

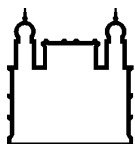
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**ESTUDO DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E DE
COAGULAÇÃO NA EPIDEMIA 2013 PELO DENV-4**

VICTOR EDGAR FIESTAS SOLORZANO

Rio de Janeiro
Setembro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Victor Edgar Fiestas Solórzano

**ESTUDO DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E DE COAGULAÇÃO NA
EPIDEMIA 2013 PELO DENV-4**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elzinandes Leal de Azeredo

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2014

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

S689 Solorzano, Victor Edgar Fiestas

Estudo dos mediadores inflamatórios e de coagulação na epidemia 2013 pelo DENV-4 / Victor Edgar Fiestas Solorzano. – Rio de Janeiro, 2014.

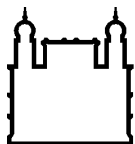
xvii, 112 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.

Bibliografia: f. 69-104

1. Dengue. 2. Citocinas. 3. Quimiocinas. 4. Mediadores da coagulação. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Autor: Victor Edgar Fiestas Solórzano

**ESTUDO DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E DE COAGULAÇÃO NA
EPIDEMIA 2013 PELO DENV-4**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Elzinandes Leal de Azeredo

Aprovada em: 29 / 09 /2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha (Fiocruz / Mato Grosso do Sul) - Presidente

Prof. Dr. Adilson José de Almeida (UNIRIO / Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Eugenio Damaceno Hottz (Fiocruz / Rio de Janeiro)

Prof^a. Dr^a. Flávia Barreto dos Santos (Fiocruz / Rio de Janeiro)

Prof^a. Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Fiocruz / Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 29 de Setembro de 2014

*Dedico esta dissertação,
aos meus pais Jaime e Arcenia[†], e
ao maior amor da minha vida, Amparo,
fonte de inspiração, coragem e fé.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permite continuar crescendo profissionalmente e nesta oportunidade num maravilhoso país.

À minha querida família pelo seu apoio, força e encorajamento.

À minha orientadora, Dra. Elzinandes Leal de Azeredo, muito obrigado pela paciência, dedicação e apoio em todo momento durante o desenvolvimento do mestrado.

À Dra. Claire Fernandes Kubelka por ter me recebido no Laboratório de Imunologia Viral

À maravilhosa família do Laboratório de Imunologia Viral: Luzia, Gladys, Mariana, Cintia Marinho, Cintia Mello, Luciana, Caroline, Jessica, Larissa, Tamiris, Márcio e lury. Obrigado por todo o companheirismo e carinho recebido. Agradeço especialmente à Amanda pelo apoio recebido no desenvolvimento do meu projeto e à Dra Luzia pela revisão desta tese.

Ao Laboratório de Flavivirus, sem o seu apoio diagnóstico, este trabalho não teria sido possível. Agradeço especialmente à Nieli por sua colaboração no meu trabalho

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, aos professores pelos ensinamentos e aos colegas da turma de mestrado pela sua amizade e apoio.

Aos nossos colaboradores do trabalho de campo, Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, Paulo Vieira Damasco e Luis José de Souza.

Ao Dr. Adilson José de Almeida por sua colaboração no meu trabalho

A todos os pacientes que participaram neste trabalho.

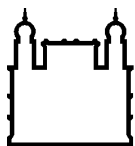
À Coordenadora, Dra. Martha Suarez Mutis, e Secretária do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pelo auxílio constante durante o mestrado.

À Cooperação Peru-Belga pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do mestrado.

Ao Instituto Nacional da Saúde no Peru por minha liberação para o desenvolvimento desta formação de pós-graduação.

“Uma pessoa inteligente resolve um problema, um sábio o previne”

Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

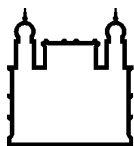
ESTUDO DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E DE COAGULAÇÃO NA EPIDEMIA 2013 PELO DENV-4

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Victor Edgar Fiestas Solórzano

A dengue se tornou a arbovirose mais difundida no mundo, atingindo mais de 100 países. O sorotipo DENV-4 foi reintroduzido no Brasil em 2010, se espalhou para as diferentes regiões brasileiras sendo responsável por uma das maiores epidemias de dengue relatadas no país em 2013. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil clínico-laboratorial, citocinas/quimiocinas inflamatórias e mediadores da coagulação em pacientes infectados pelo DENV durante esta epidemia. Para isto, foram avaliados 265 casos confirmados de dengue atendidos nos centros de saúde dos estados do RJ e MS no ano de 2013. Os pacientes foram classificados de acordo com a nova classificação da OMS, 2009 nos grupos: 158 (70,2%) dengue sem sinais de alarme (DSSA), 65 (28,9%) dengue com sinais de alarme (DCSA) e 2 (0,9%) dengue grave. Os sinais de alarme mais frequentes foram dor abdominal persistente (61,5%) e sangramento de mucosas (32,3%). O DENV-4 foi o sorotipo de maior incidência e 85,2% dos pacientes apresentaram infecção secundária. Pacientes DCSA/DG apresentaram baixa contagem de leucócitos totais, de plaquetas e altos níveis séricos de AST/TGO e ALT/TGP quando comparados aos pacientes DSSA e aqueles ODF (outras doenças febris). A quantificação dos mediadores inflamatórios por ensaios imunoenzimáticos indicou: (i) níveis aumentados de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) e quimiocinas (IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10 e MCP-1/CCL2) nos pacientes DSSA e DCSA/DG quando comparados com o grupo controle; (ii) níveis aumentados de IL-10 e IL-6 nos pacientes DCSA/DG enquanto que IL-8/CXCL8 foi maior nos pacientes DSSA; Em relação aos parâmetros de coagulação: (iii) Os pacientes DSSA e DCSA/DG apresentaram menores níveis do fator tecidual (TF) e maiores níveis do inibidor fisiológico da via do TF (TFPI) quando comparados com o grupo controle; (iv) Baixos níveis de fibrinogênio foram encontrados nos pacientes DCSA/DG e níveis elevados de trombosmodulina foram encontrados nos pacientes entre 4-7 dias de doença. As análises de correlação demonstraram correlação inversa entre os níveis circulantes de IP-10/CXCL10 e IL-10 com a contagem de plaquetas e leucócitos totais e correlação positiva com níveis séricos de AST/TGO. Além disso, IL-10 foi associada diretamente com relação albumina/globulina. As análises de correlação demonstraram que os níveis de TF estavam diretamente correlacionados com os níveis do TFPI, que por sua vez foi associado inversamente com a contagem de plaquetas. Estes resultados sugerem mecanismos de regulação da cascata da coagulação durante a infecção pelo DENV. Apesar dos altos níveis circulantes de IL-10 encontrados nos pacientes DCSA/DG, a análise da curva sob a área ROC não encontrou bom valor preditivo na discriminação entre DSSA e DCSA/DG e, portanto a IL-10 não se mostrou adequada para o uso como um biomarcador nesta população.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF INFLAMMATORY AND COAGULATION MEDIATORS IN 2013 DENGUE VIRUS TYPE 4 OUTBREAK

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Victor Edgar Fiestas Solórzano

Dengue has become the most widespread arbovirus in the world, reaching more than 100 countries. The DENV-4 serotype was reintroduced in Brazil in 2010, and spread to the different Brazilian regions being responsible for one of the largest epidemics of dengue reported in the country in 2013. The objective of this study was to evaluate the clinical and laboratory profile, and inflammatory cytokines/chemokines and coagulation mediators in patients infected with DENV during this epidemic. For this, were evaluated 265 confirmed cases of dengue attended at health centers in the states of RJ and MS in the year 2013. Patients were classified according to the new WHO classification, 2009 in groups: 158 (70.2%) dengue without warning signs (DwoWS), 65 (28.9%) dengue with warning signs (DwWS) and 2 (0.9%) severe dengue (SD). The most frequent warning signals were persistent abdominal pain (61.5%) and mucosal bleeding (32.3%). The DENV-4 was the most prevalent serotype and 85,2% of dengue patients showed secondary infection. DwWS/SD patients showed lower white blood cell and platelet counts, and higher AST and ALT serum levels compared to DwoWS and other febrile illnesses patients. Quantification of inflammatory mediators by immunoassays indicated: (i) increased levels of cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10) and chemokines (IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10 and MCP-1/CCL2) in DwoWS and DwWS patients compared with healthy individuals; (ii) increased levels of IL-10 and IL-6 in DwWS/SD patients while IL-8/CXCL8 was increased in DSSA patients; In respect to coagulation parameters: (iii) DwoWS and DwWS/SD patients showed lower levels of sTF and higher of TFPI compared with the control group; (iv) Lower levels of fibrinogen were found in DwWS/SD patients and higher levels of thrombomodulin in patients between 4-7 days of illness; Correlation analysis showed an inverse correlation between circulating levels of IP-10/CXCL10 and IL-10 with the total amount of platelets and leukocytes and positive correlation with serum levels of AST. Furthermore, IL-10 was directly associated with albumin/globulin ratio. Correlation analysis showed that TF levels were directly correlated with TFPI levels, which in turn was inversely related with platelets counts. These results suggest mechanisms involving regulation of the coagulation cascade during DENV infection. Despite higher circulating levels of IL-10 found in DwWS/SD patients, analysis of the area under the ROC curve, did not showed a good predictive value in discriminating those who were likely to develop DwWS/SD and therefore IL-10 was not suitable for use as a biomarker in this population.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Histórico e Epidemiologia	2
1.1.1	Dengue nas Américas.....	3
1.1.2	Dengue no Brasil	5
1.2	O Vírus Dengue: Características estruturais e ciclo replicativo	6
1.2.1	O Vírus Dengue	6
1.2.2	Estrutura do vírus	7
1.2.3	Replicação viral e Células Alvo.....	8
1.3	Manifestações clínicas	10
1.3.1	Fases clínicas	10
1.3.2	Classificação clínica, OMS 1997	11
1.3.3	Classificação clínica, OMS 2009	13
1.4	Aspectos imunopatogênicos na dengue	14
1.4.1	Virulência viral	14
1.4.2	Facilitação dependente de anticorpos ou imuno- amplificação da infecção.....	15
1.4.3	“Pecado Antigênico Original”	16
1.4.4	Mimetismo molecular	16
1.4.5	Polimorfismo genético.....	17
1.4.6	Interação Multifatorial.....	17
1.5	Resposta imune inata e inflamação	17
1.5.1	Resposta imune inata na dengue: citocinas e mediadores inflamatórios	19
1.6	Hemostasia	21
1.6.1	Mecanismos reguladores da coagulação.....	22
1.7	Fatores de Coagulação e Resposta Inflamatória	23
1.8	Distúrbios da coagulação na dengue	25
1.9	Justificativa	27
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo Geral	28
2.2	Objetivos Específicos	28

3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Estudo populacional	29
3.2	Definições de caso de dengue	30
3.2.1	Caso suspeito de dengue	30
3.2.2	Caso confirmado de dengue.....	30
3.2.3	Classificação clínica dos casos	30
3.2.4	Infeção primária e secundária.....	31
3.3	Exames hematológicos e bioquímicos.....	32
3.4	Ensaio para avaliação dos mediadores inflamatórios	32
3.4.1	Quantificação dos fatores solúveis citocinas e quimiocinas por Luminex®: TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-8/CXCL8	32
3.4.2	Quantificação dos fatores solúveis citocinas e quimiocinas por ELISA	33
3.5	Ensaio para avaliação dos parâmetros de coagulação.....	35
3.5.1	Quantificação dos parâmetros de coagulação por ELISA.....	35
3.5.2	Dosagem do Fibrinogênio.....	36
3.6	Análise estatística	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Características clínicas e demográficas dos casos confirmados de dengue.....	38
4.2	Características laboratoriais dos casos confirmados de dengue.....	40
4.3	Tipagem dos sorotipos do DENV	40
4.4	Caracterização da infecção primária e secundária	41
4.5	Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	41
4.6	Análise dos mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) na infecção pelo DENV.....	46
4.7	Análise dos parâmetros de coagulação	49
4.8	Comparações das dosagens dos parâmetros de coagulação na presença ou ausência de sangramentos.....	50
4.9	Correlações entre os níveis circulantes dos marcadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) estudados com os parâmetros laboratoriais associados à gravidade	52

4.10	Correlações entre os níveis circulantes dos marcadores de coagulação estudados com parâmetros laboratoriais associados à gravidade	54
4.11	Avaliação de possíveis biomarcadores de gravidade.....	56
5	DISCUSSÃO	57
5.1	A nova classificação OMS 2009, manifestações clínicas e características laboratoriais	57
5.2	Citocinas e Mediadores inflamatórios na imunopatogênese da dengue.....	61
5.3	Distúrbios da coagulação na dengue	65
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVA	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8	ANEXOS	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribuição de países e/ou áreas de risco de transmissão da dengue.....	1
Figura 1.2 Evolução do numero de casos de dengue nas Américas, 1980-2010.....	5
Figura 1.3 Características estruturais e genômicas do DENV	7
Figura 1.4 Ciclo de replicação do DENV	10
Figura 1.5 Classificação clínica da Dengue [OMS 1997 (77)]	12
Figura 1.6 Classificação clínica da Dengue [OMS 2009 (68)]	13
Figura 1.7 Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares	23
Figura 1.8 Visão geral da relação do TF com os receptores PAR e inibidores da coagulação.....	25
Figura 4.1 Classificação dos casos confirmados de dengue, RJ e MS 2013	38
Figura 4.2 Parâmetros hematológicos dos casos confirmados de dengue	43
Figura 4.3 Dosagem da Proteína C reativa nos grupos ODF, DSSA, DCSA	45
Figura 4.4 Dosagem de citocinas e quimiocinas dos casos confirmados.....	48
Figura 4.5 Dosagem dos parâmetros de coagulação dos controles e casos	50
Figura 4.6 Avaliação de associação entre citocinas e quimiocinas	53
Figura 4.7 Avaliação de associação entre marcadores de coagulação.....	55
Figura 4.8 Curva ROC dos níveis circulantes de IL-10 e IP-10/CXCL10.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Dados demográficos dos casos confirmados de dengue segundo classificação clínica, RJ e MS 2013	39
Tabela 4.2 Distribuição dos casos confirmados de dengue segundo teste diagnóstico e classificação clínica, RJ e MS 2013	40
Tabela 4.3 Distribuição dos casos confirmados de dengue segundo dias de doença até coleta da amostra, RJ e MS 2013	40
Tabela 4.4 Distribuição dos sorotipos segundo procedência, RJ e MS 2013.....	41
Tabela 4.5 Distribuição dos casos confirmados de dengue segundo tipo de infecção primária ou secundária, RJ e MS 2013	41
Tabela 4.6 Parâmetros hematológicos nos grupos ODF, DSSA e DCSA/DG.....	42
Tabela 4.7 Parâmetros bioquímicos nos grupos ODF, DSSA e DCSA/DG.....	44
Tabela 4.8 Classificação dos casos de dengue segundo os níveis de transaminases	44
Tabela 4.9 Parâmetros hematológicos e bioquímicos vs infecção primária/secundária	45
Tabela 4.10 Dosagem das citocinas nos controles e casos confirmados de dengue segundo classificação clínica	46
Tabela 4.11 Dosagem das quimiocinas nos controles e casos confirmados de dengue segundo classificação clínica	47
Tabela 4.12 Dosagem dos parâmetros de coagulação nos controles e casos confirmados de dengue segundo classificação clínica.....	49
Tabela 4.13 Comparação das dosagens dos parâmetros de coagulação segundo a presença ou ausência de sangramentos nos casos confirmados de dengue	51
Tabela 4.14 Comparação das dosagens das transaminases segundo a presença ou ausência de sangramentos nos casos confirmados de dengue	51
Tabela 4.15 Correlação entre as dosagens de citocinas e quimiocinas com os dados laboratoriais dos casos confirmados de dengue	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	Facilitação dependente de anticorpos (do inglês “antibody-dependent enhancement”)
ALT	Alanina aminotransferase
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área sob a curva (do inglês “area under curve”)
C	Proteína estrutural do capsídeo do vírus
Ca	Calcio
DC	Dengue clássica
DC-SIGN	Ligante da molécula de adesão intercelular 3 não integrina específica da célula dendrítica (do inglês “Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin”)
DCs	Células dendríticas
DCSA	Dengue com sinais de alarme
DENCO	Dengue control
DENV	Vírus Dengue
DENV+	Infecção pelo vírus Dengue
DENV-1	Sorotipo 1 do vírus Dengue
DENV-2	Sorotipo 2 do vírus Dengue
DENV-3	Sorotipo 3 do vírus Dengue
DENV-4	Sorotipo 4 do vírus Dengue
DG	Dengue grave
DSSA	Dengue sem sinais de alarme
E	Proteína estrutural do envelope
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FcγR	Receptor de membrana da região Fc da imunoglobulina G
FHD	Febre Hemorrágica por Dengue
HRP	Peroxidase de rábano silvestre (do inglês “horseradish peroxidase”)
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-1Ra	Antagonista do receptor de interleucina 1

IP-10	Proteína 10 induzível pelo interferon gama (do inglês “Interferon gamma-induced protein 10”)
kDa	Kilodalton
M	Proteína estrutural da membrana
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos (do inglês “monocyte chemotactic protein 1”)
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MS	Mato Grosso do Sul
NS	Não estrutural
ODF	Outras doenças febris
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	Sequencia de leitura aberta (do inglês “open reading frame”)
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês “pathogen-associated molecular patterns”)
PAR	Receptores associados a protease
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
PE	Ficoeritrina
prM	Precursor de proteína de membrana
RJ	Rio de Janeiro
RER	Reticulo endoplasmático rugoso
ROC	Características de operação do receptor (do inglês “receiver operating characteristic”)
SCD	Síndrome de Choque por Dengue
SEM	Desvio padrão da média
sTF	Fator tecidual solúvel
TA	Temperatura ambiente
TF	Fator tecidual
TFPI	Inibidor fisiológico do TF (do inglês “tissue factor pathway inhibitor”)
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TLR	Receptores semelhantes ao Toll (do inglês “Toll-like receptor”)
TM	Trombomodulina
TMB	Tetrametilbenzedina

TNF- α	Fator de necroses tumoral alfa
TP	Tempo de Protrombina
TTPa	Tempo de Tromboplastina parcial ativado

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença aguda causada pelo vírus Dengue (DENV) pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* com quatro sorotipos antigênicamente distintos chamados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (1). Notícias recentes relataram a suspeita da existência de um quinto sorotipo viral, entretanto, registros científicos ainda não estão disponibilizados a respeito deste novo achado (2). É a arbovirose (“arthropod-borne vírus”, doença transmitida por artrópodes) mais difundida no mundo, atingindo mais de 100 países das áreas tropicais e subtropicais (Figura 1.1).

