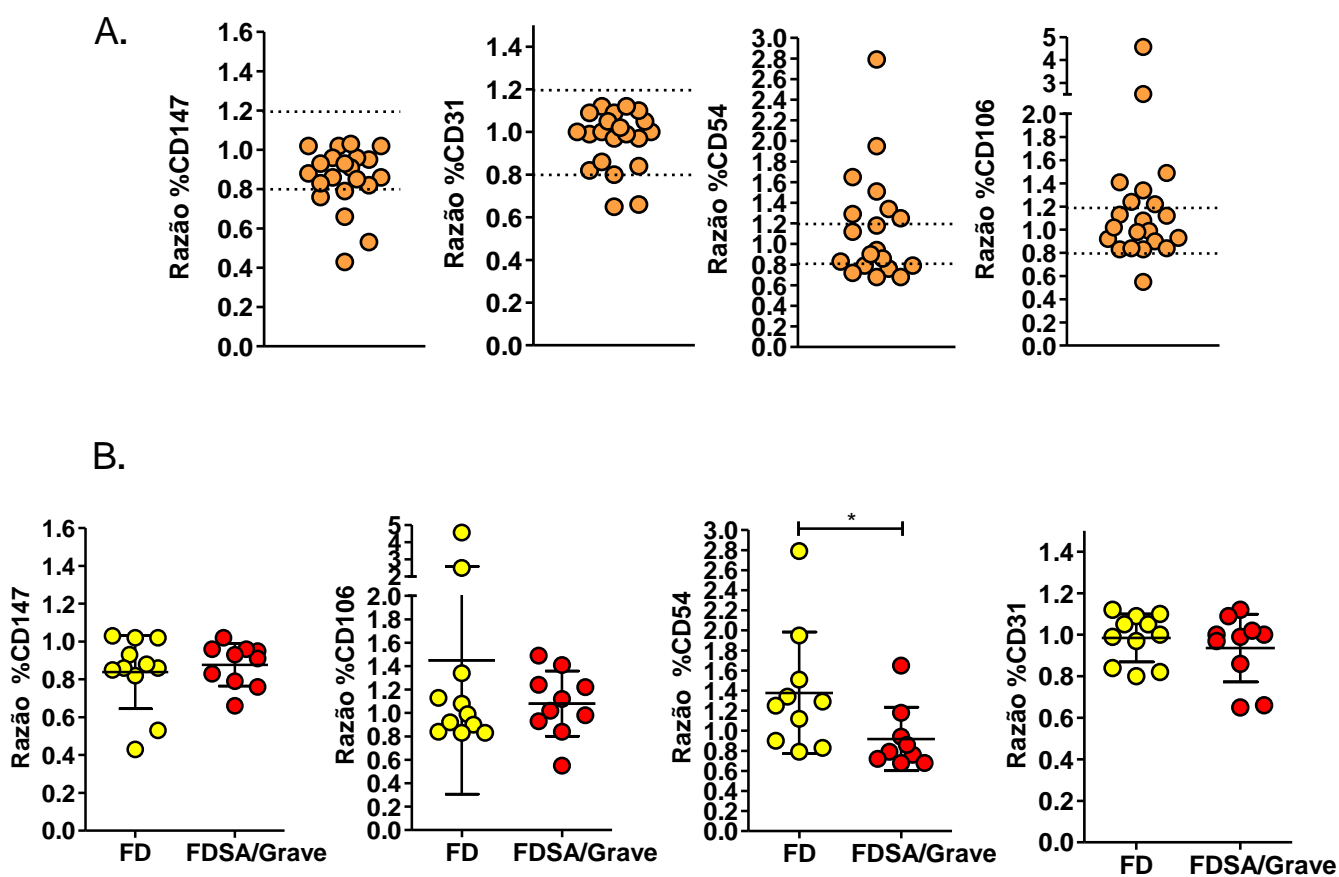


Figura 5.6. Modulação da frequência de células endoteliais expressando cada molécula. (A) Razão Soro/Meio do % total de células endoteliais expressando as moléculas de interesse sem separar os grupos. (B) Razão Soro/Meio do % total de células endoteliais expressando as moléculas de interesse separando os grupos FD e FDSA/Grave. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para análise estatística em B, D e F utilizando o software GraphPad Prism 5. Valores de p * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 foram considerados estatisticamente significativos.

Em relação a CD147/EMMPRIN, 5 dos 21 soros de pacientes avaliados induziram diminuição da expressão da molécula. Ao avaliarmos os grupos FD e FDSA/Grave, não vimos diferença estatística e de fato, dentre os pacientes que diminuiram a modulação da expressão de CD147, 2 eram FD, 1 FDSA e 2 Graves.

Em relação a CD106/VCAM-1, 7 soros dos 21 pacientes aumentaram a expressão desta molécula e apenas 1 soro diminuiu a expressão. Os grupos clínicos foram comparados e dentre os pacientes que aumentaram a expressão 3 eram FD, 2 FDSA e 2 Graves, mas não detectamos diferença estatística entre os grupos.

Os dados de expressão da molécula CD54/ICAM-1 foram bem diferentes das demais moléculas estudadas. Dos 21 pacientes, 6 soros induziram diminuição da expressão de CD54/ICAM-1 e outros 7 soros induziram aumento da expressão de CD54 nas HMVEC-d. Ao comparar os grupos clínicos, observamos que o grupo FDSA/Grave apresentou uma diminuição da expressão estatisticamente significativa comparada ao grupo FD. De fato, entre aqueles pacientes cujo soro diminuíram a expressão de CD54, apenas 1 era FD, 4 eram FDSA e 1 Grave, enquanto que dentre aqueles que aumentaram a expressão de CD54, 6 eram FD e apenas 1 Grave.

Por fim, para CD31/PECAM-1, 3 dos 21 soros de pacientes avaliados induziram diminuição da expressão. Também não vimos diferença entre os grupos FD e FDSA/Grave, e dentre os pacientes que diminuíram a modulação da expressão de CD31, 1 era FD e 2 Graves. Interessante, que esses 3 soros de pacientes também induziram diminuição da expressão de CD147/EMMPRIN.

O próximo passo foi avaliar se os mediadores solúveis teriam alguma influência na modulação da expressão dessas moléculas nas HMVEC-d.

5.7. Correlação entre a Expressão das Moléculas de Adesão e CD147 nas HMVEC-d e Mediadores Séricos.

Com os dados de quantificação dos mediadores circulantes no soro/plasma de pacientes, nós fomos investigar se esses mediadores teriam algum efeito direto ou inverso sobre a expressão das moléculas de adesão e CD147 sobre as HMVEC-d, utilizando testes estatísticos como a correlação de Spearman. Todas as correlações possíveis entre a expressão das moléculas nas HMVEC-d tratadas com soro de paciente e os mediadores foram avaliadas. Destacamos na Figura 5.7 com as figuras de correlação nas quais detectamos significância estatística ou uma tendência de correlação. De forma interessante, um mediador foi associado a expressão de uma determinada molécula. Assim, a expressão de CD147 foi correlacionada diretamente com os níveis de CX3CL1/Fractalcina, CD31 inversamente com CXCL8/IL-8, CD54 está diretamente correlacionada com MMP9 e por fim, CD106 está diretamente correlacionada com CCL5/RANTES. Desta forma, parece que embora essas moléculas desempenhem funções bastante similares no endotélio, a regulação de cada uma delas se dá por mecanismos diferentes.

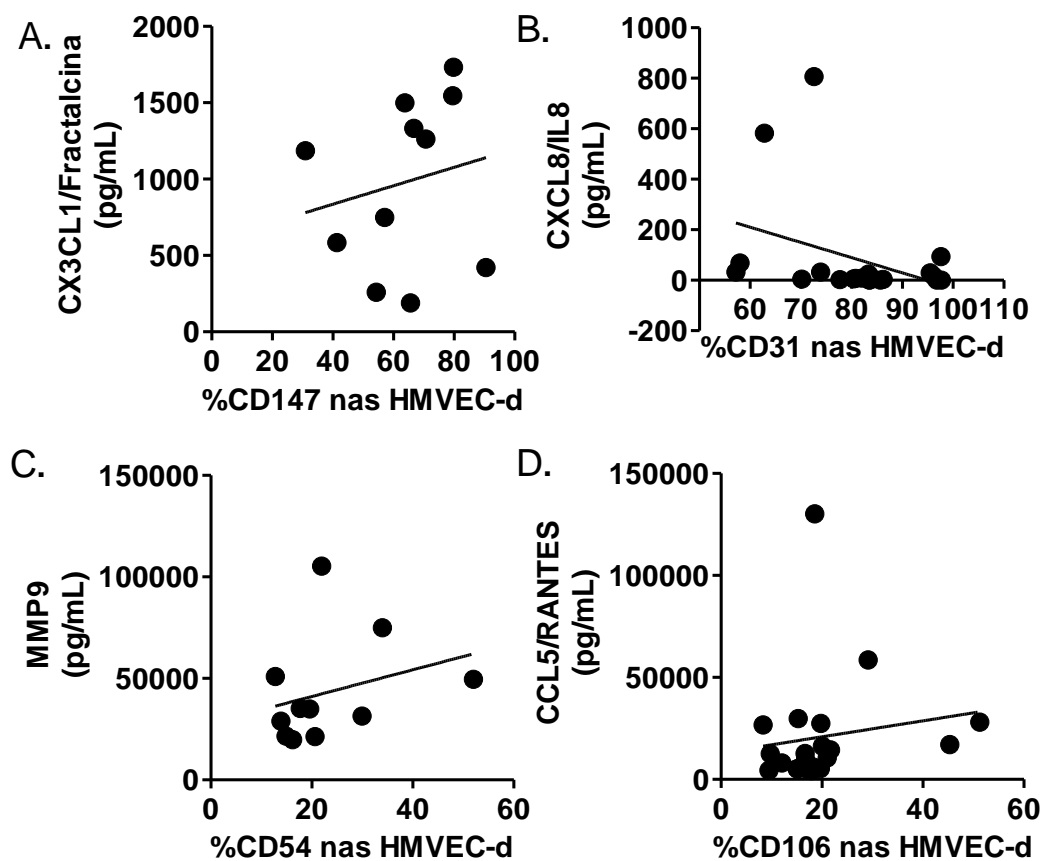


Figura 5.7. Correlação dos níveis séricos de mediadores solúveis com a expressão de CD147 e/ou moléculas de adesão. (A) Correlação entre CD147 e CX3CL1; (B) CD31 e CXCL8; (C) CD54 e MMP9 e por fim, (D) CD106 e CCL5. Correlação de Spearman utilizando o software GraphPad Prism versão 5.

6. DISCUSSÃO

Trabalhos usando a infecção direta pelo DENV, adição de proteínas virais como a NS1 recombinante ou adição de sobrenadante de culturas infectadas em monocamadas de células endoteliais vem demonstrando como fatores virais são importantes na alteração da permeabilidade endotelial. Nós avaliamos o efeito de mediadores solúveis oriundos do soro/plasma de pacientes na tentativa de entender o impacto de fatores do hospedeiro neste processo.