A incidência da dengue aumentou dramaticamente nas últimas décadas (3) e, atualmente, quase 3 bilhões de pessoas (mais de 40% da população mundial) estão em risco de adquirir a doença, ocorrendo anualmente entre 50-100 milhões de infecções no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano 500.000 pessoas com dengue grave necessitam de hospitalização, e cerca de 2,5% dos casos evoluem para o óbito (4). O custo anual da dengue nas Américas está estimado em aproximadamente dois bilhões de dólares e cerca de 60% correspondem aos custos indiretos, principalmente perda de produtividade (5).



Figura 1.1 Distribuição de países e/ou áreas de risco de transmissão da dengue no mundo, 2013 [OMS, 2014 (6)]

1.1 Histórico e Epidemiologia

Os primeiros relatos sugerindo a doença foram documentados na enciclopédia chinesa publicada durante a dinastia Chin (265 a 420 D.C.), e foi chamada pelos chineses de “veneno da água”, porque entenderam que a doença tinha alguma relação com insetos voadores e água (revisto por Gubler, 1998) (7).

A origem da palavra dengue não é clara, sendo atribuída aos diferentes nomes recebidos nas regiões geográficas afetadas pela doença. Provavelmente, o termo dengue originou-se da frase suaíli "ki-dinga pepo", que significava "súbito tremor ou câibras causado por um espírito maligno", fazendo referência ao estado de moleza e prostração dos pacientes durante uma epidemia de doença febril (provável Chikungunya) que afetou a África Oriental nos anos 1823 e 1827. Outros termos também foram usados para descrever alguma doença febril semelhante, tais como: “Coup de Barre” nas Índias Francesas do Oeste (1635), “Fiebre quebranta huesos” em Porto Rico (1771), “Mal de Genoux” no Egito (1780), “Knokkelkoorts” em Jacarta (1779), “La Piadosa” na Espanha (1784-86), “Dandy fever” em São Tomás - Índias Ocidentais (1827), “Febre Polca” no Brasil (1845-49) (8). Além disso, existe evidência que a palavra espanhola “dengue” que significava “melindre” já era utilizada na Espanha desde 1801 para descrever uma doença semelhante. Posteriormente, com o comércio de escravos africanos, a doença se espalhou para o Caribe junto com seu nome suaíli. Assim, em Cuba a frase suaíli foi popularmente identificada com a palavra espanhola. Finalmente, após o surto de 1828 em Cuba, o termo dengue entrou em uso geral na literatura médica, continuando até hoje (9, 10).

Provavelmente, a infecção teve sua origem na Ásia, onde foi demonstrada a circulação dos quatro sorotipos do DENV nos ciclos silvestres de forma endêmica, com baixa patogenicidade. O *Aedes albopictus* era o principal vetor que transmitia o vírus para primatas não humanos e, ocasionalmente, para humanos (11). No entanto, o *Aedes aegypti* de origem africana se adaptou ao homem, utilizando seus reservatórios de água junto às moradias para postura e, conseqüentemente, passou a utilizá-lo como principal fonte de repasto sanguíneo. Assim, o *Aedes aegypti* acompanhou as grandes migrações para Ásia e o comércio de escravos favoreceu a chegada deste vetor às Américas (12).

Definitivamente, a presença de um vetor em grande quantidade e próximo ao homem permitiu a rápida circulação dos DENV na Ásia, e a partir do século XVIII começaram a surgir surtos epidêmicos esporádicos. Durante a Segunda Guerra

Mundial (1939-1945), o deslocamento de refugiados, destruição de cidades e mudança de ecossistemas com a criação de criadouros artificiais, como pneus e materiais de guerra abandonados, e a urbanização desordenada no pós-guerra criaram condições favoráveis para a infestação do vetor. Nesse período, muitos países na Ásia tornaram-se hiperendêmicos para dengue com a circulação dos quatro sorotipos e uma nova forma clínica da dengue foi descrita, a Febre Hemorrágica por Dengue / Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD) que atingiu principalmente as crianças com taxas elevadas de letalidade. A primeira epidemia de FHD na Ásia ocorreu em Manila, Filipinas (1953-1954). Posteriormente, outros países também reportaram epidemias de FHD, como Tailândia (1958), Cingapura, Malásia e Vietnã (1960s), Indonésia e Myanmar (3, 13).

Apenas nove países tinham experimentado epidemias de FHD até 1970. Posteriormente, a incidência da doença aumentou dramaticamente, tornando-se endêmica em mais de 100 países (4).

Em 2010, mais de 2,3 milhões de casos foram registrados nas Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. Além disso, existe evidência de disseminação da dengue para novas áreas. Em 2010, foi relatada pela primeira vez transmissão local na França e na Croácia. Em 2012, um surto de dengue nas ilhas Madeira, em Portugal, resultou em mais de 2000 casos e foram detectados casos importados em outros 10 países europeus. Em 2013, foram reportados casos no estado da Flórida (Estados Unidos da América - EUA) e na província de Yunnan (China) (4).

1.1.1 Dengue nas Américas

Nas Américas, epidemias de dengue ou doenças muito semelhantes foram descritas desde o século XVII, principalmente nas regiões costeiras, onde a introdução do vetor estava associada ao transporte marítimo. Assim, o primeiro surto foi descrito na Filadélfia, EUA, por Benjamin Rush em 1780. Nos séculos XIX e XX, sucessivos surtos e epidemias foram relatados, especialmente no Caribe e nos EUA (10).

Em 1901, William Gorgas iniciou uma campanha de eliminação do *Aedes aegypti* em Cuba para o controle da febre amarela, esta iniciativa foi seguida por um programa semelhante da Fundação Rockefeller no Brasil (1923-1940) conseguindo eliminar o vetor em vastas áreas do país. Resultados semelhantes foram também obtidos em outros países como Bolívia, Colômbia, Equador, Paraguai e Peru (14, 15). Em 1947 foi aprovado o Programa Continental de Erradicação do *Aedes aegypti*

para controle da febre amarela urbana pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), que teve sucesso demonstrado em 1962, quando 18 países do continente e uma série de ilhas do Caribe tinham alcançado a erradicação do vetor. Contudo, a deterioração do programa no final da década de 60 levou à reintrodução do vetor a partir das áreas onde não havia sido eliminado, resultando em surtos subsequentes causados pelos diferentes sorotipos do DENV nos países do continente americano (10).

No início da década de 1980, o número de casos notificados aumentou consideravelmente, e esta tendência manteve-se durante as décadas seguintes (Figura 1.2). Em 1977, o DENV-1 foi relatado pela primeira vez nas Américas, causando uma epidemia na Jamaica que se espalhou para o resto do Caribe, México, América Central e norte da América do Sul (16). Em 1981, ocorreu em Cuba a primeira epidemia de FHD nas Américas causada pela entrada do DENV-2, quatro anos depois da epidemia pelo DENV-1. Foram reportados 344.203 casos, incluindo 10.312 casos de FHD e 158 mortes (101 crianças) e foi considerada uma das piores epidemias nesse período em Cuba (17). Além disso, em 1981 o DENV-4 foi introduzido no Caribe (18) e, posteriormente, se espalhou na região das Américas e esteve associado com doença branda e casos esporádicos de FHD (19-23).

Apesar do número crescente de casos na região durante a década de 1980, a incidência de FHD permaneceu baixa até 1989, quando uma segunda grande epidemia de FHD, associada principalmente ao DENV-2, foi relatada na Venezuela (1989-1990) com mais de 6.000 casos e 73 mortes (16). Por último, o DENV-3 foi reintroduzido nas Américas em 1994, causando uma epidemia na Nicarágua com 20.469 casos, incluindo 1.247 casos de FHD (24).

No período de 2000 a 2013 foi relatado um aumento sem precedentes no número de casos de dengue nas Américas com a circulação dos quatro sorotipos. Em 2013, ocorreu a maior epidemia da história do continente, com mais de 2,3 milhões de casos, 37.705 casos graves e 1.289 mortes. Porém, apesar do aumento da incidência de dengue, a taxa de mortalidade caiu de 0,07% para 0,05% nos últimos três anos (25). Em 2014, até a semana epidemiológica (SE) número 14, a região das Américas relatou um total de 275.787 casos, 2.494 casos graves e 63 mortes no continente. Em seis países (Brasil, Guatemala, México, Nicarágua, Peru e Venezuela) foi confirmada a circulação simultânea dos quatro sorotipos (26).

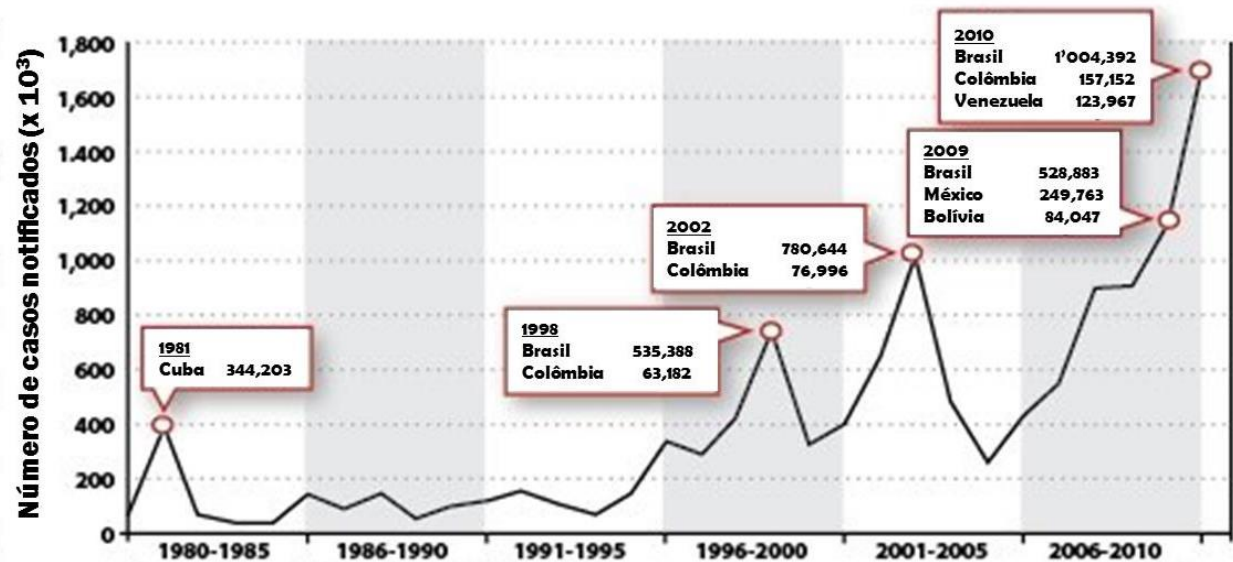


Figura 1.2 Evolução do número de casos de dengue nas Américas, 1980-2010
[Adaptado de Brathwaite, 2012 (10)]

1.1.2 Dengue no Brasil

A primeira referência sobre provável surto de dengue no Brasil data de 1846, no Rio de Janeiro, e foi conhecida como “febre polca”. Posteriormente, outros surtos foram relatados em Curitiba (1896), São Paulo (1916), Rio Grande do Sul (1917), Niterói, no Rio de Janeiro (1923) (27). A primeira epidemia confirmada laboratorialmente ocorreu em Boa Vista, Roraima (1981-1982), com o isolamento do DENV-1 e DENV-4 na região (28).

A reinfestação do vetor em 1976 resultou em uma rápida dispersão do DENV pelo país e, conseqüentemente, na ocorrência de epidemias. Em 1986, identificou-se a introdução do DENV-1 no estado do RJ, o qual espalhou-se para outros estados brasileiros (29). Em 1990, a situação foi agravada pela introdução do DENV-2 no RJ, com o aparecimento dos primeiros casos de FHD associados à infecção secundária. Com a dispersão do vetor e a disseminação do DENV-1 e DENV-2, várias epidemias foram registradas durante a década de 1990, inicialmente nos grandes centros urbanos das regiões Sudeste e Nordeste e alcançando depois as regiões Centro-Oeste e Norte. Em 1998 foi observada a maior incidência daquela década, com mais de 500.000 casos notificados (figura 1.2) (10, 30, 31). No final do ano 2000, ocorreu a introdução do DENV-3, mais uma vez pelo estado do RJ, e este novo sorotipo disseminou-se rapidamente ocasionando grandes epidemias simultâneas nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste. Em 2002 foram notificados 780.644 casos, correspondendo a maior taxa de incidência ao estado do RJ (32, 33).

Nos anos 2007-2008, a emergência do DENV-2 (genótipo Asiático/Americano) esteve relacionada com casos de FHD (34, 35). Em 2007, foram registrados um total de 496.923 casos, incluindo 1896 casos graves e 148 óbitos. No ano seguinte, 632.680 casos foram registrados, incluindo 4.455 casos graves e 259 óbitos (36).

Em 2010, havendo circulação do DENV-2 e reemergência do DENV-1 (35, 37), foram registrados um total de 1.011.548 casos, 3.700 casos graves e 300 óbitos (36). Neste mesmo ano ainda foi marcado pela reemergência do DENV-4 no estado de Roraima (38). Estudos filogenéticos evidenciaram no Brasil, a co-circulação dos genótipos I e II do DENV-4 (39).

Em 2013, houve um predomínio da circulação do DENV-4 e ocorreu a maior epidemia registrada no Brasil com aproximadamente 2 milhões de casos notificados (40). A região Sudeste teve o maior número de casos (926.595 casos; 63,0%), seguida pela região Centro-Oeste (270.797 casos; 18,4%), região Nordeste (152.466 casos; 10,4%), região Sul (69.456 casos; 4,7%) e região Norte (51.173 casos; 3,5%). Foram também registrados 213 óbitos (36). Neste ano (2014), o Brasil começou a adotar a nova classificação de casos de dengue da OMS. Até a SE 27 foram registrados 659.051 casos de dengue no país, incluindo 5.413 casos com sinais de alarme, 387 casos de dengue grave e 249 óbitos (41).

1.2 O Vírus Dengue: Características estruturais e ciclo replicativo

1.2.1 O Vírus Dengue

O DENV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Este gênero abrange mais de 70 vírus, dentre estes 56 incluem o grupo arbovírus (“arthropod-borne virus”), cuja transmissão é feita por carrapatos ou mosquitos. Em geral, os flavivírus são mantidos na natureza em reservatórios animais (zoonoses). No entanto, o DENV têm se adaptado completamente aos seres humanos e são mantidos em grandes áreas urbanas nas regiões tropicais e subtropicais, em ciclos de transmissão homem-mosquito-homem, mas os reservatórios animais ainda são mantidos na selva da África e sudeste da Ásia em ciclos de transmissão mosquito-macaco-mosquito (42).

1.2.2 Estrutura do vírus

O DENV tem forma esférica com um diâmetro entre 50-60 nanômetros (nm), o seu genoma é composto de uma fita de ARN (ácido ribonucleico) simples com polaridade positiva (ssRNA+). O ARN está protegido por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, composto por uma única poliproteína, a proteína C (capsídeo), circundado por uma bicamada lipídica associada à proteína E (envelope) e a proteína M (membrana) que também pode ser encontrada em sua forma não processada prM (pré-membrana). O genoma tem um comprimento aproximado de 11 Kb (11.000 nucleotídeos) com uma única sequência de leitura aberta (“open reading frame – ORF”) codificando uma poliproteína que é posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, prM, M e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Figura 1.3) (43).

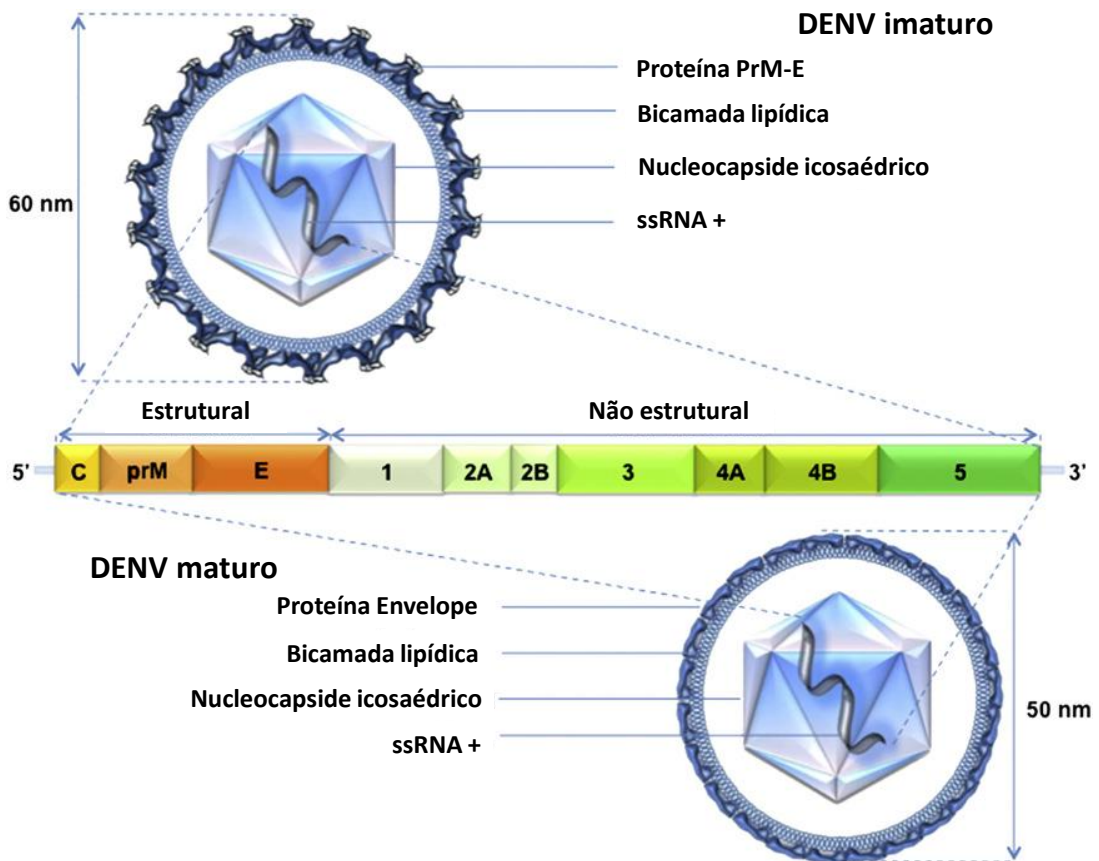


Figura 1.3 Características estruturais e genômicas do DENV

O ARN genômico codifica 10 proteínas virais: três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Os vírions imaturos apresentam a proteína prM-E em formas de espículas. Os vírions maduros apresentam os dímeros de proteína M-E na forma lisa. C: capsídeo; E: envelope; prM: pré-membrana; ssRNA+: ARN fita simples com polaridade positiva [Adaptado de Herrero, 2013 (44)].

As proteínas estruturais E e prM são os principais alvos da resposta de anticorpos na infecção pelo DENV (45).

A proteína E é responsável pela adsorção e penetração do vírus na célula alvo, esta proteína está composta por três domínios, DI, DII e DIII. O domínio DI contém a região central, o domínio DII é o local de dimerização da proteína E que está envolvido na fusão da membrana mediada pelo vírus e, por fim, o domínio DIII contém uma região de interação com receptores presentes na superfície das células hospedeiras e apresenta epitopos que se ligam aos anticorpos neutralizantes. Enquanto os anticorpos dirigidos contra os domínios DI e DII da proteína E apresentam reação-cruzada entre os diferentes sorotipos do DENV e outros flavivírus, os anticorpos dirigidos contra o domínio DIII são em geral do tipo neutralizante e sorotipo específico (46).

As proteínas não-estruturais estão envolvidas na tradução, transcrição e replicação viral (47). Dentre as proteínas não-estruturais (NS), a proteína NS1 (46 kDa) pode ser encontrada em três formas: intracelular, membranar e na forma solúvel. Uma vez que circula em níveis elevados no sangue, a NS1 é um importante alvo no diagnóstico da dengue. Lin e colaboradores demonstraram que os anticorpos contra proteína NS1 apresentam reação-cruzada contra as células endoteliais induzindo ativação de células inflamatórias e, conseqüentemente, lesão das células endoteliais (48). Além disso, altos níveis circulantes de NS1 foram associados com doença grave (49).

As proteínas NS2A, NS4A e NS4B foram identificadas como potenciais antagonistas da via de sinalização dos interferons (50). A proteína NS3 é encontrada no citoplasma, agindo como helicase de ARN, e sua porção N-terminal atua como protease para algumas proteínas virais durante a tradução, tendo como cofator a NS2B (47). Finalmente a proteína NS5 (103 kDa) é uma proteína multifuncional exibindo atividade de polimerase dependente de RNA (51). Estudo demonstrou que a proteína NS5 foi capaz de induzir a expressão e secreção da interleucina-8 (IL-8/CXCL8) (52). Da mesma forma que as proteínas NS2A, NS4A e NS4B, a proteína NS5 foi identificada como um potente antagonista dos IFN tipo I (53).

1.2.3 Replicação viral e Células Alvo

O principal vetor do DENV é o *Aedes aegypti*, uma espécie antropofílica e endofílica. A transmissão do DENV se faz pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti*, no ciclo homem-vetor-homem. Após a infecção da fêmea do vetor durante o repasto

sanguíneo, o vírus se multiplica no intestino do inseto e, em seguida, migra para as glândulas salivares. Quando um mosquito infectado se alimenta numa pessoa saudável, o vírus é inoculado pela via subcutânea (54). Assim, durante a infecção natural, o DENV é inoculado pelo vetor no espaço subcutâneo ou no espaço intradérmico. A replicação viral ocorre no local, nas células retículo-endoteliais ou nas células de Langerhans, que se encarregam de levar o vírus até os linfonodos regionais, favorecendo sua disseminação, preferencialmente, nas células mononucleares do sangue periférico (55). O DENV já foi encontrado em hepatócitos, pneumócitos tipo II, fibras cardíacas, células dendríticas, células endoteliais teciduais e plaquetas (56-59).

O ciclo de replicação inicia-se com a adsorção do vírus nas principais células alvo (monócitos, macrófagos e células dendríticas), através de receptores celulares expressos na membrana plasmática. Várias moléculas vêm sendo propostas como receptores do vírus. Dentre estas, glicosaminoglinas, sulfato de heparan e o receptor de manose (60). Alguns estudos sugerem fortemente o DC-SIGN (“Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin” – CD209) como indispensável para a infecção do DENV nos humanos. Neste contexto, a infecção do DENV nas células dendríticas é mediada através do DC-SIGN expresso nestas células (61-63).

O DENV entra na célula hospedeira via endocitose mediada por receptor. Após a ligação do vírus ao receptor na superfície celular, o vírus é então endocitado num processo mediado por clatrina (64). Uma vez dentro da célula, a acidificação da vesícula endocítica leva ao rearranjo da glicoproteína E, fusão do envelope viral com a membrana endossomal e liberação do ssRNA viral no citoplasma (65). Em seguida, o ssRNA viral é traduzido na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), produzindo inicialmente uma poliproteína que é subsequentemente clivada em proteínas individuais (estruturais e não estruturais), enquanto o ssRNA viral é replicado mediante um complexo de replicação viral. Posteriormente, ocorre a montagem do vírus imaturo com a participação da proteína E, PrM, C e o RNA recém-sintetizado, através de um mecanismo denominado brotamento (“budding”) (66). Finalmente, a proteólise da membrana precursora viral (prM) ocorre na rede trans-Golgi, mediada pela enzima furina do hospedeiro, ativando o rearranjo da homodimerização da proteína E e formação de novas partículas virais maduras que são liberadas da célula do hospedeiro (67). (Figura 1.4)

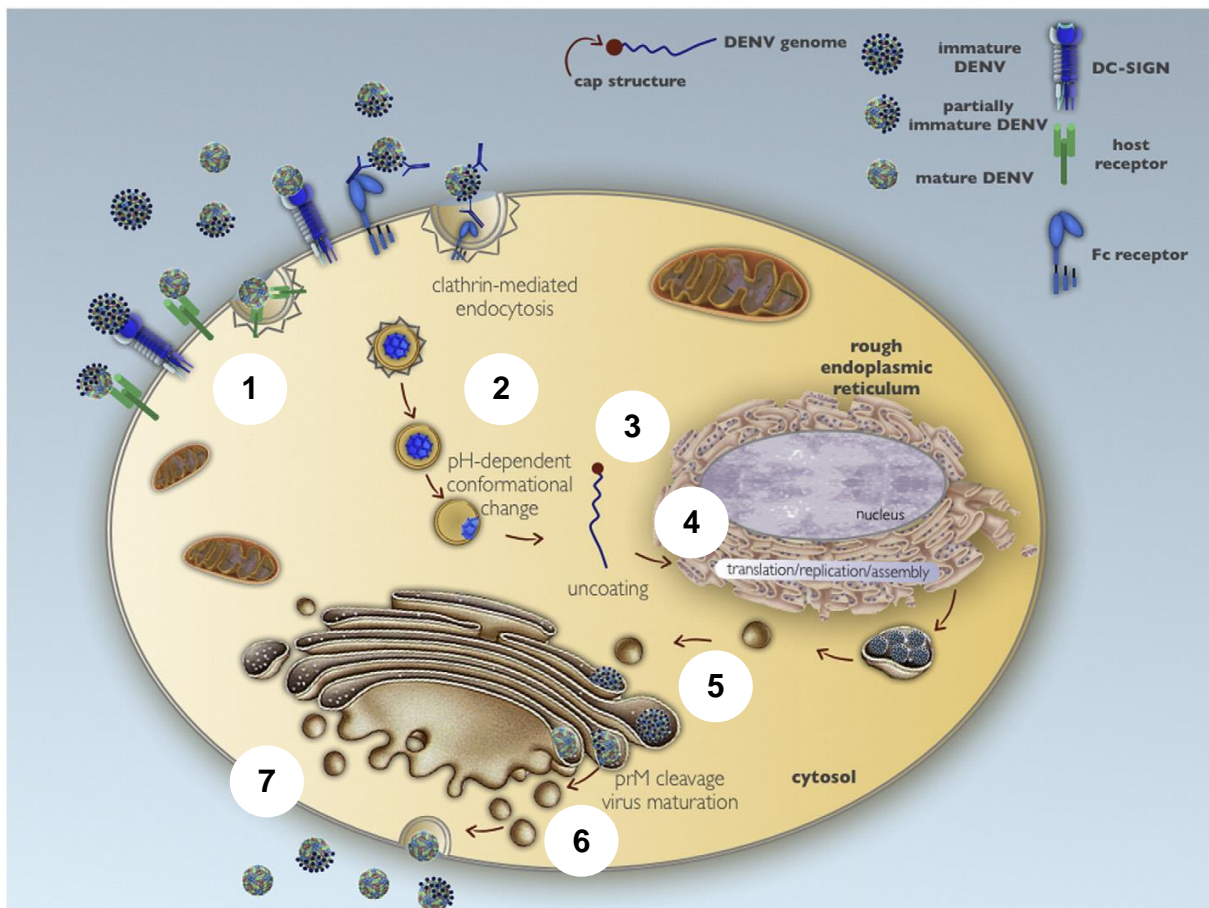


Figura 1.4 Ciclo de replicação do DENV

1) O vírus entra nas células do hospedeiro via endocitose mediada por receptor; 2) Acidificação da vesícula endocítica e rearranjo da proteína prM/M e proteína E; 3) Liberação do RNA viral no citoplasma e migração ao retículo endoplasmático rugoso; 4) Tradução, replicação e montagem do vírus; 5) Transporte ao Complexo de Golgi; 6) Clivagem da proteína PrM e maturação do vírus; 7) Liberação dos novos vírions [Adaptado de Green, 2014 (67)]

1.3 Manifestações clínicas

1.3.1 Fases clínicas

Depois do período de incubação de 3-10 dias após a picada do mosquito, a doença começa abruptamente e pode apresentar três fases (68):

Fase febril: Caracterizada por febre alta de início súbito com duração de 2 a 7 dias, acompanhada de eritema, mal estar geral, mialgia, artralgia, dor retroorbitária e cefaleia (69). Nesta fase, anorexia, náuseas e vômitos são comuns, sendo difícil distinguir dengue de outras doenças febris agudas, mas uma prova do laço positiva pode reforçar a suspeita de dengue (70-72). Podem também ser observadas

manifestações hemorrágicas brandas tais como petéquias e equimoses na pele. Leucopenia acentuada pode também sugerir o diagnóstico (73).

Fase crítica: Caracterizada pelas manifestações clínico-laboratoriais de disfunção endotelial promovida pela infecção viral, com o aumento da permeabilidade capilar e extravasamento de plasma para o espaço extravascular. Esta fase pode durar 24-48 horas, sendo marcada pela queda abrupta da temperatura (defervescência), alterações circulatórias e perfusionais (hipotensão e choque, de início hipovolêmico), derrames serosos (pleural e ascite) e disfunções orgânicas, tais como: insuficiência hepática, encefalite, miocardite e distúrbios de coagulação. Leucopenia progressiva com linfocitose e queda abrupta da contagem plaquetária precedem o extravasamento plasmático, e a elevação progressiva do hematócrito refletirá a magnitude da perda de volume para o terceiro-espaço (70). Derrame pleural e ascite podem ser detectáveis clinicamente ou por exames complementares (radiografia de tórax e ultrassonografia abdominal) na dependência do grau de extravasamento plasmático e do volume da reposição volêmica (74, 75). Dosagem de albumina sérica também pode ser útil na detecção de aumento da permeabilidade vascular (76).

Fase de recuperação: Após 24-48 horas da fase crítica, começa a ocorrer reabsorção do fluido extravascular, estabilização do hematócrito e recuperação progressiva das plaquetas nas 48-72 horas subsequentes. Pode aparecer um exantema do tipo “ilhas brancas em um mar vermelho”. Em geral, há melhora do malestar, mas podem acontecer distúrbios respiratórios, edema pulmonar ou insuficiência cardíaca congestiva caso tenham sido administrados líquidos intravenosos em excesso durante a fase crítica (68).

1.3.2 Classificação clínica, OMS 1997

A infecção pelo DENV causa uma doença de espectro clínico amplo, incluindo desde formas assintomáticas ou oligossintomáticas até quadros com hemorragia e choque, podendo evoluir para o óbito.

Devido ao grande espectro da apresentação clínica da dengue, em 1997, a OMS classificou as infecções sintomáticas em três categorias: Febre indiferenciada, Dengue clássica (DC), Febre Hemorrágica por Dengue (FHD) e Síndrome do Choque de Dengue (SCD) (Figura 1.5) (77).

Dengue clássica (DC): pacientes com doença febril aguda com duração de até 7 dias, acompanhada de cefaléia, prostração, dor retroorbitária, artralgia, exantema e mialgia. Incluía também manifestações hemorrágicas (77).

Febre hemorrágica por dengue (FHD): requeria os seguintes 4 critérios: 1) febre ou história de febre nos últimos sete dias; 2) manifestações hemorrágicas (evidenciado por prova do laço positiva, petéquias, equimoses ou púrpura, sangramento de mucosa do trato gastrointestinal ou outros órgãos); 3) trombocitopenia (plaquetas $< 100.000/mm^3$); e 4) evidência de extravasamento de plasma (evidenciado por um aumento do valor do hematócrito $\geq 20\%$ sobre o basal na admissão, queda do valor do hematócrito $\geq 20\%$ após o tratamento adequado, presença de derrame pleural, ascite ou hipoproteinemia). Por último, a FHD foi classificada em quatro graus (I-IV), correspondendo os graus III e IV às formas mais graves com evolução para o choque (SCD) (77).

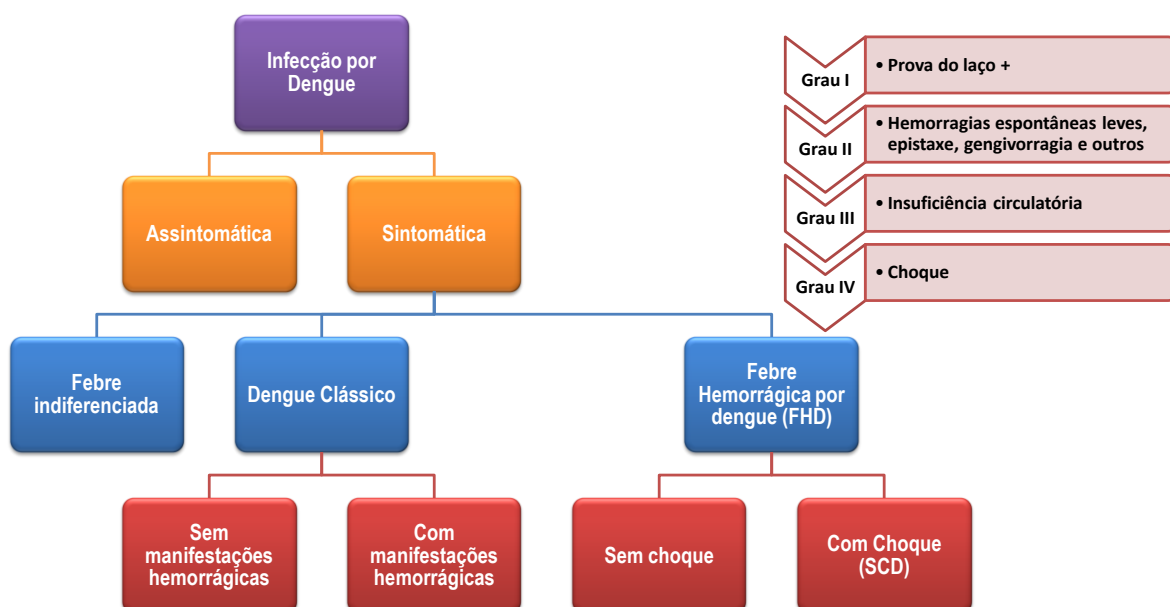


Figura 1.5 Classificação clínica da Dengue [OMS 1997 (77)]

Esta classificação foi baseada principalmente na experiência clínica na Tailândia, e sua adoção generalizada juntamente com a implementação de guias para o manejo do paciente, contribuiu para a queda da sua taxa de letalidade. No entanto, após a expansão global da dengue, vários investigadores relataram uma grande preocupação em relação à exigência dos quatro critérios para sustentar um diagnóstico de FHD e, como resultado, os termos "dengue clássica com manifestações hemorrágicas" e "dengue clássico com sinais de choque" foram introduzidas (78-81).

1.3.3 Classificação clínica, OMS 2009

Baseado nos resultados do estudo multicêntrico DENCO (Dengue control) realizado em pacientes de todas as faixas etárias do Sudeste Asiático e da América Latina (82), a OMS propôs em 2009 uma nova classificação baseada na avaliação clínica e exames laboratoriais amplamente disponíveis, que inclui três categorias (Figura 1.6) (68):

Dengue sem sinais de alarme: presença de sintomas que correspondem à fase febril aguda, caracterizada por mialgias, cefaleia, artralgia, exantemas em variados graus de intensidade.

Dengue com sinais de alarme: definida pelo início da fase crítica e inclui qualquer um dos seguintes sinais: dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, sinal de acúmulo de líquido (derrame pleural, ascite, derrame pericárdico), sangramento de mucosa, letargia ou irritabilidade, hepatomegalia, aumento do hematócrito acompanhado de diminuição das plaquetas. O manejo adequado dos pacientes vai depender do reconhecimento precoce destes sinais.

Dengue grave: definida pela fase crítica na sua maior intensidade e pode incluir grave extravasamento de plasma que leva ao choque ou insuficiência respiratória, sangramento grave ou evolução para disfunção orgânica (fígado, sistema nervoso central, coração e outros).