6.1. Sorotipo viral, contagem de plaquetas e leucócitos totais e níveis séricos das transaminases hepáticas constituem parâmetros importantes no prognóstico e desfecho clínico da Dengue.

Mecanismos imunopatogênicos, fatores de virulência e demais aspectos relacionados tanto ao hospedeiro como ao vírus constituem alvos de intensa pesquisa. Isso, principalmente, na tentativa de uma melhor compreensão dos quadros assintomáticos da Dengue e dentre aqueles sintomáticos, o porquê da existência de diferentes desfechos clínicos entre os pacientes.

Em relação aos sorotipos virais, estudo prospectivo entre 2005 a 2010 mostrou que numa coorte de pacientes infectados pelo DENV-4, 67,3% apresentaram “Dengue sem complicações”, 17,1% foram definidos como “gravidade intermediária” e 15,8% Graves. Neste mesmo estudo, pacientes infectados pelo DENV-2 caracterizavam aqueles com maior prevalência de sinais e sintomas associados à “fase crítica”, com diminuição rápida e acentuada da contagem de plaquetas, elevação do hematócrito e hipovolemia, indicando maior propensão ao extravasamento plasmático e às formas graves comparada a epidemia de DENV-4 (Thomas *et al*, 2014). Nosso grupo vem corroborando os dados de Thomas e colaboradores e a hipótese de gravidade relacionada ao sorotipo. Demonstramos em uma coorte de pacientes infectados pelos DENV-2 e DENV-3 em 2007 e 2008, que 45,2% dos pacientes eram FD e 54,8% FDSA/Grave (de-Oliveira-Pinto, 2012). Em 2013, estudo realizado nas mesmas regiões geográficas do trabalho anterior, mas com a prevalência de DENV-4, observamos um acréscimo de casos FD, com 69,1% e uma diminuição dos casos FDSA/Grave, com 30,1%. Aqui, analisamos pacientes das epidemias de 2010 e 2013 cuja prevalência é de DENV-4 e, portanto, uma epidemia que poderia ser caracterizada por um prognóstico clínico brando. Partimos então para as análises dos parâmetros clínicos e laboratoriais na tentativa

de confirmar essa hipótese, mas, infelizmente por não termos grupos comparáveis, no caso, apenas 1 paciente DENV-1, 12 DENV-2 e 32 DENV-4, somente avaliamos os grupos segundo a classificação clínica da OMS 2009.

Assim, em nossa coorte, pacientes que apresentavam sinais/sintomas de extravasamento plasmático e/ou sangramentos constituíam o grupo FDSA/Grave. Confirmamos uma plaquetopenia mais acentuada nos FDSA/Grave seguido dos FD em relação aos controles e, portanto, reafirmamos que a contagem de plaquetas é um parâmetro que deve ser continuamente observado pelos clínicos. Diferentes mecanismos vêm sendo propostos para a compreensão da plaquetopenia associada à Dengue. Dentre elas, diminuição da plaquetopoiese na medula óssea por conta da infecção direta das células progenitoras e estromais, aumento da lise de plaquetas em decorrência da ativação do Sistema Complemento, aumento da fagocitose de plaquetas por Anticorpos anti-NS1, anti-prM e anti-E que ao formarem imunocomplexos com os Antígenos virais presentes na superfície de plaquetas levam a sua fagocitose, e por fim, aumento do consumo de plaquetas devido ao comprometimento de moléculas relacionadas à coagulação (revisado por Azeredo *et al*, 2015).

Além das plaquetas, disfunção hepática com hepatomegalia e aumento das transaminases hepáticas são comumente observadas nos pacientes e requer atenção dos clínicos (Lee *et al*, 2012). Em crianças com a forma grave da dengue, a ocorrência de insuficiência hepática fulminante tem sido causa de morte (Roy *et al*, 2013). Neste estudo, verificamos que os pacientes FDSA/Grave apresentaram níveis elevados de AST/TGO e uma tendência ao aumento de ALT/TGP, comparado aos FD. ALT/TGP é uma enzima específica do tecido hepático, apresentando baixíssimas concentrações em outros tecidos, já AST/TGO pode ser encontrada em altas concentrações em outros órgãos tais como coração, rins, cérebro e músculo esquelético. Portanto, não podemos afirmar que existe uma disfunção hepática importante nos FDSA/Grave apenas por conta do aumento de AST/TGO, mas é potencialmente possível que haja. Ainda, não podemos excluir o risco de disfunção de outros órgãos pelo aumento de AST/TGO. As lesões hepáticas podem estar relacionadas aos efeitos diretos do vírus ou por consequência da resposta imune no tecido hepático do hospedeiro, levando ao comprometimento circulatório, acidose metabólica, hipóxia por hipotensão e/ou derrame vascular (Itha *et al*, 2005). Nas análises estatísticas, observamos que as Transaminases se correlacionam

inversamente com as plaquetas, confirmando que ambos os parâmetros são de extrema importância para o prognóstico clínico.

Uma das formas mais simples de se avaliar o “status imunológico” dos pacientes infectados pelo DENV é ver a contagem de leucócitos, linfócitos e monócitos. Em nosso estudo, observamos que independente do quadro clínico, pacientes FD e FDSA/Grave apresentaram leucopenia, associada à linfopenia e à monocitopenia. Na Dengue, a queda na contagem de leucócitos concomitante à de linfócitos T já foram relacionadas à supressão da medula óssea na fase aguda da doença (Jameel *et al*, 2012). Por outro lado, nosso grupo já demonstrou um aumento da susceptibilidade à apoptose de monócitos primários infectados *in vitro* pelo DENV-2 (Torrentes-Carvalho *et al*, 2009). Parece de fato que pacientes infectados pelo DENV apresentam uma rede de interações de moléculas indutoras e inibidoras da apoptose regulando a frequência dessas células do sistema imune (Limonta *et al*, 2014). Nosso grupo publicou dados mostrando uma alta frequência de linfócitos T expressando marcadores de ativação e de citotoxicidade, mas com baixa expressão da molécula anti-apoptótica Bcl2, indicando que os linfócitos T CD4 e T CD8 ativados são susceptíveis à apoptose na fase aguda da infecção (Torrentes-Carvalho *et al*, 2014). Por fim, Yang e colaboradores, em 2016, demonstraram em modelo *in vitro*, que numa infecção secundária com um sorotipo heterólogo, embora se detecte menos morte celular induzida por ativação (AICD, do inglês *activation-induced cell death*) das células T, as células T são continuamente ativadas, com alta produção de citocinas pró-inflamatórias e poucas citocinas reguladoras, induzindo alta carga viral e resposta do tipo patológica. Em contraste, em uma infecção secundária com um sorotipo homólogo observa-se uma resposta imune mais do tipo protetora com mais células sensíveis à AICD. Assim, nossos dados poderiam indicar um aumento da apoptose de linfócitos e monócitos dos pacientes. Se a leucopenia associada a diminuição das outras células imunes estaria associada ao status imunológico de nossos pacientes, ainda é difícil afirmar e precisa ser investigado.

6.2. Participação de mediadores inflamatórios circulantes na imunopatogênese da Dengue com ênfase na alteração da permeabilidade endotelial nas HMVEC-d.

Um dos processos imunopatogênicos importantes, associado a uma piora do quadro clínico da Dengue, podendo inclusive levar à morte do paciente, é o extravasamento vascular. Diversos mecanismos vêm sendo associados à disfunção

endotelial. Em nosso estudo, nós investigamos o envolvimento de mediadores circulantes presentes no soro/plasma de pacientes e, para isso, dosamos os níveis de alguns desses mediadores nos pacientes da nossa coorte.

Primeiramente, níveis aumentados de TNF- α tanto nos pacientes FD como nos FDSA/Graves foram encontrados em relação aos controles. Os níveis de TNF- α foram correlacionados inversamente com os dias de doença, sugerindo maior produção desta citocina no início da dengue. Rathakrishnan e colaboradores realizaram uma cinética de produção de citocinas e viram que níveis diminuídos de TNF- α , tanto em FD como nos FDSA/Graves, foram encontrados nos primeiros dias de doença ou fase febril, enquanto que níveis aumentados foram vistos na fase de defervescência (Rathakrishnan *et al*, 2012). Em relação à gravidade, estudos não observaram associação com os níveis TNF- α (Laur *et al*, 1998; Chen *et al*, 2006), semelhante ao que observamos. No entanto, Kelley e colaboradores demonstraram níveis aumentados de TNF- α no sobrenadante de células THP-1 (linhagem humana de células monocíticas) infectadas pelo DENV-2 e que a adição desse sobrenadante na monocamada das células endoteliais HMVEC_s promovia aumento da permeabilidade endotelial. A ação do TNF- α foi confirmada pela adição de bloqueadores específicos da citocina que levaram à recuperação da integridade da monocamada (Kelley *et al*, 2012). Utilizando outro exemplo de células endoteliais, as HUVEC, Dewi e colaboradores, demonstraram que a infecção pelo DENV-2 das HUVEC_s ou seu tratamento com TNF- α também levou ao aumento da permeabilidade endotelial (Dewi *et al*, 2004).

De forma semelhante ao TNF- α , nossos pacientes, independente do quadro clínico, apresentaram níveis séricos elevados de CCL2/MCP-1. Nossos resultados das análises de correlação indicaram que níveis de CCL2/MCP-1 foram inversamente correlacionados aos dias de doença, semelhante a dados prévios que viram aumento de CCL2/MCP-1 na fase febril (Rathakrishnan *et al*, 2012). Além disso, vimos que níveis de CCL2/MCP-1 foram correlacionados inversamente com a contagem de leucócitos totais e linfócitos, mas não com monócitos. Até o momento não existem dados da literatura que suportem alguma explicação para essa correlação com leucócitos e linfócitos. Já com monócitos, estudo demonstrou que subpopulações de monócitos CD16⁻ e CD16⁺ são igualmente infectadas *in vitro* pelo DENV-2, mas os CD16⁺ infectados são fortes produtores de CCL2/MCP-1, dentre outras citocinas inflamatórias, comparado aos CD16⁻ infectados (Wong *et al*, 2012).

Interessante, que trabalho do nosso grupo demonstrou aumento da frequência de monócitos CD14+CD16+ em pacientes brandos comparado aos graves (Azeredo *et al*, 2010). Portanto, é possível que monócitos CD16+ sejam os principais produtores de CCL2/MCP-1 na Dengue, mas não sabemos com clareza se existe alguma relação entre CCL2/MCP-1 e linfócitos na Dengue.

Em relação à gravidade, níveis aumentados de CCL2/MCP-1 foram vistos em pacientes com FHD comparados aos FD. Além disso, esse mesmo estudo mostrou que a infecção de monócitos humanos com DENV-2 *in vitro* também induzia a produção de CCL2/MCP-1. A adição desse sobrenadante em monocamadas de HUVECs levou ao aumento da permeabilidade dessas monocamadas e redistribuição da proteína ZO-1 com diminuição de sua expressão nas junções intercelulares. De forma interessante, a neutralização de CCL2/MCP-1 com anticorpos bloqueadores reverteu parcialmente essas alterações na monocamada, sugerindo a participação desta quimiocina no processo (Lee *et al*, 2006).

Recordando nossos dados, independente do quadro clínico, pacientes apresentaram níveis séricos elevados de CXCL8/IL-8, mas não detectamos qualquer correlação com os parâmetros laboratoriais estudados. Nossos dados não foram corroborados por Raghupathy e colaboradores que detectaram níveis altos de CXCL8/IL-8 em pacientes na forma grave da Dengue (Raghupathy *et al*, 1998). Na alteração da permeabilidade endotelial, CXCL8/IL-8 parece ter um papel importante. Estudo anterior mostrou que células endoteliais HMEC-1 infectadas pelo DENV-2, apresentavam reorganização do citoesqueleto de actina e da ocludina, com aumento da permeabilidade, porém essas modificações também foram verificadas em células HMEC-1 presentes na mesma cultura, mas não infectadas. Esse sobrenadante apresentava alta concentração de CXCL8/IL-8. Utilizando anticorpos neutralizantes de CXCL8/IL-8, os autores verificaram um restabelecimento parcial das alterações na monocamada de HMEC-1 infectadas ou não, confirmando o papel de CXCL8/IL-8 na alteração da permeabilidade *in vitro* (Talavera *et al*, 2004).

Nossos dados de quantificação da CX3CL1/Fractalcina em pacientes infectados pelo Dengue são originais, e foi baseado na atuação da quimiocina como um quimioatrativo de linfócitos T, monócitos e células NK e também porque células endoteliais e da musculatura lisa em condições inflamatórias apresentam aumento de sua expressão (revisado por White *et al*, 2012). Outro estudo mostrou que CX3CL1/Fractalcina foi capaz de promover a reorganização do citoesqueleto de

actina de HUVECs e HMVECs, causando modificações em sua morfologia (Volin *et al*, 2010). Na dengue, a infecção pelo DENV da linhagem de mastócitos de ratos RBL (*basophilic leucemia-2H3* cells) levou à ativação dessas células, induzindo degranulação e aumentando da produção de TNF- α e CX3CL1/Fractalquina, dentre outros mediadores (St. John *et al*, 2011). Níveis circulantes de CX3CL1/Fractalquina encontram-se aumentados nos dois grupos de pacientes, independente da gravidade clínica. A análise de correlação mostra que a quimiocina é diretamente correlacionada aos dias de doença, mas inversamente correlacionada com o número de linfócitos.

A quimiocina CCL5/RANTES já vem a algum tempo sendo estudada na Dengue, inclusive pelo nosso grupo. De forma interessante, diferente da maioria dos mediadores inflamatórios, os níveis de CCL5/RANTES parecem ser mais baixos em pacientes comparado aos controles saudáveis. Chau e colaboradores demonstraram em crianças com FHD níveis plasmáticos mais baixos de CCL5/RANTES quando comparadas as crianças com outras doenças febris (ODF) (Chau *et al*, 2008). Nosso grupo mostrou diminuição do CCL5/RANTES circulante em pacientes FD e também nos FDSA/Graves, mas a presença de células CCL5+ no tecido hepático de pacientes que foram a óbito por Dengue, indicando que a quimiocina estaria mais concentrada nos tecidos periféricos do que na circulação (de-Oliveira-Pinto *et al*, 2012). Aqui, não vimos diferença dos níveis de CCL5/RANTES entre pacientes e controles. No entanto, os resultados da análise de correlação indicaram que CCL5/RANTES foi diretamente correlacionada as contagens de plaquetas, leucócitos totais e linfócitos nos pacientes, indicando seu valor preditivo de prognóstico clínico. Neste contexto, nosso grupo demonstrou que pacientes infectados pelo DENV-4 apresentavam níveis circulantes de CCL5/RANTES mais elevados que pacientes infectados pelo DENV-2. Considerando que DENV-4 vem sendo extensivamente relacionado à um desfecho clínico brando, comparado ao DENV-2, é bastante provável que altos níveis de CCL5/RANTES circulante seja um indicador de prognóstico clínico favorável ao paciente (Cipitelli, M.C., 2014).

Diferente de TNF- α , CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8 e CX3CL1/Fractalquina, ao quantificar os níveis circulantes de VEGF e MMP-9, vimos que ambos foram diminuídos nos pacientes comparado aos controles. Nossas análises de correlação não demonstraram qualquer correlação significativa com VEGF, mas os níveis de MMP-9 foram diretamente associados a contagem de leucócitos, linfócitos e

monócitos. Ainda, análises comparativas entre pacientes que apresentaram manifestações hemorrágicas com aqueles que não apresentaram, também não vimos diferença tanto para o VEGF como para a MMP-9.

Os dados disponíveis na literatura são controversos em relação ao VEGF. Utilizando a nova classificação da OMS 2009, o grupo de Thakur demonstrou que pacientes com Dengue Grave apresentaram níveis aumentados de VEGF comparado aos pacientes FDSA e FD e todos os pacientes, apresentaram níveis de VEGF mais altos que controles (Thakur *et al*, 2016). Na classificação da OMS 1997, pacientes com SCD apresentam níveis circulantes mais elevados de VEGF que aqueles com FD e FHD (Magione *et al*, 2014) e em outro estudo, pacientes FHD apresentaram níveis plasmáticos de VEGF mais elevados comparado aos pacientes FD (Srikiatkachorn *et al*, 2007).

Por outro lado, semelhante aos nossos dados, outro grupo demonstrou em pacientes FD e FHD níveis mais baixos de VEGF e de seu receptor solúvel sVEGF-R2, comparado aos controles (Seet *et al*, 2009).

VEGF é uma molécula envolvida na angiogênese e é um potente modulador da barreira endotelial, induzindo endocitose da VE-caderina e desestabilizando as junções intercelulares (Gavard *et al*, 2006). Em células endoteliais, existem dois receptores para esta molécula, VEGF-R1 e VEGF-R2. A ligação ao VEGF-R2 leva ao aumento da permeabilidade vascular (Gille *et al*, 2001). As formas solúveis dos receptores VEGF-R1 e VEGF-R2 são descritas por atuar como bloqueadores da interação VEGF com seus receptores membranares (Kendall *et al*, 1996). A infecção de células endoteliais HUVEC pelo DENV leva à diminuição dos níveis de VEGF-R2 solúvel, mas aumenta a expressão do receptor na membrana (Srikiatkachorn *et al*, 2007). Baseado nas informações da literatura, nós acreditamos que a diminuição dos níveis de VEGF em nossos pacientes se deva, talvez, a uma menor disponibilidade do VEGF livre que poderia estar ligado aos seus receptores membranares. Mas, outros ensaios deverão ser realizados para comprovar essa hipótese.

Outro mediador avaliado neste estudo foi a MMP-9. Nossa equipe já publicou dados que demonstraram níveis aumentados de MMP-9 nos pacientes na forma grave comparado àqueles na forma branda e controles sadios (Kubelka *et al*, 2010). Em ensaios *in vitro*, células dendríticas infectadas pelo DENV induziram aumento da

produção de MMP-9, assim como dos reguladores da produção das MMPs, os TIMPs. No mesmo estudo, quando o sobrenadante foi adicionado às monocamadas células endoteliais HUVECs observou-se aumento da permeabilidade que foi parcialmente inibida com adição da molécula SB-3CT, capaz de inibir especificamente a atividade de MMP-9 (Luplerdlop *et al*, 2006). Em outro modelo *in vitro*, macrófagos da linhagem U937 infectados pelo DENV-2 apresentaram aumento da secreção e expressão gênica de MMP-9 e de seu regulador TIMP-1 (Seanpong *et al*, 2015).

Talvez, os níveis mais baixos de MMP-9 em nossos pacientes possam ser explicados por uma elevação de seus reguladores como TIMP-1 e TIMP-2, como visto em ensaios *in vitro*, mas para confirmação dessa hipótese precisamos realizar as dosagens desses reguladores.

Discutir o papel potencial de cada um desses mediadores na imunopatogênese da Dengue é extremamente árduo e complexo. Seguramente, uma rede complexa de conexões entre proteínas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e seus reguladores, aliado a presença das células, intervém ativamente em todos os processos que culminam no desfecho clínico da Dengue.

Células endoteliais são bastante heterogêneas em termos de morfologia, expressão de proteínas e função. Inclusive, análises de células endoteliais microvasculares de diferentes órgãos, assim como de diferentes vasos do mesmo órgão demonstraram heterogeneidade em vários níveis (Yan *et al*, 2010). É extremamente importante entender qual é a célula endotelial próxima ao ideal para seus estudos. A maior parte dos estudos *in vitro* que avaliam as alterações da permeabilidade endotelial na Dengue utilizam células oriundas de grandes vasos, como as células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). No entanto, além dessas células apresentarem importantes diferenças funcionais e fenotípicas comparadas as células de microvasculatura, é na microcirculação que a maior parte do extravasamento plasmático ocorre na Dengue (Peyrefitte *et al*, 2006).

Estudo de Muramaki e colaboradores (2001) comparou três diferentes tipos celulares: células endoteliais glomerulares (GEC), células de microvasculatura dermal (MvE) e as HUVECs. Primeiramente, TNF- α induziu diminuição na viabilidade celular das três linhagens, enquanto que IFN- γ não alterou a viabilidade das HUVECs, mas nas GEC e MvE, reduziu significativamente a viabilidade celular.

As três linhagens celulares expressavam constitutivamente CD31/PECAM-1 e o estímulo com TNF- α ou IFN- γ por 12 horas, promoveu diminuição na expressão dessa molécula em todos os tipos celulares. A expressão de CD106/VCAM-1 foi aumentada nas HUVECs após 12 horas de cultivo com TNF- α ou IFN- γ e nas GEC, esse aumento da expressão ocorreu apenas com TNF- α , mas não com IFN- γ . Para MvE, não foram observadas diferenças entre as células estimuladas e não-estimuladas (Muramaki *et al*, 2001).

Outro trabalho comparou a expressão de CD106/VCAM-1 nas HUVECs e nas células da microvasculatura dermal humana, HDMEC. A expressão de CD106/VCAM-1 só ocorreu após adição de TNF- α nas HUVECs e se manteve, enquanto que as HDMEC apresentaram um pico transitório de expressão de CD106/VCAM-1 após 16 horas de tratamento com TNF- α (Swerlick *et al*, 1992).