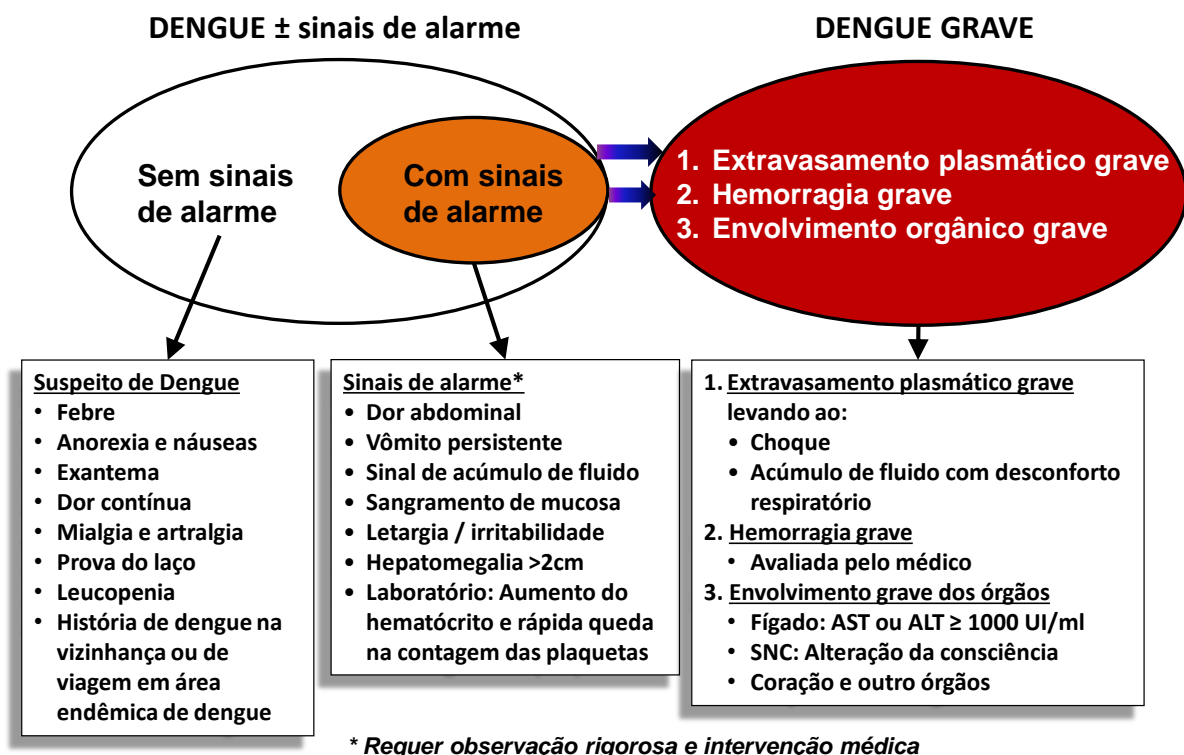


Figura 1.6 Classificação clínica da Dengue [OMS 2009 (68)]

Esta nova classificação tem demonstrado vantagens em relação à classificação anterior no manejo dos pacientes e na vigilância da doença (83-88).

Finalmente, é necessário ter em conta que o diagnóstico diferencial é amplo e varia conforme evolução da doença, podendo incluir outras arboviroses, influenza, enterovírus ou doenças exantemáticas (sarampo, rubéola, etc.). Doenças como febre tifoide, malária, leptospirose, hepatite viral, rickettsiose e sepse bacteriana também devem ser consideradas dependendo do quadro clínico e das informações epidemiológicas locais (1).

1.4 Aspectos imunopatogênicos na dengue

Os mecanismos patogênicos pelos quais o DENV causa doença grave ainda não estão completamente esclarecidos, contudo, acredita-se que a patogênese da doença seja multifatorial (89). A inexistência de um modelo animal que reproduza todas as manifestações clínicas da doença tem dificultado a compreensão da patogenia da dengue (90). Na atualidade, camundongos humanizados (quimera camundongo-humano) e camundongos geneticamente modificados e susceptíveis à infecção pelo DENV estão sendo utilizados no estudo dos mecanismos patogênicos e desenvolvimento de vacinas (91, 92).

1.4.1 Virulência viral

O DENV, quando submetido a uma pressão seletiva apropriada, desenvolve variações genéticas que conferem aumento na sua virulência e no seu potencial epidêmico (93).

Estudos epidemiológicos e filogenéticos associaram o DENV-2 genótipo Sudeste Asiático / Americano com FHD, enquanto que o genótipo Americano foi associado com DC (94-96). Estudo prospectivo realizado em crianças na Ásia demonstrou que as infecções secundárias com os sorotipos DENV-2 seguido pelo DENV-3 tiveram um risco duas vezes maior no desenvolvimento da FHD quando comparado com a infecção sequencial pelo DENV-4 (97). Por outro lado, estudos realizados na população tailandesa demonstraram que as infecções primárias com DENV-1 ou DENV-3 causaram FHD, enquanto DENV-2 ou DENV-4 foram associados com FHD em infecções secundárias (98, 99).

No Brasil, análise filogenética das cepas de DENV-2 isoladas na epidemia ocorrida no ano de 2008 demonstrou que, apesar destes vírus serem do mesmo genótipo que circulou anteriormente, pertencem a uma linhagem específica que forma um grupo monofilético distinto (100). Neste sentido, a reintrodução do DENV-2, associada à evolução viral e à emergência de novas linhagens, aparentemente mais virulentas, causou uma das mais graves epidemias de dengue registrada no país até então, com um maior número de hospitalizações e óbitos em crianças e adultos (101).

1.4.2 Facilitação dependente de anticorpos ou imuno-amplificação da infecção

A resposta imune humoral durante a infecção pelo DENV consiste na produção de anticorpos dirigidos principalmente contra a proteína E. Durante a infecção primária ocorre uma resposta lenta e com baixos títulos de anticorpos da classe IgM. A maioria dos pacientes apresentam níveis detectáveis de IgM no quinto dia de doença e apenas 8% já se encontram positivo nos primeiros dias de doença (102). Já os anticorpos da classe IgG começam a aparecer a partir do quinto dia de doença na infecção primária e permanecem detectáveis por quase toda a vida do indivíduo. Durante a infecção secundária os níveis séricos do anticorpo IgG são detectados precocemente já na fase aguda. No entanto, os níveis séricos de IgM na infecção secundária são mais baixos se comparados à primária. Assim, a relação entre os títulos de IgM e de IgG e a especificidade dos anticorpos tem sido usados na caracterização das respostas primárias e secundárias (68).

A infecção com um sorotipo confere imunidade protetora de longo prazo contra esse sorotipo, mas pode induzir imunidade de curto prazo contra infecção por outros sorotipos (103). Qualquer um dos quatro sorotipos podem causar doença grave e morte (104). Um cenário de hiperendemicidade com vários sorotipos tem sido demonstrado como um fator muito importante para o desenvolvimento de quadros graves da doença. Assim, vários estudos epidemiológicos retrospectivos e prospectivos revelaram que a infecção secundária com um sorotipo heterólogo é um fator de risco para o desenvolvimento de FHD/SCD (105-109)

Segundo o fenômeno ADE (“antibody-dependent enhancement”), os anticorpos heterólogos subneutralizantes preexistentes reconhecem o vírus infectante, formam um complexo antígeno-anticorpo cuja ligação ao receptor Fcγ (FcγR) na célula alvo resulta no aumento da infecção (110). O ADE na infecção

sequencial, pela facilitação da entrada do vírus também influenciaria os mecanismos da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, favorecendo a replicação do DENV (111).

A epidemia de FHD ocorrida em Cuba em 1981, causada pela introdução do DENV-2 quatro anos depois de uma epidemia pelo DENV-1, forneceu dados importantes para corroborar esta teoria (17, 112). Posteriormente, análise dos dados da epidemia em 1997 pelo DENV-2, continuou apoiando esta teoria (107). No entanto, vários estudos não encontraram associação entre infecção secundária e gravidade (113, 114). Posteriormente, outro estudo sugere que os efeitos do fenômeno ADE podem ser influenciados pelo polimorfismo genético do hospedeiro (115).

1.4.3 “Pecado Antigênico Original”

De acordo com este mecanismo, durante uma infecção secundária as células B e T de memória induzidas pela exposição prévia por outro sorotipo responderiam mais rapidamente do que as células ativadas pelo sorotipo viral infectante. Essas células de memória teriam baixa avidéz para os epítomos do sorotipo infectante. Assim, as células T de memória ativadas seriam menos efetivas na eliminação viral, mas teriam alta capacidade de produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, que resultariam numa resposta inflamatória exacerbada (116, 117). Esta ineficácia da resposta celular e humoral nas infecções secundárias contribuiria para o desenvolvimento da forma grave (45).

1.4.4 Mimetismo molecular

Propõe uma resposta de reação cruzada em consequência da semelhança das proteínas do vírus com proteínas do hospedeiro. Estudos em pacientes com FHD/SCD demonstraram que os anticorpos dirigidos contra as proteínas E, NS1 e prM apresentaram reatividade cruzada com plasminogênio (118-120), fatores da coagulação XI, X, IX, VIII, II (121), plaquetas (122) e células endoteliais (123). Esta teoria vem sendo questionada pelo fato de que trombocitopenia e permeabilidade vascular são fenômenos transitórios na dengue, enquanto que os anticorpos causadores da resposta autoimune poderiam perdurar por anos (124).

1.4.5 Polimorfismo genético

Baseia-se nas características individuais e genéticas que influenciariam a susceptibilidade à infecção e a modulação da resposta imunológica do paciente.

Estudos realizados em países hiperendêmicos como Haiti, sugerem que indivíduos de etnia negra teriam maior resistência à FHD (125). Estudos encontraram que variantes dos genes do complexo de histocompatibilidade principal (“Major Histocompatibility Complex” - MHC) estão relacionadas a resistência/susceptibilidade à dengue. Assim, os alelos de classe I, HLA-A*0203 e HLA-A*33 foram associados à proteção, enquanto que os alelos HLA-A*0207 e HLA-A*24 foram associados com a susceptibilidade a FHD em populações asiáticas (126, 127). Estudo realizado no Brasil evidenciou que o alelo de classe II, HLA-DQ1, esteve associado com maior susceptibilidade a gravidade (128). Além desses, o alelo TNF-308A esteve associado com níveis elevados de TNF- α em pacientes venezuelanos com FHD (129). Enquanto polimorfismos de nucleotídeo único (“single nucleotide polymorphism” – SNP) 1801274 do receptor Fc γ R1a e 4804803 do DC-SIGN, foram associados com proteção na população mexicana (130).

1.4.6 Interação Multifatorial

A combinação de fatores do hospedeiro (idade, sexo, etnia, condições nutricionais, antecedente de infecção e resposta imunológica), fatores virais (virulência da cepa, sorotipo e genótipo) e fatores epidemiológicos (população suscetível, densidade vetorial, circulação do vírus e hiperendemicidade) estariam envolvidos no desfecho clínico (131, 132).

1.5 Resposta imune inata e inflamação

A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa contra patógenos. Células que compõem o sistema imune inato [monócitos, células NK (“Natural Killer cells”-NKs), células dendríticas (“Dendritic cells”-DCs) e células dendríticas plasmocitoídes (“Plasmocitoid Dendritic Cells”-pDCs)] possuem os receptores de reconhecimento padrão (“Pattern Recognition Receptors”-PRRs) codificados no hospedeiro e que são expressos no citoplasma, membranas plasmáticas ou endossomais. Os PRRs reconhecem estruturas chamadas de padrões moleculares associados aos patógenos (“Pathogen-associated molecular patterns”-PAMPs) que

são estruturas presentes nos patógenos e essenciais à sua sobrevivência (133). Atualmente, existem quatro classes de PRRs identificados: Receptores semelhantes ao Toll (“Toll-like receptor”-TLR), Receptores de Lectina tipo C (“C-type lectin receptors”-CLR), os Receptores semelhantes ao RIG-1 (“Retinoic acid-inducible gene 1”-RLR) e Receptores semelhantes ao NOD (“NOD-like receptor”-NLR) (134).

Durante infecções virais, a resposta imune inata é ativada pelo reconhecimento de ácidos nucleicos virais através dos PRRs, levando a ativação das células da imunidade inata. A ação efetora dessas células resulta principalmente numa resposta antiviral com produção dos interferons do tipo I (α , β) e na indução da resposta inflamatória com a produção das citocinas e mediadores inflamatórios. Desta forma, a ativação de respostas antivirais e inflamatórias constituem funções primordiais do sistema imune inato (135)

As citocinas são uma classe de proteínas intracelulares com papel crucial nos processos inflamatórios e na manutenção e regulação da resposta imunológica. Agem como mensageiros dentro do sistema imune e também dentro de outros sistemas, formando uma rede integrada altamente envolvida na regulação da resposta imune (136).

A inflamação é uma resposta protetora do organismo para assegurar a remoção dos estímulos prejudiciais bem como um processo de reparo para os tecidos lesionados. A inflamação pode ser causada por vários fatores como, por exemplo, infecções e lesão tecidual. Classicamente, a inflamação é caracterizada por sintomas como inchaço, calor, dor e perda da função do tecido. Esses sinais macroscópicos refletem o aumento da permeabilidade vascular, seguido de extravasamento de componentes séricos e/ou celulares. Em geral, a resposta inflamatória leva ao reparo tecidual e, portanto, finaliza-se rapidamente (137). No entanto, uma exacerbação desta resposta, através da produção exagerada de citocinas pelas células imunológicas, pode ser extremamente prejudicial para o hospedeiro e até mesmo fatal.

O sistema imune inato é o principal agente indutor da inflamação aguda induzida por infecções microbianas. A resposta inflamatória é orquestrada pelas citocinas pro-inflamatórias TNF- α (“Tumor necrose fator α ”), IL-6 (“interleukin”) e IL-1 β que modulam efeitos sistêmicos como a febre e a síntese de “proteínas de fase aguda” pelo fígado (137).

A magnitude e duração das respostas inatas são reguladas por mecanismos inibitórios com intuito de prevenir lesão tecidual. Neste contexto, a IL-10 é uma

citocina imunoreguladora capaz de inibir a produção de várias citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , TNF- α e IL-12 pelos macrófagos e DCs ativadas (138).

1.5.1 Resposta imune inata na dengue: citocinas e mediadores inflamatórios

Durante o repasto sanguíneo pelo vetor, as primeiras células infectadas pelo DENV são as DCs imaturas presentes na pele (57). De fato, as DCs iniciam a produção dos interferons tipo I (α , β) nos estágios iniciais da infecção pelo DENV. As células DCs mieloides e as pDCs são fundamentais na resposta imune inata e direcionam as respostas adaptativas. As pDCs produzem interferons tipo I em resposta aos ácidos nucleicos virais, através do reconhecimento pelos TLR, TLR7 e TLR9, e são importantes mediadoras das respostas antivirais (139). Neste sentido, a indução dos interferon tipo I na fase febril em pacientes com dengue refletiria a ativação da resposta imune inata (140). Da mesma forma, trabalho recente demonstrou aumento significativo de pDC, além de níveis circulantes aumentados de IFN- α , nos casos brandos de dengue (141). Interessantemente, Sun e colaboradores (2009) demonstraram que as pDCs infectadas com DENV *in vitro* produziram IFN- α e expressaram altos níveis de TLR7, mostrando o envolvimento deste receptor no reconhecimento de antígenos virais do DENV (142).

O fenômeno conhecido como “tempestade de citocinas” (“cytokine storm”), resultado de uma intensa resposta inflamatória, é proposto na dengue como um mecanismo que contribui de forma importante para o desenvolvimento de formas graves (143). Desta forma, níveis circulantes elevados de citocinas são detectados durante a infecção pelo DENV. As interleucinas (IL) 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 13, 15, 18, assim como o IFN- γ (“interferon gamma”) foram detectadas diferencialmente no sangue de pacientes com diferentes formas clínicas da doença (quadro 1.1). Algumas citocinas pro-inflamatórias e que induzem o aumento da permeabilidade vascular, como TNF- α e IL-8/CXCL8 foram associadas à gravidade, embora o envolvimento destas no extravasamento plasmático ainda não esteja completamente elucidado (revisto por Srikiatkachorn and Green, 2010)(143).

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas que controlam o padrão de migração e posicionamento das células do sistema imune. Inicialmente, foram destacadas como importantes mediadores da inflamação aguda, mas agora sabemos que este complexo sistema de aproximadamente 50 ligantes endógenos e 20 receptores são

fundamentais na geração das respostas adaptativas. Recentes estudos demonstram importantes papéis deste sistema na ativação das células T virgens, na diferenciação em células T efetoras e de memória, e na função das células T reguladoras. As citocinas secretadas durante a resposta imune inata induzem a produção local das quimiocinas, que resulta no recrutamento dos neutrófilos, monócitos e linfócitos para os tecidos gerando uma amplificação da resposta inflamatória (144).

As quimiocinas também apresentam importante papel na patogênese da infecção. Níveis circulantes aumentados das quimiocinas IP-10/CXCL10 e MCP-1/CCL2 foram encontrados em pacientes graves (145, 146), enquanto que MIP1 β /CCL4 foi associada com um bom prognóstico (147).

Quadro 1.1 Níveis de citocinas e quimiocinas em pacientes com dengue e controles

Fator solúvel	Comparação	Referência
TNF-α	DC, FHD > controles	(148)
	DC c/sangramento, FHD > DC	(149)
	FHD grau 3,4 > FHD grau 1,2	(150)
	DC c/sangramento, DC > controles	(151)
IFN-γ	Graves > brandos	(147)
	Não diferença entre DC e FHD	(149, 152)
	DC > controles	(148)
IL-6	FHD fatais > FHD não fatais > DC	(153, 154)
	Graves > brandos	(147)
	DC = FHD = ODF	(155)
IL-10	FHD > DC	(153)
	DC, FHD > controles	(148)
	FHD > DC	(156, 157)
IL-8/CXCL8	SSD > controles	(158)
	FHD grau 3,4 > FHD grau 1,2, DC	(159)
MCP-1/CCL2	SSD > controles	(158)
	DC > controles	(160)
	DSSA, DCSA > controles	(161)
TGF-β1	Graves > brandos > controles	(162)
RANTES	DC < controles	(160)
	DG, DSSA, DCSA > controles	(161, 163)
MIP1β	DC > controles	(160)
	DG, DSSA, DCSA > controles	(161, 163)
IL-15	DC > controles	(164)
IL-18	Graves > brandos > controles	(162, 165)

FHD: febre hemorrágica por dengue, DC: dengue clássica, DSSA: Dengue com sinais de alarme, DSSA: Dengue sem sinais de alarme, DG: Dengue grave [Adaptado de Srikiatkachorn e colaboradores, 2010 (143)].