Uma vez que existem diferenças intrínsecas nas células endoteliais, num mesmo modelo de estudo utilizando diferentes células é esperado resultados contraditórios. Assim, caracterizamos primeiramente as nossas células primárias HMVEC-d quanto a expressão das moléculas de interesse para, em seguida, avaliar as alterações induzidas pelo soro dos pacientes com Dengue. Como demonstrado em nossos resultados, as HMVEC-d expressam todas as moléculas avaliadas constitutivamente com maior expressão de CD31/PECAM-1 e CD147/EMMPRIN, mas menor expressão de CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1, mas o suficiente para serem consideradas bons modelos para o nosso estudo.

A ativação do endotélio está associada e precede o dano vascular. Em condições normais, a ativação do endotélio leva a alterações morfológicas e funcionais reversíveis, sem perda da integridade endotelial. Porém, em condições inflamatórias e ou infecciosas, em que há uma ativação constante pela presença de um patógeno ou pela produção aumentada de mediadores imunológicos e ou inflamatórios, as alterações no endotélio podem ser irreversíveis, levando à perda da integridade endotelial (revisado por Zhang *et al*, 2010). Baseado na literatura, escolhemos avaliar a ativação do endotélio através da expressão das moléculas de adesão CD106/VCAM-1, CD54/ICAM-1 e CD31/PECAM-1 e da indutora de MMP, a CD147/EMMPRIN. Essas proteínas, além da exercerem função na diapedese, também estão envolvidas na sinalização intracelular e transmigração de leucócitos (Ley *et al*, 2007). Não escolhemos um ou outro mediador imunológico para estudar,

mas optamos por avaliar se a adição do soro do paciente, com alguns mediadores previamente quantificados e reconhecidamente envolvidos na alteração da permeabilidade endotelial, era capaz de alterar a expressão das moléculas de adesão e da CD147/EMMPRIN nas HMVEC-d. Na tentativa de individualizar a ação de cada um desses mediadores, realizamos análises de correlação entre a expressão das moléculas de adesão e os níveis circulantes do mediador.

Como demonstrado em nossos resultados, culturas de HMVEC-d na presença de soro de pacientes por 24 horas comparada às HMVEC-d cultivadas em Meio, não alteraram a expressão de CD106/VCAM-1, CD54/ICAM-1 ou CD31/PECAM-1, mas diminuíram a expressão de CD147/EMMPRIN. Realizamos então uma segunda proposta de análise, em que foi calculada a razão entre a expressão da molécula na presença do soro sobre meio. Essa razão permitiu minimizar a variabilidade entre os dias experimentais e ainda, avaliar o quanto a molécula foi alterada, considerando 20% de alteração como parâmetro de alguma alteração. Para esse tipo de análise, comparamos os grupos FD e FDSA/Grave. A única molécula que apresentou alguma diferença estatística foi CD54/ICAM-1, que foi diminuída preferencialmente no grupo FDSA/Grave, e conseqüentemente aumentada nos FD.

A infecção direta de células endoteliais humanas EA.hy926 por 24 horas foi capaz de diminuir a expressão de CD31/PECAM-1 (Kanlaya *et al*, 2009).

Um número maior de estudos foi realizado mantendo células endoteliais em contato com sobrenadante de culturas celulares infectadas previamente pelo DENV. Neste caso, foi demonstrado que HUVECs cultivadas por 16 horas com sobrenadante de culturas de monócitos infectados, apresentavam aumento da expressão de CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 (Anderson *et al*, 1997). Este aumento estaria associado ao TNF- α presente no sobrenadante, visto que ao bloquear esta citocina, o efeito foi praticamente revertido. De forma similar, HUVECs cultivadas com mastócitos infectados pelo DENV, apresentaram também aumento da expressão de CD106/VCAM-1 e CD54/ICAM-1, bastante relacionado ao TNF- α , pois o bloqueio da citocina inibiu a expressão das moléculas de adesão (Brown *et al*, 2011). Utilizando a linhagem de células endoteliais HMEC-1, Lin e colaboradores em 2005, verificaram que anticorpos específicos para a proteína não-estrutural do vírus, NS1, ao reagirem de forma cruzada com as HMEC-1, induzem a ativação das

HMEC-1 com aumento da expressão de CD54/ICAM-1 e produção de IL-6, CXCL8/IL-8 e CCL2/MCP-1 (Lin *et al*, 2005).

Nosso estudo foi bastante baseado no trabalho de Cardier e colaboradores de 2005. Os autores cultivaram células endoteliais HMEC-1 na presença de 20% soro de pacientes na fase aguda por 18 horas, o que levou a indução da expressão de CD54/ICAM-1. Uma vez que os níveis séricos de TNF- α estavam aumentados nos pacientes, os autores pré-trataram o soro com anticorpos bloqueadores de TNF- α e mostraram que a expressão de CD54/ICAM-1 foi bem menor, indicando que em parte, esse efeito foi dependente de TNF- α (Cardier *et al*, 2005).

Assim, independente da fonte que gerou a ativação das células endoteliais, se por uma infecção direta, adição de sobrenadante de células infectadas ou soro de pacientes doentes, os trabalhos concordam de que existe um aumento da expressão das moléculas de adesão CD106/VCAM-1 e CD54/ICAM-1 nas endoteliais, diferente dos nossos dados que viram aumento da razão apenas de CD54/ICAM-1 nos pacientes FD comparado aos FDSA/Grave. Uma das explicações é que além da forma membranar, as moléculas de adesão também são encontradas na forma solúvel, e diversos estudos associaram as formas solúveis ao dano vascular tanto na Dengue, como em outras doenças infecciosas (Page *et al*, 2013). De fato, pacientes SCD apresentam níveis aumentados de CD106/VCAM-1 solúvel comparado aos pacientes FD e FHD (Koraka *et al*, 2004). Da mesma forma, pacientes FHD apresentaram níveis plasmáticos de sVCAM-1 e sICAM-1 mais elevados que os controles sadios (Cardier *et al*, 2006). Desta forma, acreditamos que os soros dos pacientes FDSA/Grave em questão, apresentam algum mediador que possa estar promovendo a clivagem de CD54/ICAM-1, o que explicaria a menor expressão desta molécula nas células endoteliais tratadas com os soros de pacientes com este quadro clínico.

Para a molécula indutora da produção de MMPs, a CD147/EMMPRIN, não existem na literatura trabalhos no contexto da Dengue. A frequência de células endoteliais expressando CD147 foi menor quando as HMVEC-d foram cultivadas na presença de soro de pacientes comparado às não tratadas. Considerando o fato de que a expressão de CD147/EMMPRIN e níveis de MMP-9 também estavam diminuídos nos pacientes, embora não tenhamos encontrado alguma correlação estatística entre as moléculas, é possível que haja uma relação causa-consequência

neste processo. Discutiremos mais tarde o envolvimento dos mediadores solúveis na expressão da molécula.

Independente de não termos observado diferenças estatísticas da expressão ou da razão da maioria das moléculas estudadas, isso entre as culturas tratadas com soro *versus* as não-tratadas e entre os grupos FD *versus* FDSA/Grave, vários dos mediadores quantificados em nosso estudo parecem interferir na expressão dessas moléculas.

Assim, níveis de CX3CL1/Fractalcina foram correlacionados diretamente, embora não estatisticamente, com a frequência de células expressando CD147/EMMPRIN. Um trabalho da literatura nos chamou atenção. CX3CL1/Fractalcina pode se apresentar sob duas formas, solúvel e membranácea, atuando como molécula de adesão (Fong *et al*, 1998). Em 2011, Butoi e colaboradores estudaram a interação de células musculares lisas e monócitos/macrófagos através de CX3CL1 e seu receptor CX3CR1, ambos expressos na membrana destas células, na aterosclerose. Esta interação induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e de maneira interessante, MMP-9. Portanto, por um determinado mecanismo CX3CL1/Fractalcina induziria expressão de CD147/EMMPRIN, que conhecidamente induz a produção de MMP-9.

Também vimos que níveis de CXCL8/IL-8 foram correlacionados inversamente com a expressão de CD31/PECAM-1. Isto é interessante pelo fato de que, diferente de CD54/ICAM-1 e CD106/VCAM-1 que ficam localizadas na superfície luminal dos vasos, CD31/PECAM-1 se localiza no espaço intercelular, interagindo com outras moléculas CD31/PECAM-1 expressas nas células endoteliais adjacentes (revisado por Ilan & Madri, 2003). Como dito anteriormente, CXCL8/IL-8 funciona como indutor do aumento da permeabilidade endotelial, induzindo reorganização do citoesqueleto de actina e alterações na expressão e distribuição de proteínas de junções intercelulares. A infecção de células endoteliais HUVEC pelo DENV induz o aumento na secreção de CXCL8/IL-8 por estas células (Huang *et al*, 2000). Desta forma, baseado em nossos dados, podemos sugerir que um dos mecanismos pelos quais CXCL8/IL-8 induz aumento na permeabilidade endotelial, é através da diminuição na expressão de CD31/PECAM-1.

Também encontramos correlação direta entre os níveis de MMP-9 e CD54/ICAM-1. Em células de linhagem HL-60 (Células humanas de leucemia

promielocíticas, do inglês *human promyelocytic leukemia cells*), MMP-9 está envolvida na clivagem de CD54/ICAM-1 da superfície e seu efeito foi confirmado pelo uso de um inibidor de MMP-9 (Fiore *et al*, 2002). Outro trabalho utilizando células endoteliais do cérebro de ratos, a RBMEC (células endoteliais da microvasculatura do cérebro de ratos, do inglês *rat brain microvascular endothelial cells*) demonstrou que o bloqueio da atividade de MMP-9 com uso de seu inibidor, diminuiu os efeitos de hiperpermeabilidade induzidos até mesmo pelo TNF- α . Além disso, os efeitos de TNF- α nas junções *tight*, na redistribuição e redução da expressão de ZO-1, também foram revertidos com o uso do inibidor de MMP-9, sugerindo que os efeitos de TNF- α na barreira endotelial podem depender, em parte, da ação de MMP-9 (Wiggins-Dohlvik *et al*, 2014). A interação TNF- α e MMP-9 foi confirmada na linhagem de células osteoblásticas murinas (MC3T3-E1), pois estaria induzindo a clivagem e liberação de CD54/ICAM-1 solúvel (Tsai *et al*, 2014).

Os níveis de CCL5/RANTES foram correlacionados diretamente com a expressão de CD106/VCAM-1 nas HMVEC-d. Um dado contraditório de nosso grupo ainda não publicado, é que vimos em uma coorte de pacientes DENV-4 correlação direta entre os níveis de CCL5/RANTES e as medidas do TEER, ou seja, níveis altos de CCL5/RANTES manteriam a integridade das monocamadas de células endoteliais HMVEC-d. Como estamos usando uma coorte de pacientes preferencialmente infectados pelo DENV-4 com uma clínica bastante favorável ao paciente, esses efeitos de ativação e alteração da permeabilidade acontecem, mas não são efeitos suficientes para promover um extravasamento plasmático importante e por isso, o entendimento dos dados não está bem claro. Estamos trabalhando com uma nova coorte de pacientes, inclusive com um maior número de pacientes Graves na tentativa de esclarecer melhor esse mecanismo.

É perfeitamente aceitável que a ativação do endotélio e modulação da expressão de moléculas de adesão não são mecanismos influenciados apenas por um mediador, mas por um conjunto deles. Proteínas virais, como a NS1, já foram demonstradas como atuantes deste processo. Um dos mecanismos propostos é a reação cruzada dos anticorpos específicos para a NS1 do DENV com plaquetas e células endoteliais, induzindo a secreção de mediadores inflamatórios como IL-6, CXCL8/IL-8 e CCL2/MCP-1, que ativam o endotélio e consequentemente aumentam a permeabilidade vascular. Os anticorpos anti-NS1 também podem se ligar a NS1 presente na membrana das células endoteliais e induzir a via de ativação do

complemento, que culminará com a formação do complexo de ataque à membrana, levando a morte das células endoteliais.

Além disso, estudos visando verificar o efeito de mediadores solúveis na permeabilidade vascular demonstraram que, por exemplo, a histamina e trombina promovem um aumento rápido e facilmente reversível da permeabilidade endotelial. No entanto, para o mesmo efeito mediado pelas citocinas, eram necessárias horas de cultura e o efeito era mantido por no máximo 48 horas (revisado por Dejana *et al*, 2008). Assim, entender o efeito de mediadores séricos na monocamada das HMVEC-d requer uma cinética maior e até a utilização de mais de uma metodologia para melhor compreender o processo.

Os dados obtidos nesse estudo confirmaram parâmetros laboratoriais associados ao prognóstico clínico da Dengue, como as contagens de plaquetas e leucócitos e os níveis de transaminases AST/TGO e ALT/TGP. Corroboramos dados anteriores de que pacientes infectados pelo DENV apresentam níveis elevados de TNF- α , CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8. Não vimos uma diferença importante em CCL5/RANTES, também bem similar aos dados publicados. Pela primeira vez, vimos altos níveis de CX3CL1/Fractalcina em pacientes com Dengue. Contradizendo a maior parte dos dados da literatura, VEGF e MMP-9 estavam baixos em nossos pacientes. De forma modesta, a presença de soro contendo esses mediadores modulou a expressão de CD147/EMMPRIN e soro de pacientes FDSA/Graves induziu uma diminuição mais acentuada de CD54/ICAM-1 nas HMVEC-d. Inferimos a ação individual da ação de alguns dos mediadores na expressão das moléculas por análises de correlação, que nos indicaram interações como CX3CL1/Fractalcina e CD147/EMMPRIN, CXCL8/IL-8 e CD31/PECAM-1, CCL5/RANTES e CD106/VCAM-1 e por fim, MMP-9 e CD54/ICAM-1.

7. CONCLUSÃO

- As contagens de plaquetas e leucócitos e níveis de transaminases hepáticas AST/TGO e ALT/TGP são indicadores importantes de prognóstico clínico da Dengue.
- Os pacientes infectados pelo DENV, independente da gravidade clínica, apresentaram níveis séricos aumentados de TNF- α , CCL2/MCP-1 e, CXCL8/IL-8, mas não de CCL5/RANTES, comparado aos Controles.
- Dado original de nosso trabalho demonstrou aumento dos níveis séricos de CX3CL1/Fractalcina em pacientes infectados pelo DENV, independente da gravidade clínica, comparado aos Controles.
- Os pacientes apresentaram níveis plasmáticos diminuídos de VEGF e MMP-9, independente da forma clínica e da apresentação de manifestações hemorrágicas, comparado aos Controles.
- As células endoteliais da microvasculatura dermal de adultos, as HMVEC-d, expressam constitutivamente CD31/PECAM-1, CD54/ICAM-1, CD106/VCAM-1 e CD147/EMMPRIN.
- O cultivo das HMVEC-d com 20% de soro de pacientes por 24 horas, não alterou a viabilidade das células.
- O cultivo das HMVEC-d com o soro de pacientes induziu diminuição no percentual de células expressando CD147/EMMPRIN, comparado às HMVEC-d cultivadas em Meio.
- O cultivo das HMVEC-d com soro de pacientes FDSA/Graves induziu uma diminuição mais acentuada da expressão de CD54/ICAM-1 comparada às HMVEC-d cultivadas com soro de pacientes FD.
- CX3CL1/Fractalcina, CXCL8/IL-8, MMP-9 e CCL5/RANTES parecem modular a expressão de CD147, CD31, CD54 e CD106, respectivamente.

8. PERSPECTIVAS

- Incrementar o número de experimentos de co-cultura das HMVEC-d com soro de pacientes, incorporando um maior quantitativo de soros de pacientes Graves e de Controles sadios.
- Realizar uma cinética e avaliar outros marcadores de ativação endotelial, como CD62E e Receptores de Quimiocinas, nos ensaios de co-cultura HMVEC-d e soro de pacientes.
- Dosar os níveis das moléculas de adesão solúveis, como sICAM-1 e sVCAM-1, e de inibidores da MMP, como os TIMP-1 e TIMP-2, no soro/plasma dos pacientes e nos sobrenadantes das culturas de HMVEC-d.
- Utilizar as metodologias de Imunohistoquímica e Microscopia para avaliar as HMVEC-d tratadas com soro de pacientes quanto à sua morfologia e alteração no citoesqueleto de actina e nas proteínas de junção intercelular ocludina, ZO-1, VE-caderina e β -catenina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, R., Elbishbishi, E.A., Chaturvedi, U.C., *et al.* **Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever.** *Int. J. Exp. Pathol.* 80(3): 143-149. 1999.
- AGRAWAL, S.M., YONG, V.W. **The many faces of EMMPRIN—Roles in neuroinflammation.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1812(2): 213-219. 2011.
- ALLINGHAM, M.J., van Bull, J.D., Burridge, K. **ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascularendothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration.** *J. Immunol.* 179(6): 4053-4064. 2007.
- ANDERS, K.L., Nquyet, N.M., Chau, N.V., *et al.* **Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City.** *Am J Trop Med Hyg.* 84(1):127-134. 2011.
- ANDERSON, R., Wang, S., Osioy, C., *et al.* **Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes.** *Journal of Virology.* 71(6): 4226-4232. 1997.
- ANGELINI, D.J., Hyun, S.W., Grigoryev, D.N, *et al.* **TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291(6): L1232-L1245. 2006.
- APPANNA, R., Wang, S.M., Ponnampalavanar, S.A., *et al.* **Cytokine factors present in dengue patient sera induces alterations of junctional protein in human endothelial cells.** *Am J Trop Med Hyg.* 87(5): 936-942. 2012.
- APPAY, V., ROWNLAND-JONES, S.L. **RANTES: a versatile and controversial chemokine.** *Trends Immunol.* 22(2): 83-87. 2001.
- ARORA, K., Gwinn, W.M., Bower, M.A., *et al.* **Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses.** *J. Immunol.* 175(1): 517-522. 2005.
- AVIRUTNAN, P., Malasit, P., Seliger, B., *et al.* **Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokines production, complemente activation, and apoptosis.** *J Immunol.* 161(1): 6338-6346. 1998.
- AZEREDO, E.L. **Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever.** *Immunobiology.* 204(4): 494-507. 2001.
- AZEREDO, E.L., Monteiro, R.Q., de-Oliveira-Pinto, L.M. **Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators.** *Mediators Inflamm.* 2015:313842. 2015.
- AZEREDO, E.L., Neves-Souza, P.C., Alvarenga, A.R., *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.** *Immunobiology.* 130(2): 202-216. 2010.
- AZEREDO, E.L., Zagne, S.M., Santiago, M.A., *et al.* **Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever.** *Immunobiology.* 204(4): 494-507. 2001.
- BARNIOL J., Gaczkowski, R., Barbato, E.V., *et al.* **Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries.** *BMC infectious diseases.* 2011.
- BARRETO, M.L., Teixeira, M.G. **Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa.** *Estudos avançados.* 22(64):53-72. 2008.

- BASU, A., Chaturvedi, U.C. **Vascular endothelium: the battlefield of dengue viroses.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 53(3): 287-299. 2008.
- BAZZONI, G., DEJANA, E. **Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis.** *Physiol. Ver.* 84(3): 869-901. 2004.
- BENSON, H. L., Mobashery, S., Chang, M., et al. **Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4+ and CD8+ T cells.** *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 44(5): 700-708. 2011.
- BERDITCHEVSKI, F., Chang, S., Bodorova, J., Hemler, M.E. **Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6.** *J. Biol. Chem.* 272(46): 29174-29180. 1997.
- BOZZA, F. A, Cruz, O. G., Zagne, S. M. et al. **Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity.** *BMC Infect Dis.* 8:86. 2008.
- BRASIER, A.R., Ju, H., Garcia, J., et al. **A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86(2): 341-348. 2012.
- BREW, K., Nagasee, H. **The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS): an ancient family with structural and functional diversity.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1803(1): 55-71. 2010.
- BREW, K., Dinakarbandian, D., Nagase, H. **Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1477(1-2): 267-283. 2000.
- BROWN, M.G., Hermann, L.L., Issekutz, A.C., et al. **Dengue virus infection of mast cells triggers endothelial cell activation.** *Journal of Virology.* 85(2): 1145-1150. 2011.
- BUTOI, E.D., Gan, A.M., Manduteanu, I., **Cross talk between smooth muscle cells and monocytes/activated monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression. Of pro-atherogenic molecules.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1813: 2026-2035. 2011.
- BUTTHEP, P., Chunhakan, S., Yoksan, S. et al. **Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever.** *Pediatr Infect Dis J.* 31(12):e232-8. 2012.
- CAO, X.T., Ngo, T.N., Kneen, R., et al. **Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Vietnam.** *Trop. Med. Int. Health.* 7(2):125-132. 2002.
- CARDIER, J. E., Mariño, E., Romano, E. et al. **Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue.** *Cytokine.* 30(6):359-65. 2005.
- CARDIER, J.E, Rivas, B., Romano, E., et al. **Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells.** *Endothelium.* 13: 355-340. 2006.
- CARDOZO, D.M., Moliterno, R.A., Sell, A.M., et al. **Evidence of HLA-DQB1 Contribution to Susceptibility of Dengue Serotype 3 in Dengue Patients in Southern Brazil.** *J Trop Med.* 2014.
- FANG, S., Wu, Y., Wu, N., et al. **Recent Advances in DENV Receptors.** *Scientific World Journal.* 2013. 2013.
- CHATURVEDI, U.C., Elbishbishi, E.A., Agarwal, R., et al. **Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures.** *J. Med. Virol.* 59(3): 335-340. 1999.