1.6 Hemostasia

A hemostasia é um processo dinâmico regulado por vários mecanismos para prevenir hemorragia, e inclui dois processos: hemostasia primária que envolve a constrição vascular, ativação e agregação plaquetária; e hemostasia secundária que envolve a ativação dos mecanismos da coagulação, formação do coágulo, e sua posterior dissolução por fibrinólise (166).

O modelo clássico da cascata da coagulação está constituído por duas vias: intrínseca (via de ativação por contato) e extrínseca (via do “Tissue fator” - TF), que é a principal. Ambas as vias convergem na ativação do fator X (FXa) para ativar a protrombina em trombina, que converte o fibrinogênio numa rede de fibrina. Posteriormente, a fibrinólise é desencadeada pela ativação do plasminogênio em plasmina pelo ativador do plasminogênio tecidual (tPA) ou uroquinase para prevenir a trombose. Em condições normais, coagulação e fibrinólise encontram-se em equilíbrio dinâmico, e a ativação excessiva da fibrinólise levará ao sangramento, enquanto que a inibição da fibrinólise resultará em trombose (166).

Observações experimentais e clínicas mais recentes demonstram que o modelo da cascata da coagulação não reflete completamente os eventos da hemostasia *in vivo* (167). Assim, novo modelo baseado em superfícies celulares foi criado, no qual a hemostasia requer substâncias procoagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina neste local. Neste modelo, o processo de hemostasia é descrito com três fases sobrepostas: iniciação, amplificação e propagação (figura 1.7) (167, 168).

Iniciação

O processo de coagulação sanguínea se inicia quando as células que expressam o TF em sua superfície são expostas ao fluxo sanguíneo no local da lesão. O TF é constitutivamente expresso na superfície das células que circundam a vasculatura (fibroblastos e células musculares), formando um envelope hemostático que previne hemorragias excessivas após uma lesão vascular. (169). Os monócitos e macrófagos normalmente não expressam o TF, mas podem ser estimulados a expressá-lo em condições patológicas (170) e na presença de estímulos tais como LPS (lipopolissacarídeo) e citocinas (TNF- α e IL-1 β) (171). O TF liga-se ao fator VII presente no sangue e rapidamente o ativa formando o complexo TF/VIIa, responsável pela ativação de pequenas quantidades do fator X e também do fator IX. O fator Xa associa-se com o seu cofator, o fator Va, formando um complexo

denominado protrombinase na superfície das células que expressam TF, responsável da conversão de pequenas quantidades de protrombina (fator II) em trombina, proteína fundamental na fase de amplificação (167).

Amplificação

A pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação amplifica o processo da coagulação proporcionando ativação de mais plaquetas, aumentando a adesão das plaquetas e ativando os fatores V, VIII e XI. Plaquetas ativadas liberam fator V na sua forma parcialmente ativada que é então completamente ativada pela trombina ou fator Xa. O fator de vonWillebrand é clivado pela trombina para liberar o fator VIIIa. Plaquetas ativadas têm agora fatores ativados Va, VIIIa e IXa em sua superfície (167).

Propagação

A fase de propagação é caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas. O fator IXa se liga ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase que ativa o fator X. Além disso, o complexo protrombinase intensifica em muito a produção de trombina que converte o fibrinogênio solúvel em fibrina e também ativa o fator XIII (estabilizador da fibrina) para formar o coágulo de fibrina hemostático (167).

1.6.1 Mecanismos reguladores da coagulação

Para controlar a disseminação da ativação da coagulação intervêm quatro anticoagulantes naturais: 1) Inibidor do TF (“Tissue Factor Pathway Inhibitor”-TFPI), 2) Proteína C (PC), 3) Proteína S (PS), 4) Antitrombina (AT) (172).

O TFPI é uma proteína secretada pelas células endoteliais que forma um complexo TF/VIIIa/FXa/TFPI para impedir que a produção de trombina escape do controle (173).

A proteína C é ativada pela trombina que se liga à trombomodulina expressa na superfície das células endoteliais, após a ligação ao receptor EPCR (endothelial protein C receptor-EPCR) (174-176). A proteína C ativada age juntamente com seu cofator, a proteína S para degradar os cofatores de coagulação Va e VIIIa (177).

A antitrombina inibe atividade da trombina e de outras proteases, como os fatores IXa, Xa, XIa e XIIa (178).

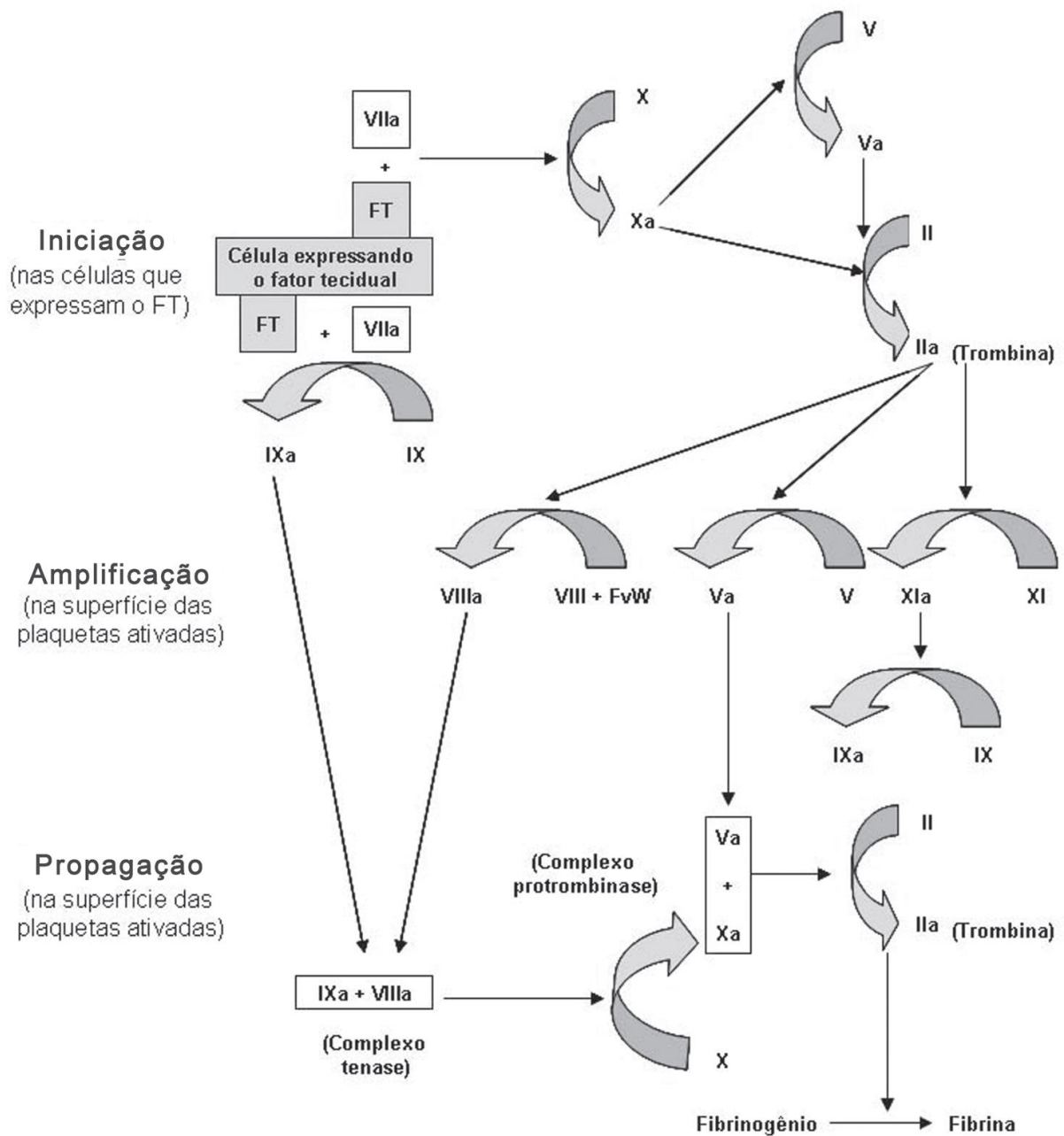


Figura 1.7 Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares [Adaptado de Vine, 2009 (179, 180)]

1.7 Fatores de Coagulação e Resposta Inflamatória

Os fatores de coagulação possuem importantes funções biológicas não apenas na hemostasia, mas também na gestação, reparo tecidual e nas respostas inflamatórias relacionadas à infecção ou doenças. O TF, a trombina e o fibrinogênio apresentam importantes funções no desenvolvimento das respostas inflamatórias (169, 181).

Além do papel pró-coagulante, o TF exerce uma atividade pró-inflamatória ativando receptores de membrana sensíveis a proteases da coagulação, como o Fator VIIa, Fator Xa e trombina. Estes receptores, denominados PAR (“Protease Activated Receptors”-PAR), são expressos em diversos tecidos e estão envolvidos em uma série de fenômenos biológicos de natureza fisiológica ou patológica (182). O complexo TF/VIIa pode ativar o receptor PAR-2, promovendo aumento da resposta inflamatória em macrófagos, o que aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, expressão de moléculas de adesão e de citocinas próinflamatórias e também a migração de neutrófilos. O Fator X pode se ligar ao complexo TF/VIIa, formando o complexo ternário TF/VIIa/Xa, capaz de ativar os receptores PAR-1 e PAR-2, possivelmente potencializando a inflamação (183, 184) (Figura 1.7) . A ativação do PAR-1 pode levar a múltiplas vias de sinalização, incluindo a ativação da PI3 quinase, da família Src de tirosina quinases e da via das ERK e MAP quinases. A ativação do PAR-2 promove a liberação de inositol trifosfato (IP3) e de diacilglicerol (DAG) e o subsequente aumento intracelular de cálcio. Assim, diversas vias podem ser ativadas, como a proteína quinase C e a cascata das ERK e MAP quinases. A mobilização intracelular de cálcio foi determinante na sinalização do NF- κ B, promovida pela ativação do JNK e p38 e mediada pelo PAR-2 em queratinócitos humanos (185).

A liberação de algumas citocinas, como o TNF- α e a IL-6 pode levar a ativação da cascata da coagulação pela via do TF (183, 186). Os fatores de coagulação gerados ativam os receptores PAR, amplificando o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2) e da migração dos leucócitos para o sítio da infecção. Portanto, os processos de coagulação e inflamação estão estritamente relacionados. A coagulação afeta a inflamação que subsequente modula a coagulação. Esta relação bidirecional é mediada pela ativação dos receptores do tipo PAR (183-185).

Fibroblastos e células endoteliais produzem MCP-1/CCL2 (“monocyte chemotactic protein 1”), TNF- α , IL1- β e IL-6 em resposta a trombina e induzem migração de leucócitos (187). Muitas dessas funções são mediadas via receptores PAR, especialmente, o PAR-1 expresso nas plaquetas, células endoteliais vasculares e leucócitos (188). O fibrinogênio é uma proteína solúvel (340 kDa) sintetizada pelos hepatócitos, seus níveis plasmáticos aumentam durante infecção e/ou em processos inflamatórios, sendo considerado um marcador de inflamação aguda (189).

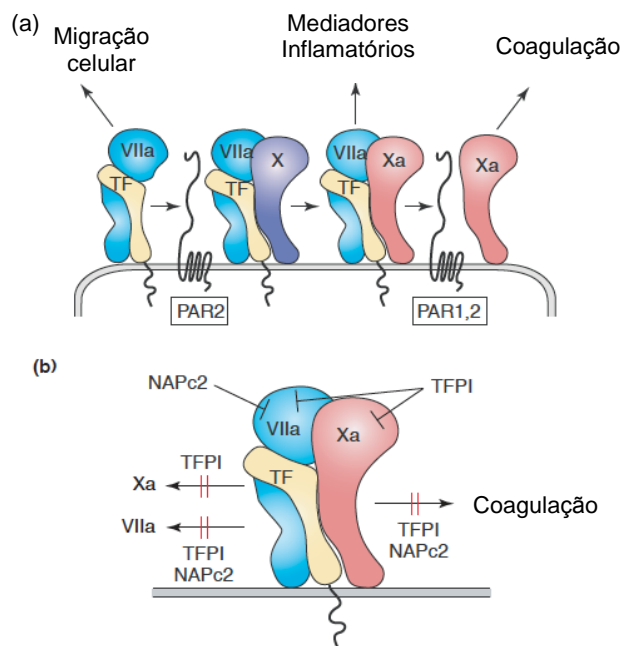


Figura 1.8 Visão geral da relação do TF com os receptores PAR e inibidores da coagulação.

A) Funções do TF durante a inflamação. O complexo TF/VIIa ativa o PAR-2 e esta via de sinalização parece ser importante na regulação da migração celular. Quando células expressando o TF são expostas ao sangue, o fator X é convertido em Xa formando o complexo ternário TF/VIIa/Xa. Neste complexo, sinais gerados via PAR-1 e PAR-2 direcionam a resposta inflamatória. Após liberação do fator Xa, a coagulação é iniciada com geração de trombina, formação de fibrina e ativação das plaquetas. Todos esses três processos contribuem para a inflamação intravascular; B) O complexo TF/VIIa/Xa é alvo de inibição pelo seu inibidor fisiológico, TFPI [Adaptado de Ruf, 2004 (184)].

1.8 Distúrbios da coagulação na dengue

As infecções virais são frequentemente associadas com distúrbios na cascata da coagulação e, conseqüentemente, todos os aspectos da cascata da coagulação, como a hemostasia primária, coagulação e a fibrinólise podem ser afetados (190). Alterações na hemostasia e na biologia vascular em febres hemorrágicas causadas por diversos vírus são descritas na literatura. Essas alterações estariam associadas ao desenvolvimento de uma forma mais grave da doença (186).

As plaquetas são componentes chaves na hemostasia e a trombocitopenia ocorre frequentemente durante as infecções virais, especialmente durante a dengue. Manifestações hemorrágicas, como petéquias, gengivorragias, epistaxe são comuns e hemorragias podem também ocorrer nos casos graves. Durante a infecção pelo

DENV, ocorre um desequilíbrio do sistema hemostático, através da ativação dos sistemas de coagulação e de fibrinólise (191). Esta ativação ocorre precocemente (192), podendo levar a alterações no endotélio e a ativação de células leucocitárias e endoteliais (“endothelial cells”-ECs), que resultam no aumento da permeabilidade vascular e nas manifestações hemorrágicas observadas nos pacientes.

Existe uma ativação de ambos os sistemas (coagulação e fibrinólise) na dengue. Vários trabalhos demonstraram um ligeiro aumento do Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (TTPa), Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Trombina (TT) na fase febril em comparação com a fase de convalescência (193-195). Uma variável diminuição dos mediadores da coagulação, incluindo protrombina, fatores V, VII, VIII, IX, X, antitrombina e α -2 antiplasmina também foram demonstradas durante a fase aguda da FHD (191, 195). É importante ressaltar que o TF foi significativamente maior durante a fase febril, especialmente em pacientes com SCD, seguido de uma normalização gradual durante a fase de convalescência (196). As alterações dos fatores de coagulação provavelmente contribuem para o envolvimento hepático na doença (197).

A expressão aumentada do TF foi detectada em monócitos/macrófagos de primatas infectados pelo vírus Ebola, o que contribuiria de forma importante para o desenvolvimento de distúrbios da coagulação (198). De fato, a inibição do TF atenua a letalidade em modelos experimentais de infecção por esse vírus, com redução dos processos de coagulação e inflamação (199). A ideia de que o aumento na expressão do TF tenha papel importante na patogênese da dengue é reforçada pelas evidências do aumento de seus níveis no plasma de pacientes infectados pelo DENV (196) e aumento de sua expressão em monócitos de pacientes na forma grave da doença (200).

Além disso, estudos mostraram que as células endoteliais de veia umbilical humana (“human umbilical vein endothelial cell” - HUVEC) infectadas pelo DENV experimentam um aumento na expressão do RNAm para o TF e uma concomitante redução na expressão do RNAm do TFPI e, conseqüentemente, da coagulação (201).

1.9 Justificativa

Em 2010, o DENV-4 reemergiu no estado de Roraima, mas os primeiros casos decorrentes da dispersão do vírus foram detectados somente a partir de janeiro de 2011 no Amazonas e Pará (Região Norte). O Brasil viveu em 2013 a maior epidemia em número de casos com aproximadamente 2 milhões de casos notificados e predominância do DENV-4. Todos os sorotipos do DENV são capazes de causar a doença, inclusive as forma graves, no entanto o DENV-4 parece induzir manifestações clínicas mais brandas em comparação com os demais sorotipos. Existem poucos estudos publicados sobre a infecção humana pelo DENV-4. Este é o primeiro trabalho abordando mediadores inflamatórios e marcadores de coagulação na infecção natural pelo DENV-4 em pacientes brasileiros utilizando a nova classificação clínica da OMS (2009).

Na atualidade, os mecanismos patogênicos na dengue não estão completamente esclarecidos. Desta forma, o conhecimento da associação entre marcadores inflamatórios e de coagulação como indicadores potenciais de evolução clínica de acordo com a nova classificação é de extrema importância. Um melhor entendimento da inter-relação dos processos inflamatórios e sangramento poderiam contribuir no direcionamento de novas estratégias terapêuticas.

Além disso, este e outros estudos poderão contribuir na identificação de biomarcadores, que permitam identificar pacientes com risco de desenvolver a forma grave da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar mediadores inflamatórios e de coagulação na infecção natural pelo DENV em pacientes originários da epidemia ocorrida em 2013 no Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as características clínicas e laboratoriais (hematológicas e bioquímicas) dos casos confirmados de dengue segundo a classificação da OMS 2009;
- Quantificar marcadores inflamatórios como citocinas IFN- γ , TNF- α , IL1 β e IL-6, IL-10, e quimiocinas MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, IL-8/CXCL8;
- Quantificar mediadores envolvidos na coagulação através de dosagens plasmáticas do fator tecidual solúvel (sTF), trombomodulina (TM), inibidor fisiológico da via do sTF (TFPI) e fibrinogênio;
- Avaliar correlações dos marcadores inflamatórios e de coagulação com os parâmetros laboratoriais;
- Identificar possíveis biomarcadores de gravidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado estudo observacional transversal para avaliar características clínicas, laboratoriais além de mediadores inflamatórios e parâmetros de coagulação em pacientes infectados pelo DENV originários da epidemia de 2013.