- CHAU, T.N., Quyen, N.T., Thuy, T.T., *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.* 198(4): 516-524. 2008.
- CHEN, J. P., Lu, H. L., Lai, S. L. *et al.* **Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate.** *J Immunol.* 177(5):3185-92. 2006.
- CHEN, L.C. **Correlation of sérum levels of macrophage migration inhibitory fator with disease severity and clinical outcome in dengue patients.** *Am J Trop Med Hyg.* 74(1): 142-147. 2006.
- CHEN, Y.C., Wang, S.Y. **Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue vírus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide.** *J Virol.* 76(19): 9877-9887. 2002.
- CHENG, H.J., Lei, H.Y., Lin, C.F. **Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation.** *Mollecular Immunology.* 47: 398-406. 2009.
- CHUANG, Y.C., Ley, H.C., Lius, H.S., *et al.* **Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability.** *Cytokine.* 54(2): 222-231. 2011.
- CIPITELLI, M.C. **Efeito das quimiocinas na alteração da permeabilidade de células endoteliais na dengue.** 105 páginas. Dissertação – Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Dezembro de 2014.
- COMMINS, S.P., Borish, L., Steinke, J.W. **Immunologic Messenger molecules: cytokines, interferons and chemokines.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 125(2 suppl 2): S53-S72. 2010.
- COSTA, V.V., Fagundes, C.T., Souza, D.G., Teixeira, M.M. **Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction.** *Am. J. Pathol.* 182(6): 1950-1961. 2013.
- DEJANA, E. **Endothelial cell-cell junctions: happy together.** *Nat. Ver. Mol. Cell. Biol.* 5(4): 261-270. 2004.
- DEJANA, E., Orsenigo, F., Lampugnani, M.G. **The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability.** *J. Cell. Sci.* 121(pt 13): 2115-2122. 2008.
- DELEON-PENNELL, K.Y., Altara, R., Yabluchanskiy, A., *et al.* **The circular relationship between Matrix Metalloproteinase -9 and inflammation following myocardial infarction.** *IUBMB Life.* 67(8): 611-618. 2015.
- de-OLIVEIRA-PINTO, L.M., Marinho C.F., Povia T.F., *et al.* **Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever.** *PloS one.* 7(7): e38527. 2012.
- de-OLIVEIRA-PINTO, L.M., Gandini M., Freitas L.P., *et al.* **Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1beta and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 107(1) :48-56. 2012.
- de-OLIVEIRA-PINTO, L.M., S.A., Braga, E.L., *et al.* **Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(3): 387-394. 1999.

- DEWI, B.E., Takasaki, T., Kurane, I. ***in vitro* assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection.** *J Biol Methods*. 121(2): 171-180. 2004.
- DUSTIN, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., *et al.* **Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1).** *J Immunol*. 137: 245-254. 1986.
- DVORAK, A.M., FENG, D. **The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle.** *J. Histochem. Cytochem.* 49(4): 419-432. 2001.
- ESSER, S., Lampugnani, M.G., Corada, M., *et al.* **Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells.** *J. Cell. Sci.* 111(pt 13): 1853-1865. 1998.
- FARIA, N. R., Nogueira, R. M., de Filippis, A. M. *et al.* **Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010.** *PLoS Negl Trop Dis*. 7(3):e2095. 2013.
- FIORE, E., Fusco, C., Romero, P., Stamenkovic, I. **Matrix metalloproteinase 9 (MMP9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity.** *Oncogene*. 21(34): 5213-5223. 2002.
- FONG, A.M., Robinson, L.A., Steeber, D.A., *et al.* **Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow.** *J. Exp. Med.* 188: 1413–1419. 1998.
- FRANTZ, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M. **The extracellular matrix at a glance.** *J. Cell. Sci.* 123(pt 24): 4195-4200. 2010.
- FRIED, J. R., Gibbons, R. V., Kalayanarooj, S. *et al.* **Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006.** *PLoS Negl Trop Dis*. 4(3):e617. 2010.
- GAMBLE, J., Bethell, D., Day, N.P., *et al.* **Age-related changes in microvascular permeability: A significant factor in the susceptibility of children to shock?** *Clin Sci (Lond)*. 98(2):211-216. 2000.
- GAN, V.C., Lye, D.C., Thein, T.L. **Implications of discordance in World Health organization 1997 and 2009 dengue classifications in adult dengue.** *Plos One*. 8(4): e60946. 2013.
- GARTON, K.J., Gough, P.J., Philalay, J., *et al.* **Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (vcam-1) is mediated by tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM 17).** *J. Biol. Chem.* 278(39): 37459-37464. 2003.
- GAVARD, J., GUTKIND, J.S. **VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin.** *Nat. Cell. Biol.* 8(11): 1223-1234. 2006.
- GIALEI, C., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K. **Roles of Matrix Metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting.** *FEBS J*. 278(1): 16-27. 2011.
- GILLE, H., Kowalski, J., Li, B., *et al.* **Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants.** *J Biol Chem*. 276: 3222-3230. 2001.
- GLEISSNER, C.A., von Hundelshausen, P., Ley, K. **Platelet chemokines in vascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28(11):1920-7. 2008.

- GODDARD, L.M., IRUELA-ARISPE, M.L. **Cellular and molecular regulation of vascular permeability.** *Thromb. Haemost.* 109(3): 407-415. 2013.
- GREEN, A.M., Bealty, P.R., Hadjilaou, A., Harris, E. **Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses.** *J. Mol. Biol.* 426(6):1148-1160. 2013.
- GREEN, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., *et al.* **Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity.** *J. Infect. Dis.* 1999.
- GUBLER, D.J. **Aedes aegypti and Aedes aegypti-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up.** *Am J Trop Med Hyg.* 40(6): 571-578. 1989.
- GUBLER, D.J. **Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever as public health, social and economic problem in the 21st century.** *Trends Microbiol.* 10(2): 100-103. 2002.
- GUBLER, D.J. **Dengue and dengue haemorrhagic fever.** *Clinical Microbiology Reviews.* 11(3):480-496. 1998.
- GUNZEL, D., YU, A.S. **Claudins and the modulation of tight junction permeability.** *Physiol. Rev.* 93(2): 525-569. 2013.
- GUTSCHE, I., Coulibaly, F., Voss, J.E., *et al.* **Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 8003–8008. 2011.
- GUZMAN, M.G., Harris, E. **Dengue.** *Lancet.* 385(9966):453-465. 2015.
- GUZMAN, M.G., Kouri, G. **Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007).** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102(6):522-523. 2008.
- HALSTEAD, S.B. **Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viroses.** *Adv. Virus. Res.* 60: 421-467. 2003.
- HALSTEAD, S.B. **Dengue.** *Lancet.* 370(9599): 1644-1652. 2007.
- HALSTEAD, S.B., O'ROURKE, E.J. **Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody.** *J. Exp. Med.* 146(1): 201-217. 1977.
- HALSTEAD, S.B., Streit, T.G., Lafontant, J.G., *et al.* **Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission.** *Am J Trop Med Hyg.* 65(3):180-183. 2001.
- HAHN, J.N., Kaushik, D.K. e Yong, V.W. **The role of EMMPRIN in T cell biology and immunological diseases.** *Journal of Leukocyte biology.* 98: 33-48. 2015.
- HERRERO, L.J., Zakhary, A., Gahan, M.E. *et al.* **Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis.** *Pharmacol. Ther.* 137(2):266-282. 2013.
- HERTER, J., ZARBOCK, A. **Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment.** *J. Immunol.* 190(9): 4451-4457. 2013.
- HIRASE, T., Staddon, J.M., Saitou, M., *et al.* **Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells.** *J Cell Sci.* 110(pt 14): 1603-1613. 1997.
- HIXENBAUGH, E.A., Goeckeler, Z.M., Papaiya, N.N., *et al.* **Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells.** *Am. J. Physiol.* 273(2pt 2): H981-988. 1997.
- HU, Y.J., Wang, Y.D. e Tan, F.Q. **Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms.** *Mol Biol. Rep.* 40: 6123-6142. 2013.

- HUANG, Y.H., Lei, H.Y., Liu, H.S., *et al.* **Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63(1-2): 71-75. 2000.
- ILAN, N. e MADRI, J.A. **PECAM-1: old friend, new partners.** *Curr Opin Cell Biol.* 15: 515-524. 2003.
- ITHA, S., Kashyap R., Krishnani, N., *et al.* **Profile of liver involvement in dengue virus infection.** *The National medical journal of India.* 18(3):127-30. 2005.
- JAMEEL, T., Mehmood, K., Mujtaba, G. *et al.* **Changing haematological parameters in dengue viral infections.** *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 24(1):3-6. 2012.
- JEEWANDARA, C., Gomes, L., Wickramasinghe, N., *et al.* **Platelet activation factor contributes to vascular leak in acute dengue infection.** *PLoS Negl Trop Dis.* 9(2): e0003459. 2015.
- JOGHETAEL, N., Stein, A., Byrne, R.A *et al.* **The Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN, CD147) – a potente novel target in atherothrombosis prevention?.** *Thrombosis Research.* 131: 474-480. 2013.
- JONES, M., *et al.* **Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression.** *J Virol.* 79(9): 5414-5420. 2005.
- KALAYANAROOJ, S., Vaughn, D.W., Nimmannitya, S., *et al.* **Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness.** *J Infect Dis.* 176(2):313-321. 1997.
- KANLAYA, R., Pattanakitsakul, S.N., Sinchaikul, S., *et al.* **Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration.** *J Proteome Res.* 8(5): 2551-2562. 2009.
- KELLEY, J.F., Kaufusi, P.H., Nerurkar, V.R. **Dengue hemorrhagic fever-associated immunomediators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability.** *Virology.* 422(2): 326-337. 2012.
- KENDALL, R.L., Wang, G., Thomas, K.A. **Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR.** *Biochem Biophys Res Commun.* 226: 324-328. 1996.
- KESSENBROCK, K., Plaks, V., Werb, Z. **Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.** *Cell.* 141(1): 52-67. 2010.
- KHONGPHATTHANAYOTHIN, A., Phumaphuti, P., Thongchaiprasit, K., Poovorawan, Y. **Serum levels of sICAM-1 and sE-selectin in patients with dengue virus infection.** *Jpn. J. Infect. Dis.* 59(3): 186-188. 2006.
- KORAKA, P., Murque, B., Deparis, X., *et al.* **Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity.** *J Med Virol.* 72(3). 2004.
- KOURI, G.P., Guzmán, M.G., Bravo, J.R., Triana, C. **Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic.** *Bull World Health Organ.* 67(4):375-380. 1989.
- KUBELKA, C.F., Azeredo, E.L., de-Oliveira-Pinto, L.M., *et al.* **Metalloproteinases are produced during dengue fever and MMP-9 is associated with severity.** *J. Infect.* 61(6):501-505. 2010.
- KUMAR, Y., Liang, C., Bo, Z. *et al.* **Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF.** *PLoS Negl Trop Dis.* 6(11):e1887. 2012.