3.1 Estudo populacional

O Laboratório de Imunologia Viral (LIV) mantém colaborações com diferentes centros regionais especializados no atendimento e tratamento de pacientes com dengue: 1) Núcleo do Hospital Universitário/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande no estado do Mato Grosso do Sul (MS) com o Dr Rivaldo Venâncio da Cunha; 2) Hospital Rio-Laranjeiras, Rio de Janeiro (RJ), com o Dr. Paulo Vieira Damasco; 3) Hospital Plantadores de Cana/Centro de Referência em Dengue, Campos dos Goytacazes, RJ, com o Dr Luis José de Souza.

Participaram no estudo 333 casos suspeitos de dengue atendidos nestes centros colaboradores: 162 no Centro de Doenças Infecto-Parasitárias (CEDIP), Posto de Saúde Guanandi e Núcleo do Hospital Universitário/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande no estado do Mato Grosso do Sul (MS); 65 no Hospital Rio-Laranjeiras no RJ; e 105 no Hospital Plantadores de Cana / Centro de Referência em Dengue, Campos dos Goytacazes, no RJ, durante o período de janeiro a março de 2013.

O levantamento dos dados demográficos (idade, sexo, comorbidade) e clínicos (dias de doença, sinais clínicos) foi realizado através do preenchimento de uma ficha clínica previamente elaborada para o projeto (Anexo A). Informações dos resultados de exames laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) foram também analisadas através da consulta dos prontuários com a devida autorização do chefe do serviço de atendimento médico.

Adicionalmente, foram analisadas amostras de doadores saudáveis (controles), que não apresentaram episódios febris nos últimos três meses ou histórico de outras doenças. As amostras negativas para dengue coletadas durante o período de estudo foram consideradas como um grupo acometido por outras doenças febris (ODF).

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC) segundo o protocolo de aprovação Nº 13318113.7.0000.5248 (Anexo B). O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de cada indivíduo antes da participação na pesquisa (Anexo C).

3.2 Definições de caso de dengue

3.2.1 Caso suspeito de dengue

Para a identificação dos casos suspeitos de dengue foram utilizados os critérios relatados no guia do Ministério da Saúde, 2010 (101). Desta forma, os casos suspeitos de dengue foram todos os pacientes que apresentaram doença febril aguda, com duração máxima de sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos sinais ou sintomas como cefaleia, dor retroorbitária, mialgia, artralgia, prostração ou exantema, associados ou não a presença de sangramentos ou hemorragias, com história epidemiológica positiva para dengue.

3.2.2 Caso confirmado de dengue

O diagnóstico de dengue foi confirmado pela positividade de pelo menos um dos seguintes métodos, no Laboratório de Flavivírus, IOC-Fiocruz:

- a) Detecção do antígeno viral NS1 pelo kit Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, França);
- b) Detecção de anticorpos IgM anti-dengue pelo kit Panbio® Dengue IgM capture ELISA (Panbio Inc., Columbia, Maryland, EUA);
- c) Detecção do RNA viral por RT-PCR.

3.2.3 Classificação clínica dos casos

Após a confirmação laboratorial, os pacientes foram agrupados segundo a classificação da OMS 2009 em: Dengue sem sinais de alarme (DSSA), Dengue com sinais de alarme (DCSA) e Dengue grave (DG).

Dengue sem sinais de alarme (DSSA)

Paciente com quadro clínico suspeito não apresentando sinais de alarmes ou demais critérios de gravidade.

Dengue com sinais de alarme (DCSA)

Paciente com quadro clínico suspeito que apresente qualquer um dos seguintes sinais de alarme:

- Dor abdominal intensa e contínua,
- Vômitos persistentes,
- Sinal de acumulação de líquido (derrame pleural, ascite, etc),
- Sangramento de mucosa,
- Letargia ou irritabilidade,
- Hepatomegalia,
- Aumento do hematócrito com rápida queda das plaquetas.

Dengue Grave (DG)

Os casos graves de dengue foram definidos por apresentar pelo menos um dos seguintes critérios:

- Extravasamento de plasma grave que leva ao choque ou insuficiência respiratória,
- Sangramento grave
- Evidência de disfunção orgânica grave (fígado, sistema nervoso central, coração ou outros).

3.2.4 Infecção primária e secundária

A análise de anticorpos IgG específicos foi realizada a fim de determinar se a infecção era primária ou secundária utilizando o kit Dengue Virus IgG DxSelect (EL1500G, Focus Diagnostics, Cypress, CA, EUA). O padrão de resposta primária ou secundária de cada paciente DENV+ foi determinado baseado no conjunto dos testes de IgM específico, NS1 e/ou RT-PCR, IgG específico, e utilizamos a taxa IgM/IgG, sugerida pela OMS, como ferramenta para avaliar o tipo de infecção (68). Essa avaliação foi baseado no trabalho de Souza e colaboradores, 2007 (202). De acordo com a positividade de IgG e a taxa de IgM/IgG os pacientes foram classificados:

Infecção primária: pacientes com confirmação para NS1 e/ou identificação do sorotipo viral por RT-PCR e/ou IgM. Mas IgG negativos ou taxas de IgM/IgG >2.0.

Infecção secundária: pacientes com resultados NS1 e/ou identificação do sorotipo viral por RT-PCR e/ou IgM. Mas IgG positivos ou taxas de IgM/IgG <2.0.

3.3 Exames hematológicos e bioquímicos

Os parâmetros laboratoriais hematológicos (contagem de plaquetas, leucócitos, monócitos, linfócitos totais) e bioquímicos (AST/TGO, ALT/TGP e Proteína C reativa) foram avaliados entres os diferentes grupos de estudo (DSSA, DCSA/DG e ODF). Esses parâmetros não foram avaliados nos controles.

3.4 Ensaio para avaliação dos mediadores inflamatórios

3.4.1 Quantificação dos fatores solúveis citocinas e quimiocinas por Luminex®: TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-8/CXCL8

Os fatores solúveis TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-8/CXCL8 foram quantificados no soro dos pacientes (n=180) e controles (n=10) por tecnologia Luminex® de acordo com as especificações do fabricante (kit R&D Systems, MN, EUA). O imunoenensaio de detecção multiplex Luminex® consiste na detecção de várias citocinas simultaneamente numa única amostra de soro utilizando microesferas específicas para cada citocina. Assim, microesferas de propriedades espectrais definidas são conjugadas aos anticorpos de captura específicos da citocina. Brevemente, microesferas, padrões, controles fornecidos pelo kit e as amostras dos pacientes foram plaqueadas em placa de 96 poços, com filtro no fundo de cada poço, seguido de incubação por 3 horas sob agitação. Após incubação, a placa foi lavada utilizando-se um sistema à vácuo e adicionado em cada poço uma mistura de anticorpos biotinilados de detecção para cada microesfera e incubação de 1 hora a temperatura ambiente. Após várias lavagens, a reação foi seguida adicionando estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE) em cada poço e incubação por 30 min. As microesferas foram ressuspendidas em tampão fornecido pelo kit e a leitura da placa foi realizada no aparelho Luminex® Instrumentation System (Luminex, Austin, TX, EUA). O aparelho Luminex® determina a propriedade espectral da microesfera e a quantidade de fluorescência associada a PE e, assim, a concentração das citocinas presentes nas amostras de soro. A média de intensidade de fluorescência é medida pelo aparelho e as concentrações de citocinas foram calculadas em pg/ml.

3.4.2 Quantificação dos fatores solúveis citocinas e quimiocinas por ELISA

MCP1/CCL2 e IFN- γ

Para a quantificação da quimiocina MCP-1/CCL2 (n=64) e da citocina IFN- γ (n=28) nos pacientes, 100 μ l do anticorpo de captura à concentração de 0,25 μ g/mL para MCP1/CCL2 e 1 μ g/mL para o IFN- γ diluídos em PBS pH 7,2 foram adicionados aos poços em placa de 96 poços (Falcon-BD) seguido de incubação por 18 horas à temperatura ambiente (TA). Ao final da incubação, foram feitas quatro lavagens com solução de lavagem (Tween-20 0,05% em PBS pH 7,2) e então adicionados 200 μ L de solução de bloqueio (BSA 5% em PBS pH 7,2) por poço. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, foram realizadas 4 lavagens com tampão de lavagem. Curvas padrões foram preparadas através de diluições seriadas do respectivo padrão fornecido pelo fabricante (tabela 3.1). As amostras de plasma dos pacientes e controles foram diluídas 10 vezes para a dosagem de MCP1/CCL2 em solução diluente (Tween-20 0,05%,BSA 0,1% em PBS pH7,2). Para a dosagem plasmática do IFN- γ as amostras não foram diluídas. Foram adicionados 100 μ L das amostras de plasma e das diluições da curva padrão aos poços da placa, que foi incubada por 2 horas à TA. Ao final da incubação, a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem e, em seguida, adicionados 100 μ L do anticorpo de detecção na concentração de 0,25 μ g/mL para o MCP1/CCL2 e 1 μ g/mL para IFN- γ . Após 2 horas de incubação à TA, foram feitas 4 lavagens com tampão de lavagem e, posteriormente, adicionados 100 μ L do conjugado Avidina-HRP (“horseradish peroxidase”) por poço, diluído 1/2000 em diluente, e então incubado por 30 minutos à TA. Finalmente, 100 μ L do substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzedina (TMB)(Sigma) foram adicionados em cada poço da placa. A leitura da densidade óptica das amostras e diluições da curva padrão foi realizada no espectrofotômetro Expert Plus a 620 nm.

IP-10/CXCL10

Para a quantificação da quimiocina IP-10/CXCL10 nos pacientes (n=66), 100 μ l do anticorpo de captura à concentração de 0,25 μ g/mL diluídos em PBS pH 7,2 foram adicionados aos poços numa placa de 96 poços (Falcon-BD) e incubados por 18 horas à TA. Ao final da incubação, foram feitas quatro lavagens com solução de lavagem (Tween-20 0,05% em PBS pH 7,2) e então adicionados 200 μ L de solução

de bloqueio (BSA 5% em PBS pH 7,2) por poço. Após 2 horas de incubação à TA, foram realizadas 4 lavagens com tampão de lavagem. Curvas padrões foram preparadas através de diluições seriadas do respectivo padrão fornecido pelo fabricante (tabela 3.1). As amostras de plasma dos pacientes e controles foram diluídas 10 vezes em solução diluente (Tween-20 0,05%,BSA 0,1% em PBS pH7,2). Foram adicionados 100 µL das amostras de plasma e das diluições da curva padrão aos poços da placa, que foi incubada por 2 horas à TA. Ao final da incubação, a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem e, em seguida, foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção na concentração de 0,25 µg/mL. Após 2 horas de incubação à TA, foram feitas 4 lavagens com tampão de lavagem e, posteriormente, adicionados 100 µL do conjugado Avidina–HRP por poço, diluído 1/2000 em diluente, e então incubado por 30 minutos à TA. Finalmente, 100 µL do substrato TMB (Sigma) foram adicionados à placa por poço. A leitura da densidade óptica das amostras e diluições da curva padrão foi realizada no espectrofotômetro Expert Plus a 620 nm.

IL-6

Para a quantificação da citocina IL-6 nos pacientes (n=66), 100 µl do anticorpo de captura à concentração de 2.5 µg/mL diluídos em PBS pH 7,2 foram adicionados aos poços numa placa de 96 poços (Falcon-BD) e incubados a 4°C por 18 horas. Ao final da incubação, foi feita uma lavagem com solução de lavagem (Tween-20 0,5% em PBS pH 7,2) e então adicionados 250 µL de solução de bloqueio (BSA 5% em PBS pH 7,2) por poço. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, foram realizadas 2 lavagens com tampão de lavagem. Curvas padrões foram preparadas através de diluições seriadas do respectivo padrão fornecido pelo fabricante (tabela 3.1). Foram adicionados 50 µL das amostras de plasma e das diluições da curva padrão aos poços da placa, que foi incubada por 2 horas à TA. Ao final da incubação, a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem e, em seguida, adicionados 50 µL do anticorpo de detecção na concentração de 0,25 µg/mL. Após 2 horas de incubação à TA, foram feitas 4 lavagens com tampão de lavagem e, posteriormente, adicionados 100 µL do conjugado streptavidina–HRP por poço, diluído 1/5000 em diluente, e então incubado por 30 minutos à TA. Finalmente, 100 µL do substrato TMB (Sigma) foram adicionados à placa por poço. A leitura da densidade óptica das amostras e diluições da curva padrão foi realizada no espectrofotômetro Expert Plus a 620 nm.

3.5 Ensaios para avaliação dos parâmetros de coagulação

3.5.1 Quantificação dos parâmetros de coagulação por ELISA

Fator tecidual solúvel (sTF)

Para a dosagem de sTF, as amostras de plasma de pacientes (n=68) foram diluídas previamente duas vezes em diluente fornecido pelo kit. Cem µl do diluente foram adicionados a todos os poços da placa de 96 poços já sensibilizada, seguido da adição de 100 µl das amostras dos pacientes diluídas e curva padrão. A curva padrão foi feita a partir de diluições seriadas de um padrão também fornecido pelo kit. Seguiu-se uma incubação por 2 horas à temperatura ambiente em agitador e ao final da incubação, os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, 200 µl de anticorpo policlonal específico para TF conjugado a peroxidase (HRP) foram adicionados em todos os poços e incubados por 2 horas à TA em agitador. A placa foi novamente lavada por quatro vezes com tampão de lavagem e 200 µl do substrato TMB foram adicionados aos poços. Seguiu-se nova incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi finalizada pela adição de 50 µl da solução de bloqueio (ácido sulfúrico 2 N) e leitura das densidades ópticas no espectrofotômetro Expert Plus a 450nm.

Inibidor do TF (TFPI)

Para a dosagem de TFPI, as amostras de plasma de pacientes (n=63) foram diluídas previamente 100 vezes em diluente fornecido pelo kit. Cem µl do diluente foram adicionados a todos os poços da placa de 96 poços já sensibilizada, seguido da adição de 50 µl das amostras dos pacientes diluídas e curva padrão. A curva padrão foi feita a partir de diluições seriadas de um padrão também fornecido pelo kit. Seguiu-se uma incubação por 2 horas à temperatura ambiente em agitador e ao final da incubação, os poços foram lavados com tampão de lavagem. Em seguida, 200 µl de anticorpo policlonal específico para TFPI conjugado a peroxidase (HRP) foram adicionados em todos os poços e incubados por 1 hora à temperatura ambiente em agitador. A placa foi, em seguida, lavada por três vezes com tampão de lavagem e 100 µl de substrato TMB foram adicionados aos poços. Seguiu-se nova incubação por 30 minutos à TA. A reação foi finalizada pela adição de 50 µl da solução de bloqueio (ácido sulfúrico 2 N) e leitura das densidades ópticas no espectrofotômetro Expert Plus a 450nm.

Trombomodulina (TM)

Por fim, para a dosagem de Trombomodulina, as amostras de plasma de pacientes (n=65) foram diluídas previamente 10 vezes em diluente fornecido pelo kit. Cem µl do diluente foram adicionados a todos os poços da placa de 96 poços já sensibilizada, seguido da adição de 50 µl das amostras dos pacientes diluídas e curva padrão. A curva padrão foi feita a partir de diluições seriadas de um padrão também fornecido pelo kit. Seguiu-se uma incubação por 2 horas à TA em agitador e, ao final da incubação, os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, 200 µl de anticorpo policlonal específico para trombomodulina conjugado a peroxidase (HRP) foram adicionados em todos os poços e incubados por 2 horas à temperatura ambiente em agitador. A placa foi novamente lavada por quatro vezes com tampão de lavagem e 200 µl de substrato TMB foram adicionados aos poços. Seguiu-se nova incubação por 30 minutos à TA ambiente. A reação foi finalizada pela adição de 50 µl da solução de bloqueio (ácido sulfúrico 2 N) e leitura das densidades ópticas no espectrofotômetro Expert Plus a 450nm.

Quadro 3.1 Referencias dos Kits de ELISA utilizados

Molécula	Curva padrão (pg/ml)	Número do catálogo	Fabricante
Human TFPI Immunoassay	2000-31,2	DTFP10	R&D Systems
Human thrombomodulin/BDCA-3 immunoassay	40000 -62,5	DTHBD0	R&D Systems
Human Coagulation Factor III/Tissue Factor Imunoassay	5000 -7,8	DCF300	R&D Systems
MCP-1/CCL2	1000-15,62	900-k31	Peprotech
IP-10/CXCL10	1000-10	900-K39	Peprotech
IL-6	100-1,56	BMS213/2MST	eBioscience
IFN-γ	1000-21,8	900-K27	Peprotech

3.5.2 Dosagem do Fibrinogênio

A dosagem do fibrinogênio plasmático foi realizada em 104 pacientes DENV+ no serviço de hematologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) em colaboração com o Dr. Professor Adilson José de Almeida.

3.6 Análise estatística

Todos os dados clínicos e laboratoriais foram registrados num banco de dados no programa EpiData Versão 3.1.

Na análise estatística de variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher.

Uma vez que os dados do estudo não apresentaram distribuição normal, as diferenças das médias foram comparadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney U para dois grupos e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com o pós-teste de comparação de Dunn ou o pós-teste de tendência linear, na comparação de três ou mais grupos.

O teste de Spearman foi utilizado na análise das correlações das citocinas, quimiocinas e parâmetros de coagulação estudados com os dados laboratoriais (hematológicos e bioquímicos).

Finalmente, para avaliar a capacidade discriminatória na predição da gravidade dos biomarcadores selecionados foi utilizada a área sob a curva ROC ("Receiver Operating Characteristic"), que é um gráfico de sensibilidade (ou taxa de verdadeiros positivos) versus taxa de falsos positivos (1 – especificidade) com valores de AUC ("area under curve") de: 0,97-1,0 (ótimo), 0,9-0,97 (muito bom), 0,75-0,9 (bom), 0,6-0,75 (regular) e 0,5-0,6 (ruim).

Em todas as análises foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 . Valores de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

No ano de 2013 foram coletadas 333 amostras de sangue de pacientes com suspeita clínica de infecção pelo DENV. Dos 333 casos, 227 pacientes (68,2%) apresentaram diagnóstico de infecção pelo DENV e foram incluídos no estudo. Noventa e um (27%) pacientes foram negativos constituindo o grupo ODF, e 15 (4,5%) apresentaram diagnóstico inconclusivo e foram excluídos da análise.