- KURANE, I., Innis, B.L., Nimmannitya, S., *et al.* **Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2 and interferon-gamma in sera of children with dengue.** *J. Clin. Invest.* 88(5): 1473-1480. 1991.
- LAUR, F. **Plasma levels of tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92(6): 654-656. 1998.
- LAUR, F., Murgue, B., Deparis, X., *et al.* **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.* 92: 651-656. 1998.
- LEE, Y.R., Liu, M.T., Lei, H.Y., *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.* 87(pt 2): 3623-3630. 2006.
- LEE, L. K., Gan, V. C., Lee, V. J. *et al.* **Clinical relevance and discriminatory value of elevated liver aminotransferase levels for dengue severity.** *PLoS Negl Trop Dis.* 6(6): e1676. 2012.
- LEY, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S. **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.** *Nat. Rev. Immunol.* 7(9): 678-689. 2007.
- LIM, S.P., Noble, C.G. e Shi, P.Y. **The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery.** *Antiviral Research.* 2015.
- LIMONTA, D., Capó, V., Torres, G., *et al.* **Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome.** *J Clin Virol.* 40(1): 50-54. 2007.
- LIMONTA, D., Torrentes-Carvalho, A., Marinho, C.F., *et al.* **Apoptotic mediators in patients with severe and non-severe dengue from Brazil.** *J Med Virol.* 86(8): 1437-1447. 2014.
- LIN, Y.L., Lius, C.C., Chuang, J.I., *et al.* **Involvement of oxidative stress, NF-IL-6 and RANTES expression. In dengue-2-virus-infected human liver cells.** *Virology.* 276(1): 114-126. 2000.
- LIN, C.F., Lei, H.Y., Shiau, A.L., *et al.* **Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide.** *J. Immunol.* 169(2): 657-664. 2002.
- LIN, C.F., Lei, H.Y., Shiau, A.L., *et al.* **Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage.** *J. Med. Virol.* 69(1): 82-90. 2003.
- LIN, Y.S., Yeh T.M., Lin C.F., *et al.* **Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis.** *Exp Biol Med.* 236(5):515-23. 2011.
- LIN, C.F., Chiu, S.C., Hsiao, Y.L., *et al.* **Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1.** *Journal of Immunology.* 174: 395-403. 2005.
- LOHR, K.M., Kusth, C.A., Xie, D.L., *et al.* **The amino-terminal 29- and 72-Kd fragments of fibronectin mediate selective monocyte recruitment.** *Blood.* 76(10): 2117-2124. 1990.
- LUO, D., Vasudevan, S., Lescar, J. **The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development.** *Antiviral Research.* 2015.
- LUPLERDLOP, N., Missé, D., Bray, D., *et al.* **Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction.** *EMBO Reports.* 7(11):1176-1181. 2006.

- MAGIONE, J.N., Huy, N.T., Lan, N.T., *et al.* **The association of cytokines with severe dengue in children.** *Trop Med Health.* 42(4): 137-144. 2014.
- MALAVIGE, G., Fernando, S., Fernando, D., Seneviratne, S. **Dengue viral infections.** *Postgrad. Med. J.* 80(948): 588-601. 2004.
- MALAVIGE, G. N., Jeewandara, C., Alles, K. M. *et al.* **Suppression of virus specific immune responses by IL-10 in acute dengue infection.** *PLoS Negl Trop Dis.* 7(9):e2409. 2013.
- MANGADA, M.M, ROTHMAN, A.L. **Altered cytokine responses of dengue specific CD4+ T cells to heterologous serotypes.** *J Immunol.* 175(4):2676-2683. 2005.
- MANGIONE, J.N.A., Huy, N.T., Lan, N.T.P., *et al.* **The association of cytokines with severe dengue in children.** 42(4): 137-144. 2014.
- MEHTA, D., MALIK, A.B. **Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability.** *Physiol. Rev.* 86(1):279-367. 2006.
- MICHELS, M., van der Vem, A.J.A.M., Djamiatun, K., *et al.* **Imbalance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in severe dengue and relationship with thrombocytopenia, endothelial activation and vascular stability.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87(5): 943-946. 2012.
- Ministério da Saúde. **Dengue: Diagnóstico e Manejo clínico. Adulto e criança.** 5º edição. 2016.
- Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da Dengue.** 2014.
- Ministério da Saúde - Portal Saúde, 2015.
- Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico. Volume 47. n. 8.** 2016
- MONGKOLSAPAYA, J., Dejnirattisai, W., Xu, X.N., *et al.* **Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever.** *Nat Med.* 9(7):921-927. 2003.
- MONGKOLSAPAYA, J., Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., *et al.* **T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal?** *J Immunol.* 176(6):3821-3829. 2006.
- MULLER, W.A. **Mechanisms of leukocyte transendothelial migration.** *Annu. Rev. Pathol.* 6:323-344. 2011.
- MULLER, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., Phillips, D.M. **PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes.** *J. Exp. Med.* 178(2): 449-460. 1993.
- MURAKAMI, S., Morioka, T., Nakagawa, Y., *et al.* **Expression of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: Comparison to human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells.** *Microvasc Res.* 62: 383–391. 2001.
- MURGUE, B., Cassar, O., Deparis, X. **Plasma concentrations of svcam-1 and severity of dengue infections.** *Journal of Medical Virology.* 65:97-104. 2001.
- MURPHY, B.R., Whitehead, S.S. **Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine.** *Annu. Rev. Immunol.* 29:587-619. 2011.
- NGUYEN, T.H. **Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles.** *J Infect Dis.* 189(2): 221-232. 2004.
- NORMILE, Dennis. **Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts.** *Science.* 342:415. 2013.

- OMS (WHO). **Dengue: Guidelines for Diagnosis, treatment, prevention and control.** New edition: 160. 2009.
- OMS (WHO). **Dengue and severe dengue.** Fact Sheet nº117. 2015.
- ONG, S.P., Lee, L.M., Leong, Y.F., *et al.* **Dengue virus infection mediates HMGB1 release from monocytes involving PCAF acetylase complex and unduces vascular Irakage in endothelial cells.** *PLos One.* 7(7): e41932. 2012.
- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. 2008-2016.
- OSANAI, C.H., Rosa, A.P., Tang, A.T., *et al.* **Surto de dengue em Boa Vista, Roraima.** *Ver Inst Med Trop São Paulo.* 25(1): 53-54. 1983.
- PAGE, A.V., LILES, W.C. **Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases.** *Virulence.* 4(6): 507-516. 2013.
- PANG, T., Cardosa, M.J., e Guzman, M.G. **Of cascades and perfect storms: syndrome (DHF/DSS).** *Immunol Cell Biol.* 85(1): 43-45. 2007.
- PEYREFITTE, C.N., Pastorino, B., Grau, G.E., *et al.* **Dengue vírus infection of human microvascular endotelial cells from diferente vascular beds promotes both common and specific funcional changes.** *Journal of Medical Virology.* 78: 229-242. 2006.
- PIERSON, T.C., DIAMOND, M.S. **Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses.** *Curr Opin Virol.* 2(2): 168-175. 2012.
- PÓVOA, T.F., Alves, A.M.B., Oliveira, C.A.B., *et al.* **The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: Histopathology, ultrastructure and vírus replication.** *Plos One.* 9(4): e83386. 2014.
- PRIES, A.R., KUEBLER, W.M. **Normal endothelium.** *Handb. Exp. Pharrmmacol.* 176 pt 1: 1-40. 2006.
- PRIYADARSHINI, D., Gadia, R.R., Tripathy, A., *et al.* **Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility based study.** *Plos One.* 5(1): e8709. 2010.
- PUERTA-GUARDO, H., Raya-Sandino, A., González-Mariscal, L., *et al.* **The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability.** *J Virol.* 87(13):7486-7501. 2013.
- RACHMAN, A., RINALDI, I. **Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6.** *Acta, Med. Indones.* 38(2): 105-108. 2006.
- RAGHUPATHY, R., Chaturvedi, U.C., Al-Sayer, H., *et al.* **Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever.** *J. Med. Virol.* 56(3): 280-285. 1998.
- RATHAKRISHNAN, A., Wang S.M., Hu Y., *et al.* **Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness.** *PloS one.* 7(12): e52215. 2012.
- REILLY, P.L., Woska, J.R. Jr., Jeanfavre, D.D., *et al.* **The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1.** *J. Immunol.* 155(2): 529-532. 1995.
- REMY, M.M. **Dengue fever: theories of immunopathogenesis and challenges for vaccination.** *Inflamm Allergy Drug Targets.* 13(4):262-274. 2014.
- ROJAS, H., Ritter, C., Pizzol, F.D. **Mchanisms of dysfunction of the bloog-brain barrier in critically ill patients: emphasis on the role of matriz melloproteinases.** *Rev Bras Ter Intensiva.* 23(2): 222-227. 2011.

- ROSEN, L. **The emperor's new clothes revisited, or reflections on the dengue haemorrhagic fever.** *Am J Trop Med Hyg.* 26:237-343. 1977.
- ROTHMAN, A.L. **Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms.** *Nat. Rev. Immunol.* 11(8):532-543. 2011.
- SAMESHIMA, T., Nabeshima, K., Toole, B.P., *et al.* **Gliomacell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activatedgelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts.** *Cancer Lett.* 157(2): 177-184. 2000.
- SANGKAWIBHA, N., Rojanasuphot, S., Ahandrik, S. *et al.* **Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak.** *Am J Epidemiol.* 120(5):653-69. 1984.
- SCHATZMAYR, H.G., Nogueira, R.M.R., Rosa, A.P.A.T. **An outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro -1986.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 81(2): 245-246. 1986.
- SCHMIDT, R., Bultmann, A., Fischel, S., *et al.* **Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes.** *Circ. Res.* 102: 302-309. 2008.
- SEANPONG, P, Srisaowakarn, C., Thammaporn, A., *et al.* **Different responses in MMP/TIMP expression. Of U937 and HepG2 Cells to dengue vírus infection.** *Jpn. J. Infect. Dis.*68: 221-229. 2015.
- Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. **Guia de vigilância epidemiológica. CID 10: A90 caderno 9.**
- SEET, R.C., Chow, A.W., Quek, A.M., *et al.* **Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in adults with dengue vírus infection: a case control study.** *Int. J. Infect, Dis.* 13(5): e248-e253. 2009.
- SHAW, S.K., Ma, S., Kim, M.B., *et al.* **Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration.** *J. Exp. Med.* 200(12): 1571-1580. 2004.
- SHELDON, R., Moy, A., Lindsley, K., *et al.* **Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction.** *Am. J. Physiol.* 265 (6 pt 1): L606-L612. 1993.
- SILVA, A.M., Wilder-Smith, A., Guzman, M. **Recent advances in understanding dengue.** *F1000 Research.* 5(F1000 Faculty Rev): 78. 2016.
- SILVA, J.S., Mariano, Z.F., Scopel, I.**The Dengue Fever in Brazil and combat dengue fever to the aedes aegypti: of the try eradication toi control policies.** *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde.* 3(6): 163-175. 2008.
- SINGH, D., Srivastava, S.K., Chaudhuri, T.K., *et al.* **Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs).** *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2(19): 1-5. 2015.
- SOMNUKE, P., Hauhart, R.E., Atkinson, J.P., *et al.* **N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement.** *Virology.* 413: 253–264. 2011.
- SRIKIATKHACHORN, A., Rothman, A.L., Gibbons, R.V., *et al.* **Dengue--how best to classify it. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases.** *Clin. Infect. Dis.* 53(6):563-567. 2011.
- SRIKIATKHACHORN, A., Krautrachue, A., Ratanaprakarn, W., *et al.* **Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study.** *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26(4):283-290. 2007.