4.1 Características clínicas e demográficas dos casos confirmados de dengue

Segundo a classificação clínica da OMS 2009, os casos confirmados de dengue foram organizados em grupos: 158 pacientes (70,2%) foram classificados como dengue sem sinais de alarme (DSSA), 65 pacientes (28,9%) foram classificados como dengue com sinais de alarme (DCSA) e apenas dois pacientes (0,9%) foram classificados como dengue grave (DG). Dois pacientes foram excluídos devido a ausência de informação nas fichas de estudo (fig. 4.1).

Todos os pacientes, incluindo os ODF, encontraram-se entre 1°-10° dias de doença, contados a partir do aparecimento dos primeiros sintomas.

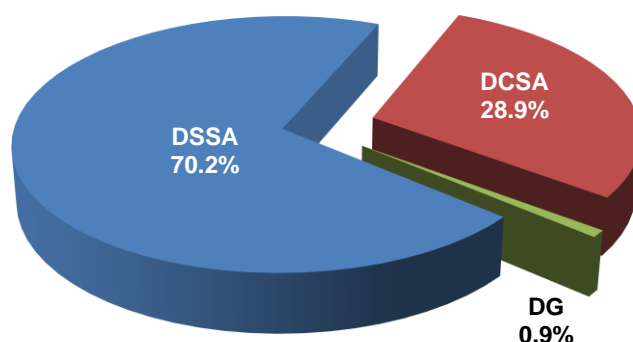


Figura 4.1 Classificação dos casos confirmados de dengue, RJ e MS 2013

Os sinais de alarme mais frequentes nos pacientes DCSA foram: dor abdominal persistente (40; 61,5%), sangramento de mucosas (21; 32,3%), aumento do hematócrito com rápida queda da contagem das plaquetas (18; 27,7%) e sinais de acúmulo de fluido (6; 9,2%). Os sangramentos de mucosa identificados foram epistaxe (6; 24%), gengivorragia (6; 24%), metrorragia (4; 19%), hemorragia

digestiva (4; 19%) e hematúria (2; 10%). Os sinais de acúmulo de fluido identificados foram ascite (5; 83,3%) e derrame pleural (3; 50%).

Em relação aos casos de dengue grave, um paciente apresentou Síndrome de Guillain-Barré e outro hepatite grave (AST/TGO e ALT/TGP > 1000 UI/l). Os dois pacientes graves foram incluídos na análise em conjunto com os pacientes DCSA (DCSA/DG).

Na avaliação dos dados demográficos, 57,8% foram mulheres e 42,2% homens; a mediana da idade é de 36 anos; 49,8% dos casos são provenientes do RJ e 50,2% do MS; 31,1% apresentaram comorbidade, sendo hipertensão arterial a mais frequente (18,2%), com mediana de cinco dias de doença, contados a partir do início de sintomas (tabela 4.1).

Entre os grupos DSSA e DCSA, não foram observadas diferenças significativas em relação às variáveis idade, sexo, procedência e presença de comorbidade. Observamos diferença significativa em relação aos dias de doença com mediana de quatro dias nos pacientes DSSA e seis dias nos pacientes DCSA/DG ($p < 0.001$) (tabela 4.1).

Tabela 4.1 Dados demográficos dos casos confirmados de dengue segundo classificação clínica, RJ e MS 2013

	DSSA (n=158)	DCSA + DG (n=67)	P	Total (n=225)
Idade				
média ± DP	38.7 ± 15.7	38.9 ± 17.9	0.932	38.8 ± 16.3
Sexo				
F	57.3%	58.8%	0.769	57.8%
M	42.7%	41.2%		42.2%
Procedência				
RJ	48.7%	52.2%	0.664	49.8%
MS	51.3%	47.8%		50.2%
Comorbidade				
Hipertensão arterial	30.4%	32.8%	0.876	31.1%
Diabetes mellitus	17.7%	19.4%	0.850	18.2%
Outras	3.2%	4.5%	0.698	3.6%
	11.4%	13.4%	0.826	12.0%
Dias de doença				
média ± DP	4.9 ± 2.7	6.4 ± 2.9	< 0.001	5.4 ± 3.7

Na análise estatística foi utilizado o teste exato de Fisher para variáveis qualitativas e o teste de Mann-Whitney para variáveis quantitativas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.2 Características laboratoriais dos casos confirmados de dengue

Em relação aos testes diagnósticos confirmatórios utilizados, resposta de anticorpos IgM foi detectada em 55,1% dos pacientes, detecção do antígeno NS1 em 44,4% e detecção do RNA viral através da RT-PCR em 37,8%. O teste ELISA IgM demonstrou maior confirmação nos pacientes DCSA/DG (80,6%) enquanto os testes ELISA AgNS1 e RT-PCR demonstraram maior confirmação nos pacientes DSSA (tabela 4.2). Em relação com o número de dias de doença, 36,1% dos pacientes DSSA e apenas 11,9% dos pacientes DCSA/DG tiveram uma coleta de sangue nos primeiros três dias de doença (tabela 4.3).

Tabela 4.2 Distribuição dos casos confirmados de dengue segundo teste diagnóstico e classificação clínica, RJ e MS 2013

Teste diagnóstico*	DSSA (n=158)		DCSA + DG (n=67)		Total (n=225)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
ELISA IgM	70	(44.3%)	54	(80.6%)	124	(55.1%)
ELISA AgNS1	77	(48.7%)	23	(34.3%)	100	(44.4%)
RT-PCR	70	(44.3%)	15	(22.4%)	85	(37.8%)

(*) O diagnóstico foi confirmado pela positividade de pelo menos um dos três testes

Tabela 4.3 Distribuição dos casos confirmados de dengue segundo dias de doença até coleta da amostra, RJ e MS 2013

Dias de doença	DSSA (n=158)	DCSA/DG (n=67)	Total (n=225)
1-3 dias	36.1%	11.9%	28.9%
4-7 dias	50.0%	62.7%	53.8%
> 7 dias	13.9%	25.4%	17.3%

4.3 Tipagem dos sorotipos do DENV

A tipagem dos DENV através da RT-PCR identificou os seguintes sorotipos: DENV-4 (95,3%), DENV-1 (3,5%) e DENV-2 (1,2%). No Campos dos Goytacazes apenas o sorotipo DENV-4 foi identificado (34; 100%); no Hospital Rio Laranjeiras foram encontrados os sorotipos DENV-1 (2; 10%) e DENV-4 (18; 90%); e no Campo Grande, MS, foram encontrados os sorotipos DENV-1 (1; 3,2%), DENV-2 (1; 3,2%) e DENV-4 (29; 93,5 %). O sorotipo DENV-4 foi predominante com 95,3% de positividade entre os diferentes centros regionais estudados (tabela 4.4).

Tabela 4.4 Distribuição dos sorotipos segundo procedência, RJ e MS 2013

Procedência	DENV-1 (n=3)	DENV-2 (n=1)	DENV-4 (n=81)
Hospital Rio Laranjeiras, RJ	10.0%	0.0%	90.0%
Campo de Goytacazes, RJ	0.0%	0.0%	100.0%
Campo Grande, MS	3.2%	3.2%	93.5%
Total	3.5%	1.2%	95.3%

4.4 Caracterização da infecção primária e secundária

Na avaliação do tipo de infecção, 14,8% dos pacientes foram classificados como infecção primária e 85,2% como infecção secundária. Os resultados demonstraram que a maioria dos pacientes DCSA/DG apresentou infecção secundária em comparação com os pacientes DSSA, proporção estatisticamente significativa ($p=0.013$) (tabela 4.5).

Tabela 4.5 Distribuição dos casos confirmados de dengue segundo tipo de infecção primária ou secundária, RJ e MS 2013

Tipo de infecção	DSSA	DCSA/DG	P*	Total
Infecção primária	19.2%	5.3%	0.013	14.8%
Infecção secundária	80.8%	94.7%		85.2%
Total	100.0%	100.0%		100.0%

(*) Na análise estatística foi utilizado o teste exato de Fisher. Valores de $p<0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.5 Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Em relação aos parâmetros hematológicos, observamos que os pacientes DCSA/DG apresentaram contagens significativamente mais baixas de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas, quando comparados com os pacientes com DSSA e o grupo ODF. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos em relação aos valores do hematócrito (tabela 4.6).

Encontramos que 24% dos casos confirmados de dengue apresentaram trombocitopenia. Assim, 10,7% dos pacientes DSSA e 54% dos pacientes DCSA/DG apresentaram contagem <100.000 plaquetas/ mm^3 . Além disso, 27% dos pacientes DCSA/DG apresentaram contagem <50.000 plaquetas/ mm^3 .

Tabela 4.6 Parâmetros hematológicos nos grupos ODF, DSSA e DCSA/DG

Parâmetros hematológicos*	ODF	DSSA	DCSA/DG	P
Hematócrito (max) %	42.4 ± 0.4 (n=78)	41.9 ± 0.3 (n = 139)	43.1 ± 0.6 (n = 62)	NS
Leucócitos (min) cél/mm ³	6242 ± 345.5 (n=78)	4440 ± 187.6 (n = 139)	3671 ± 211.7 (n = 62)	<0.0001
Neutrófilos (min) cél/mm ³	3787 ± 350.2 (n=56)	2450 ± 135.9 (n = 109)	1836 ± 168.7 (n = 51)	0.0001
Linfócitos (min) cél/mm ³	1629 ± 73.3 (n=71)	1470 ± 90.6 (n = 134)	1223 ± 83.5 (n = 59)	0.0005
Monócitos (min) cél/mm ³	511 ± 29.1 (n=71)	446 ± 19.1 (n=133)	374 ± 36.2 (n=56)	0.0009
Plaquetas (min) x 10 ³ /mm ³	188 ± 8.0 (n=78)	172 ± 5.5 (n = 140)	109 ± 9.4 (n = 63)	<0.0001

(*) Valores expressos como média ± SEM, n: número de pacientes, ODF: outras doenças febris, máx: valores máximos, mín: valores mínimos, NS: não significativo. Na análise estatística dos grupos ODF, DSSA e DCSA/DG foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. Valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

A análise dos parâmetros hematológicos segundo dias de doença demonstrou um incremento significativo dos valores de hematócrito e uma diminuição na contagem de plaquetas nos pacientes entre 4-7 dias de doença em relação aos pacientes entre 1-3 dias de doença; além disso, os pacientes entre 4-7 dias de doença apresentaram uma contagem de leucócitos significativa abaixo do valor normal em relação aos pacientes com mais de 7 dias de doença (fig. 4.2).

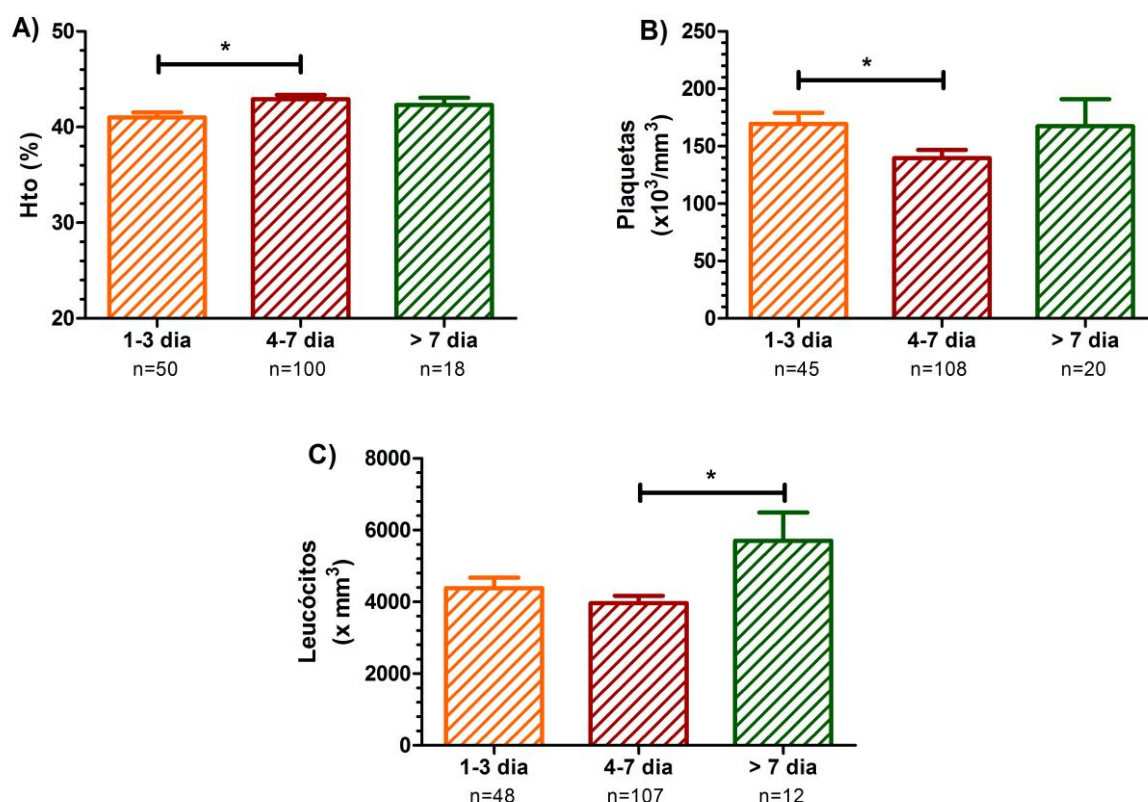


Figura 4.2 Parâmetros hematológicos dos casos confirmados de dengue segundo dias de doença

A) Dosagem do hematócrito, B) Contagem de plaquetas, C) Contagem de leucócitos. Na análise estatística dos grupos segundo dias de doença foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. Valores de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ foram considerados estatisticamente significativos.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, os pacientes com dengue (DSSA e DCSA/DG) apresentaram níveis significativamente elevados de transaminases quando comparadas com o grupo ODF. Além disso, os pacientes com DCSA/DG apresentaram níveis significativamente mais elevados das enzimas aspartato aminotransferase (AST) / transaminase glutâmico oxalacética (TGO) ($p < 0.0001$) e alanina aminotransferase (ALT) / transaminase glutâmico pirúvica (TGP) ($p = 0.002$) em relação aos pacientes com DSSA (tabela 4.7).

De acordo com a tabela 4.8, observamos que 63,5% e 69,8% dos pacientes apresentaram níveis acima do valor normal de AST/TGO e ALT/TGP, respectivamente. Níveis elevados de AST/TGO foram encontrados em 50% dos pacientes DSSA e 80,4% dos pacientes DCSA/DG; além disso, cinco pacientes DCSA/DG apresentaram aumento superior a 10 vezes do valor normal. Em relação a ALT/TGP, 64% dos pacientes DSSA e 71,7% dos pacientes DCSA/DG

apresentaram níveis acima do valor normal, e dois pacientes DCSA/DG apresentaram aumento superior a 10 vezes do valor normal.

Tabela 4.7 Parâmetros bioquímicos nos grupos ODF, DSSA e DCSA/DG

Parâmetros bioquímicos*	ODF	DSSA	DCSA/DG	p
TGO max (UI/l)	37.41 ± 3.6 (n=44)	53 ± 4.1 (n = 86)	180 ± 34.4 (n = 46)	<0.0001
TGP max (UI/l)	48.14 ± 3.9 (n=44)	65 ± 4.9 (n = 86)	150 ± 31.1 (n = 46)	<0.0001
Proteína C reativa (mg/dl)	6.825 ± 2.9 (n=8)	17.3 ± 5.1 (n = 26)	39.8 ± 11.8 (n = 16)	0.185

(*) Valores expressos como média ± SEM, n: número de pacientes, ODF: outras doenças febris, máx: valores máximos, NS: não significativo. Na análise estatística dos grupos ODF, DSSA e DCSA/DG foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 4.8 Classificação dos casos de dengue segundo os níveis de transaminases

Níveis de transaminases	DSSA (n=86)		DCSA/DG (n=46)		Total (n=126)	
AST/TGO, n (%)						
VN	43	(50.0%)	9	(19.6%)	52	(41.3%)
> VN	43	(50.0%)	37	(80.4%)	80	(63.5%)
> 10X VN	0	(0.0%)	5	(10.9%)	5	(4.0%)
ALT/TGP, n (%)						
VN	31	(36.0%)	13	(28.3%)	44	(34.9%)
> VN	55	(64.0%)	33	(71.7%)	88	(69.8%)
> 10X VN	0	(0.0%)	2	(4.3%)	2	(1.6%)

Para a análise, foi considerado como limite superior do valor normal (VN) para AST/TGO: 39 UI/l (homem), 37 UI/l (mulher) e para ALT/TGP: 45 UI/l (homem), 37 UI/l (mulher). >10X VN: aumento maior a 10 vezes do valor normal

Na análise dos níveis circulantes da proteína C reativa, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes DSSA (n=26), DCSA (n=16) e ODF (n=8) (tabela 4.7). No entanto, encontramos uma tendência de incremento nos níveis séricos da proteína C reativa nos pacientes ODF, DSSA e DCSA/DG (tendência linear, $p=0.025$) (fig. 4.3).

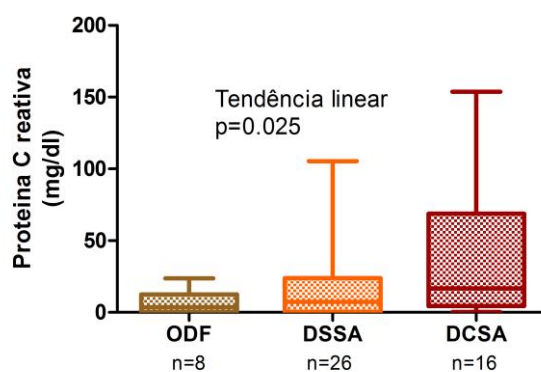


Figura 4.3 Dosagem da Proteína C reativa nos grupos ODF, DSSA, DCSA

Na análise estatística dos grupos ODF, DSSA e DCSA foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de tendência linear. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Ao analisarmos os níveis circulantes da albumina em 18 pacientes com dengue (2 pacientes DSSA, 15 pacientes DCSA e um paciente DG), encontramos uma correlação positiva entre os níveis séricos de albumina e a contagem de plaquetas ($r=0.472$, $p=0.048$).

Finalmente, a análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de acordo com o tipo de infecção, evidenciou uma menor contagem de plaquetas ($p=0.001$) e níveis circulantes elevados de AST/TGO ($p=0.015$) nos pacientes apresentando infecção secundária (tabela 4.9). Não foi observada diferença estatística em relação aos outros parâmetros hematológicos e/ou bioquímicos estudados.