- SRIKIATKHACHORN, A., Kelley, J.F. **Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever.** *Antiviral Res.* 109:160-170. 2014.
- SRIKIATKHACHORN, A., Ajariyakhajorn, C., Endy, T.P., *et al.* **Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever.** *J Virol.* 81: 1592-1600. 2007.
- ST. JOHN, A.L., Rathore, A.P.S., Raghavan, B., *et al.* **Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase to dengue virus-induced vascular leakage.** *eLife.* 2. 2013.
- ST. JOHN, A.L., Rathore, A.P.S., Yap, H. **Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance.** *PNAS.* 108(22): 9190-9195. 2011.
- STAMATOVIC, S.M., Keep, R.F., Kunkel, S.L. e Andjelkovic, A.V. **Potential role od MCP-1in endotelial cell tight junction opening: signaling via Rho and Rho kinase.** *J. Cell. Sci.* 116(pt 2): 4615-4628. 2003.
- STEPHENS, H.A., Klaythong, R., Sirikong, M. *et al.* **HLA allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais.** *Tissue Antigens.* 60: 309-3018. 2002.
- STEVENS, T., Garcia, J.G., Shasby, D.M., *et al.* **Mechanisms regulating endothelial barrier function.** *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 279(3): L419-L422. 2000.
- SUAYA, J.A., Shepard, D.S., Siqueira, J.B., *et al.* **Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study.** *AM J Trop Med Hyg.* 80(5): 846-855. 2009.
- SUHARTI, C., van Gorp, E.C., Stitati, T.E., *et al.* **The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome.** *Thromb. Haemost.*87(1): 42-46. 2002.
- SUKRITI, S., Tauseef, M., Yazbeck, P., Mehta, D. **Mechanisms regulating endothelial permeability.** *Pulm Circ.* 4(4): 535-551. 2014.
- SWERLICK, R.A., Lee, K.H., Sepp, N.T., *et al.* **Regulation of vascular adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endotelial cells.** *J. Immunol.* 149(2): 698-705. 1992.
- TALAVERA, D., Castillo, A.M., Dominguez, M.C., *et al.* **IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers.** *J. Gen. Virol.* 85(pt 7): 1801-1813. 2004.
- TANG, W., HEMLER, M.E. **Caveolin-1 regulates matrixmetalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering.** *J. Biol. Chem.* 279(12): 11112-11118. 2004.
- TEIXEIRA, M.G., Barreto, L.B., Guerra, Z. **Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue.** *Informe epidemiológico do SUS.* 8(4):5-33. 1999.
- THAKUR, P., Chakravarti, A., Aggarwal, S., *et al.* **Elevated levels of vascular endothelial growth fator in adults with severe dengue infection.** *Virus Dis.* 2016.
- THOMAS, S.J., ROTHMAN, A.L. **Trials and tribulations on the path to developing a dengue vaccine.** *Am J Prev Med.* 49(6S4): s334-s344. 2015.
- THOMAS, L., Najioullah, F., Besnier, F. *et al.* **Clinical presentation of dengue by serotype and year of epidemic in Martinique.** *Am J Trop Med Hyg.* 91(4):862. 2014.
- ROY, A., Sarkar, D., Chakraborty, S. *et al.* **Profile of hepatic involvement by dengue virus in dengue infected children.** *N Am J Med Sci.* 5(8):480-5. 2013.

- TISONCIK, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P. *et al.* **Into the eye of the cytokine storm.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(1):16-32. 2012. Review.
- TONG, S., Neboori, H.J., Tran, E.D., *et al.* **Constitutive expression. And enzymatic cleavage of ficam-1 in the spontaneously hypertensive rat.** *J. Vasc. Res.* 48(5): 386-396. 2011.
- TORRENTES-CARVALHO, A., Azeredo, E.L., Reis, S.R., *et al.* **Dengue-2 infection and induction of apoptosis in human primary monocytes.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(8): 1091-1099. 2009.
- TORRENTES-CARVALHO, A., Marinho, C.F., de-Oliveira-Pinto, L.M., *et al.* **Regulation of T Lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue.** *Immunobiology.* 219(5): 329-340. 2014.
- TORRES, E.M. **Dengue.** *Estudos Avançados.* 22(64): 33-52. 2008.
- TUROWSKI, P., Martinelli, R., Crawford, R., *et al.* **Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration.** *J. Cell. Sci.* 121(pt 1): 29-37. 2008.
- TSAI, C.L., Chen, W.C., Hsieh, H.L., *et al.* **TNF- α induces matrix metalloproteinase-9-dependent soluble intercellular adhesion molecule-1 release via TRAF2-mediated MAPKs and NF- κ B activation in osteoblastic-like MC3T3-E1 cells.** *Journal of biomedical Science.* 21: 12. 2014.
- TSENG, C.S., Lo, H.W., Teng, H.C., *et al.* **Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever.** *FEMS, Immunol. Med. Microbiol.* 43(1): 99-102. 2005.
- VAN DER SCHAAR, H.M., Rust, M.J., Chen Chen, *et al.* **Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells.** *PLOS Pathogens.* 4(12): 1-9. 2008.
- VAN WETERING, S., van Buul, J.D., Quik, S., *et al.* **Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells.** *J. Cell. Sci.* 115(pt 9): 1837-1846. 2002.
- VANNICE, K.S., Durbin, A., Hombach, J. **Status of vaccine research and development of vaccines for dengue.** *Vaccine.* 2016.
- VERVAEKE, P., Vermeire, K., Liekens, S. **Endothelial dysfunction in dengue virus pathology.** *Reviews in medical virology.* 2015.
- VESTWEBER, D., Broermann, A., Schulte, D. **Control of endothelial barrier function by regulating vascular endothelial-cadherin.** *Curr. Opin. Hematol.* 17(3):230-236. 2010.
- VOLIN, M.V., Huynh, N., Klosowska, K. *et al.* **Fractalkine-induced endothelial cell migration requires MAP kinase signaling.** *Pathobiology.* 77: 7-17. 2010.
- VORAPHANI, N., Khondphatthanayothin, A., Srikaew, K., *et al.* **Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in children with dengue virus infection.** *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 346-348. 2010.
- WALLEZ, Y., HUBER, P. **Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1778(3): 794-809. 2008.
- WANG, C., Jun, R., Zhu, X., *et al.* **Function of CD147 in atherosclerosis and atherothrombosis.** *J Cardiovasc Transl Res.* 8(1): 59-66. 2015.
- WATTS, D. M., Porter, K. R., Putvatana, P. *et al.* **Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever.** *Lancet.* 354(9188):1431-4. 1999.
- WHITE, G.E., Greaves D.R. **Fractalkine: a survivor's guide: chemokines as antiapoptotic mediators.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 32(3): 589-94. 2012.

- WHITEHORN, J., SIMMONS, C.P. **The pathogenesis of Dengue.** *Vaccine.* 29(42): 7221-7228. 2011.
- WIGGING-DOHLVIK, K., Merriman, M., Shaji, C.A., *et al.* **Tumor necrosis factor- α disruption of brain endothelial cell barrier is mediated through matrix metalloproteinase-9.** *The American Journal of Surgery.* 208: 954-960. 2014.
- WONG, K.L., Chen, W., Balakrishnan, T., *et al.* **Susceptibility and response of human blood monocyte subset to primary dengue virus infection.** *PLoS One.* 7(5): e36435. 2012.
- YACOUB, S., Mongkolsapaya, J. e Sreaton, G. **The pathogenesis of dengue.** *Wolters Kluwer Health.* 26(3): 284-289. 2013.
- YAN, J., Nunn, A.D., Thomas, R. **Selective induction of cell adhesion molecules by proinflammatory mediators in human cardiac microvascular endothelial cells in culture.** *Int J Clin Exp Med.* 3(4): 315-331. 2010.
- YANG, L., Kowalski, J.R., Zhan, X., *et al.* **Endothelial cell cortactin phosphorylation by Src contributes to polymorphonuclear leukocyte transmigration in vitro.** *Circ. Res.* 98(3): 394-402. 2006.
- YANG, W., Yan, H., Ma, Y., *et al.* **Lower activation-induced T-cell apoptosis is related to the pathological immune response in secondary infection with hetero-serotype dengue virus.** *Immunobiology.* 221(3): 432-439. 2016.
- YOON, N., Dang, T.Q., Chasiotis, H., *et al.* **Altered transendothelial transport of hormones as a contributor to diabetes.** *Diabetes Metab. J.* 38(2): 92-99. 2014.
- YURCHENKO, V., Zybarth, G., O'Connor, M., *et al.* **Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147.** *J. Biol. Chem.* 277(25): 22959-22965. 2002.
- ZHANG, J., Alcaide, P., Liu, L., *et al.* **Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils.** *Plos One.* 6(1): e14525. 2011.
- ZHANG, J., DeFelice, A.F., Hanig, J.P. e Colatsky, T. **Biomarkers of endothelial cell activation serve as potential surrogate markers for drug-induced vascular injury.** *Toxicologic Pathology.* 38: 856-871. 2010.

Anexo A

Projeto Dengue

Laboratório de Imunologia Viral - FIOCRUZ

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Prontuário: _____

Endereço: _____

_____ Telefone: _____ e-mail: _____

Sexo: () Masc () Fem Data de Nascimento: __/__/__

Data Entrevista: __/__/__ Data Internação: __/__/__

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

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

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

Outros: _____

HISTÓRIA CLÍNICA

Comorbidades:

Diabetes mellitus	DPOC	Asma brônquica	rinite	Hipertensão arterial
-------------------	------	----------------	--------	----------------------

Doença cardíaca	Doença falciforme	Doença auto-imune	Tabagismo	Outros
Doença viral crônica? Quais?				
Faz uso de medicamentos contínuos? Especificar:				

Sintomas suspeitos de dengue

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

Atenção para os Sinais de Alarme

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

Manifestações Hemorrágicas

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

Outras

LABORATORIAL

1º HT: _____ 1º Plaqueta: _____ data: ___/___/___

2º HT: _____ 2º Plaqueta: _____ data: ___/___/___

último HT: _____ última Plaqueta: _____ data: ___/___/___

Anexar dados do hemograma e bioquímica

Outras informações:

Anexo B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

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

Nome : _____

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

Data: _____

Nome : _____

Assinatura : _____

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

Dra.Elzinandes L Azeredo (021) 7183-9093

Anexo C



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Claire Fernandes Kubelka

CAAE: 13318113.7.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 495.688

Data da Relatoria: 16/12/2013

Apresentação do Projeto:

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

São apresentados quatro objetivos e treze objetivos secundários.

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

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

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

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone

: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br