Tabela 4.9 Parâmetros hematológicos e bioquímicos vs infecção primária/secundária

Parâmetro	Infecção primária	Infecção Secundária	P
Plaquetas	199.6 ± 15.4 (n=23)	141.4 ± 5.9 (n=145)	0.001
AST/TGO	45.4 ± 8.8 (n=16)	105.1 ± 15.2 (n=114)	0.015

Valores expressos como média ± SEM, n: número de pacientes. Na análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.6 Análise dos mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) na infecção pelo DENV

Embora tenhamos encontrado grande variabilidade na produção das citocinas IFN- γ e IL-1 β , não foi observada diferença estatística entre os grupos de pacientes DSSA e DCSA/DG e os controles. No entanto, ambos os grupos de pacientes com dengue (DSSA e DCSA/DG) apresentaram níveis elevados de TNF- α e IL-10 quando comparados com os controles ($p < 0.0001$). Pacientes DCSA/DG apresentaram níveis plasmáticos significativamente mais elevados de IL-6 e IL-10 quando comparados aos pacientes DSSA (tabela 4.10).

Tabela 4.10 Dosagem das citocinas nos controles e casos confirmados de dengue segundo classificação clínica

Citocinas (pg/ml)	Controle	DSSA	DCSA/DG	p
TNF- α	3.827 \pm 0.5 (n = 15)	21.83 \pm 4.8 (n = 125)	21.23 \pm 7.7 (n = 53)	<0.0001
IL-10	0.533 \pm 0.1 (n = 15)	5.568 \pm 0.9 (n = 125)	8.875 \pm 1.9 (n = 53)	<0.0001
IL-6	5.511 \pm 1.6 (n = 4)	10.06 \pm 0.9 (n = 45)	56.52 \pm 40.7 (n = 21)	0.005
IL-1 β	0.7695 \pm 0.1 (n = 15)	11.17 \pm 7.0 (n = 125)	18.38 \pm 12.2 (n = 53)	NS
IFN- γ	217.4 \pm 116.8 (n = 5)	324.0 \pm 73.8 (n = 17)	204.3 \pm 34.9 (n = 11)	NS

Valores expressos como média \pm SEM, n: número de pacientes, NS: não significativo. Na análise estatística dos grupos Controle, DSSA e DCSA/DG foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Em seguida os níveis plasmáticos das quimiocinas IL-8/CXCL8, MCP1/CCL2 e IP-10/CXCL10 foram avaliados. De acordo com a tabela 4.11, podemos observar níveis plasmáticos de MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 e IL-8/CXCL8 significativamente mais elevados em ambos os grupos de pacientes com dengue (DSSA e DCSA/DG) quando comparados aos controles; além disso, pacientes DSSA apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-8/CXCL8 quando comparados com os pacientes DCSA/DG.

Tabela 4.11 Dosagem das quimiocinas nos controles e casos confirmados de dengue segundo classificação clínica

Quimiocinas (pg/ml)	Controles	DSSA	DCSA/DG	p
IL-8/CXCL8	3.320 ± 0.692 (n = 15)	78.55 ± 22.68 (n = 125)	74.61 ± 39.81 (n = 53)	<0.0001
MCP-1/CCL2	147.1 ± 40.62 (n = 8)	778.1 ± 84.8 (n = 44)	717.4 ± 110.4 (n = 20)	0.0003
IP-10/CXCL10	76.05 ± 16.58 (n = 8)	571.5 ± 66.36 (n = 46)	946.4 ± 255.3 (n = 20)	0.001

Valores expressos como média ± SEM, n: número de pacientes, NS: não significativo. Na análise estatística dos grupos Controle, DSSA e DCSA/DG foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A dosagem/quantificação das citocinas e quimiocinas segundo dias de doença também foi avaliada nos pacientes infectados pelo DENV. Níveis significativamente mais elevados de IL-1 β foram encontrados nos pacientes nos primeiros dias de doença (1-3 dias: 3.792 ± 1.395 pg/ml versus 4-7 dias: 0.706 ± 0.070 pg/ml; $p = 0.0075$). Por outro lado, pacientes entre 4-7 dias de doença apresentaram níveis plasmáticos significativamente mais elevados de IL-10 (quando comparados 4-7 dias: 9.043 ± 1.421 pg/ml versus 1-3 dias: 4.607 ± 1.395 pg/ml; $p = 0.0004$ e versus >7 dias: 2.298 ± 0.580 pg/ml; $p < 0.0001$) (figura 4.4). Não foi observada diferença estatística quanto à produção das citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- γ nos diferentes dias de doença (figura 4.4).

Em relação às quimiocinas, níveis significativamente mais elevados de IL-8/CXCL8 foram encontrados nos pacientes nos primeiros dias de doença (1-3 dias: 74.53 ± 27.31 pg/ml versus 4-7 dias: 46.34 ± 22.03; $p = 0.033$). Por outro lado, os pacientes entre 4-7 dias de doença apresentaram níveis plasmáticos significativamente mais elevados de IP-10/CXCL10 (4-7 dias: 789.8 ± 138.1 pg/ml versus >7 dias: 152.1 ± 38.8 pg/ml; $p < 0.0001$). Em relação à dosagem de MCP-1/CCL2, não encontramos diferença estatística entre os grupos por dias de doença, no entanto encontramos uma tendência significativa de diminuição na sua produção (1-3 dias: 1082 ± 177.6 pg/ml; 4-7 dias: 711 ± 59.0 pg/ml; >7 dias: 307.4 ± 31.5 pg/ml; tendência linear, $p < 0.0001$) (figura 4.4).

Não houve diferença estatística em relação à dosagem das citocinas e quimiocinas e o tipo de infecção primária ou secundária.

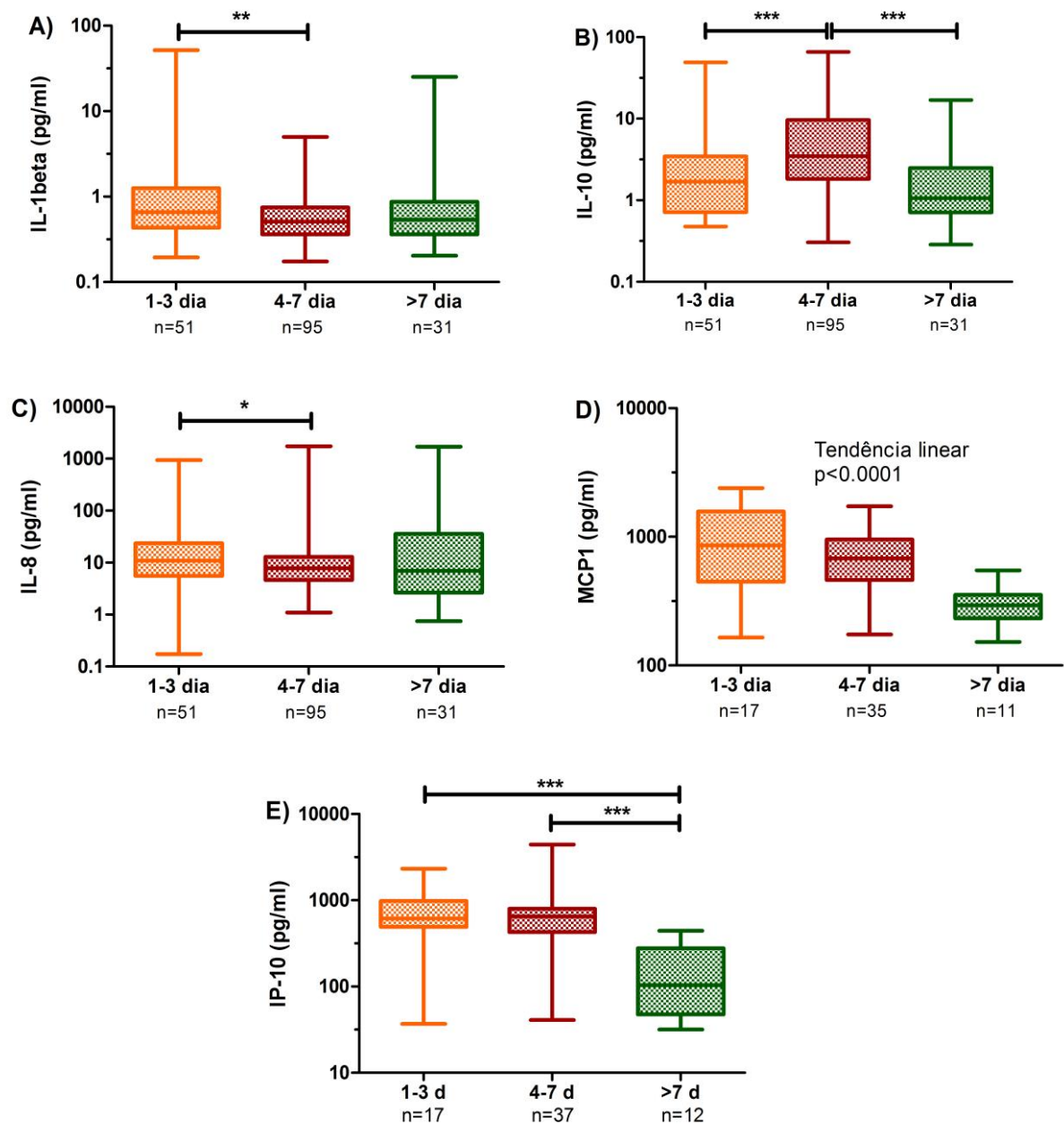


Figura 4.4 Dosagem de citocinas e quimiocinas dos casos confirmados de dengue segundo dias de doença.

A) Dosagem de IL-1 β , B) Dosagem de IL-10, C) Dosagem de IL-8/CXCL8, D) Dosagem de MCP-1/CCL2, E) Dosagem de IP-10/CXCL10. Na análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn e o pós-teste de tendência linear. Valores de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.7 Análise dos parâmetros de coagulação

Conforme apresentado na tabela 4.12, nossos resultados demonstraram que os pacientes DCSA/DG apresentaram níveis significativamente menores de fibrinogênio quando comparados com pacientes DSSA.

Os níveis plasmáticos do sTF, proteína que inicia o processo de ativação da cascata de coagulação, foram determinados conforme demonstrado na tabela 4.12 e na figura 4.5, ambos os grupos de pacientes com dengue (DSSA e DCSA/DG) apresentaram níveis plasmáticos significativamente mais baixos do sTF em relação aos controles. Essa tendência também foi observada entre os dias de doença, em que os valores começam a diminuir entre 4-7 dias de doença (1-3 dias: 16.58 ± 3.1 pg/ml; 4-7 dias: 10.71 ± 0.7 pg/ml; > 7 dias 10.85 ± 0.8 pg/ml; tendência linear, $p=0.04$).

Contrariamente ao que foi observado para o sTF, níveis significativamente elevados do TFPI (inibidor fisiológico do TF) foram encontrados nos grupos de pacientes com dengue (DSSA e DCSA/DG) quando comparados com os controles (tabela 4.12 e figura 4.5). Não encontramos diferenças significativas dos níveis do TFPI em relação aos dias de doença.

Em relação com trombomodulina, não encontramos diferença estatística entre os grupos de pacientes e os controles (tabela 4.12). No entanto, níveis significativamente elevados foram encontrados nos pacientes entre os dias 4-7 de doença (4-7 dias: 3337 ± 130.7 pg/ml versus >7 dias: 2754 ± 198.1 pg/ml; $p=0.024$).

Tabela 4.12 Dosagem dos parâmetros de coagulação nos controles e casos confirmados de dengue segundo classificação clínica

Parâmetros de coagulação	Controle	DSSA	DCSA/DG	p
Fibrinogênio (mg/dl)	290.3 ± 39.61 (n = 4)	322.1 ± 8.73 (n = 66)	279.2 ± 18.76 (n = 37)	0.0216
sTF (pg/ml)	20.45 ± 3.08 (n = 9)	13.06 ± 1.31 (n = 46)	10.37 ± 0.59 (n = 19)	0.0024
TFPI (pg/ml)	16578 ± 1768 (n = 16)	22184 ± 1246 (n = 40)	25871 ± 2864 (n = 22)	0.0498
TM (pg/ml)	2855 ± 162.7 (n = 9)	3227 ± 107.1 (n = 43)	3154 ± 189.3 (n = 22)	NS

Valores expressos como média \pm SEM, n: número de pacientes, NS: não significativo. Na análise estatística dos grupos Controle, DSSA e DCSA/DG foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

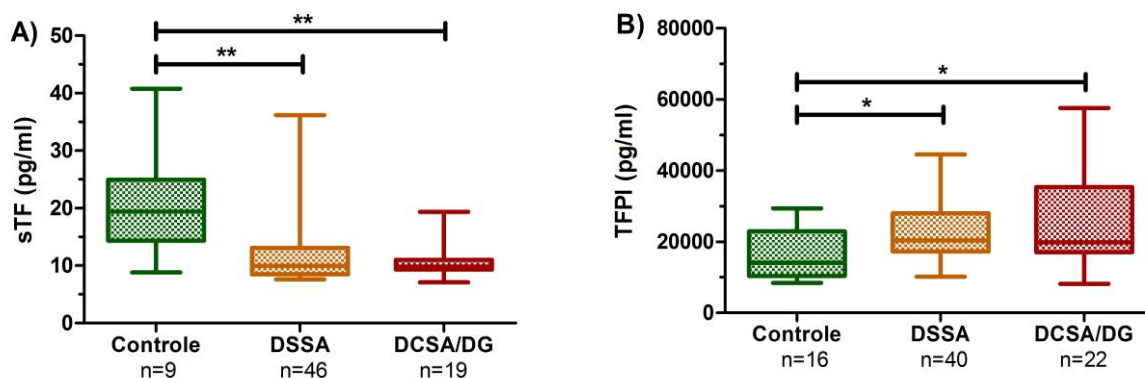


Figura 4.5 Dosagem dos parâmetros de coagulação dos controles e casos confirmados de dengue segundo classificação clínica.

A) Dosagem do sTF; B) Dosagem do TFPI. Na análise estatística dos grupos Controle, DSSA e DCSA/DG foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. Valores de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ foram considerados estatisticamente significativos.

Finalmente, não foi observada diferença estatística entre os parâmetros de coagulação estudados e o tipo de infecção primária ou secundária.

4.8 Comparações das dosagens dos parâmetros de coagulação na presença ou ausência de sangramentos

Na análise dos parâmetros de coagulação na presença ou ausência de sangramentos nos pacientes com dengue, como esperado, diminuição significativa na contagem de plaquetas foi observada nos pacientes que apresentaram sangramento. Não foi observada diferença estatística em relação aos outros parâmetros de coagulação estudados na presença ou ausência de sangramento (tabela 4.13). No entanto, níveis significativamente elevados de transaminases foram encontrados nos pacientes que apresentaram sangramento (tabela 4.14).

Tabela 4.13 Comparação das dosagens dos parâmetros de coagulação segundo a presença ou ausência de sangramentos nos casos confirmados de dengue

Parâmetros de Coagulação	Dengue s/sangramento	Dengue c/sangramento	p
Plaquetas x 10 ³ (min)	156.2 ± 5.28 (n = 182)	116.7 ± 19.24 (n = 21)	0.016
Fibrinogênio (mg/dl)	308.4 ± 8.87 (n = 91)	286.8 ± 35.88 (n = 13)	NS
TM (pg/ml)	3213 ± 102.2 (n = 58)	3116 ± 254.9 (n = 7)	NS
sTF (pg/ml)	12.44 ± 1.05 (n = 59)	10.58 ± 0.35 (n = 6)	NS
TFPI (pg/ml)	22608 ± 1275 (n = 53)	28701 ± 4773 (n = 9)	NS

Valores expressos como média ± SEM, n: número de pacientes, NS: não significativo. Na análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos

Tabela 4.14 Comparação das dosagens das transaminases segundo a presença ou ausência de sangramentos nos casos confirmados de dengue

Transaminases	Dengue s/sangramento	Dengue c/sangramento	p
AST/TGO	76 ± 8.3 (n = 115)	236 ± 80 (n = 17)	0.002
ALT/TGP	77 ± 6.1 (n = 115)	206 ± 77 (n = 17)	0.045

Valores expressos como média ± SEM, n: número de pacientes. Na análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.9 Correlações entre os níveis circulantes dos marcadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) estudados com os parâmetros laboratoriais associados à gravidade

Com o intuito de identificar as possíveis associações dos fatores solúveis estudados, avaliamos a correlação entre os níveis circulantes das citocinas/quimiocinas com os diversos parâmetros laboratoriais associados à gravidade.

Citocinas e quimiocinas são moléculas pleiotrópicas, algumas são induzidas por vias similares e, portanto, podem estar presentes simultaneamente. Assim, evidenciamos correlação positiva entre os níveis plasmáticos dos mediadores inflamatórios: TNF- α e IL-1 β ($r=0.491$, $p<0.0001$); TNF- α e IL-8/CXCL8 ($r=0.483$, $p<0.00010$); IL-10 e IP-10/CXCL10 ($r=0.488$, $p<0.0001$). Por fim, MCP1/CCL2 e IP-10/CXCL10 ($r=0.623$, $p<0.0001$) (fig. 4.6).

Observamos correlação positiva entre os níveis plasmáticos de IL-6 com os níveis de AST/TGO ou ALT/TGP. Da mesma forma, a quimiocina IP-10/CXCL10 também apresentou correlação positiva com os níveis de AST/TGO e ALT/TGP. A citocina IL-10 apresentou uma correlação positiva apenas com a AST/TGO (tabela 4.15). Correlação positiva entre os níveis circulantes de IL-10 e a relação albumina/globulina sérica também foi observada ($r=0.613$, $p=0.015$, $n=15$).

Nossos resultados também indicaram uma correlação positiva entre os níveis circulantes do IFN- γ com a contagem dos monócitos; e inversa entre os níveis circulantes da MCP1/CCL2 com a contagem de linfócitos (tabela 4.15).

Contagem de plaquetas, leucócitos e linfócitos foram inversamente correlacionados aos níveis circulantes de IL-10. De modo similar, os níveis plasmáticos de IP-10/CXCL10 apresentaram correlação inversa com a contagem de leucócitos e plaquetas (tabela 4.15).

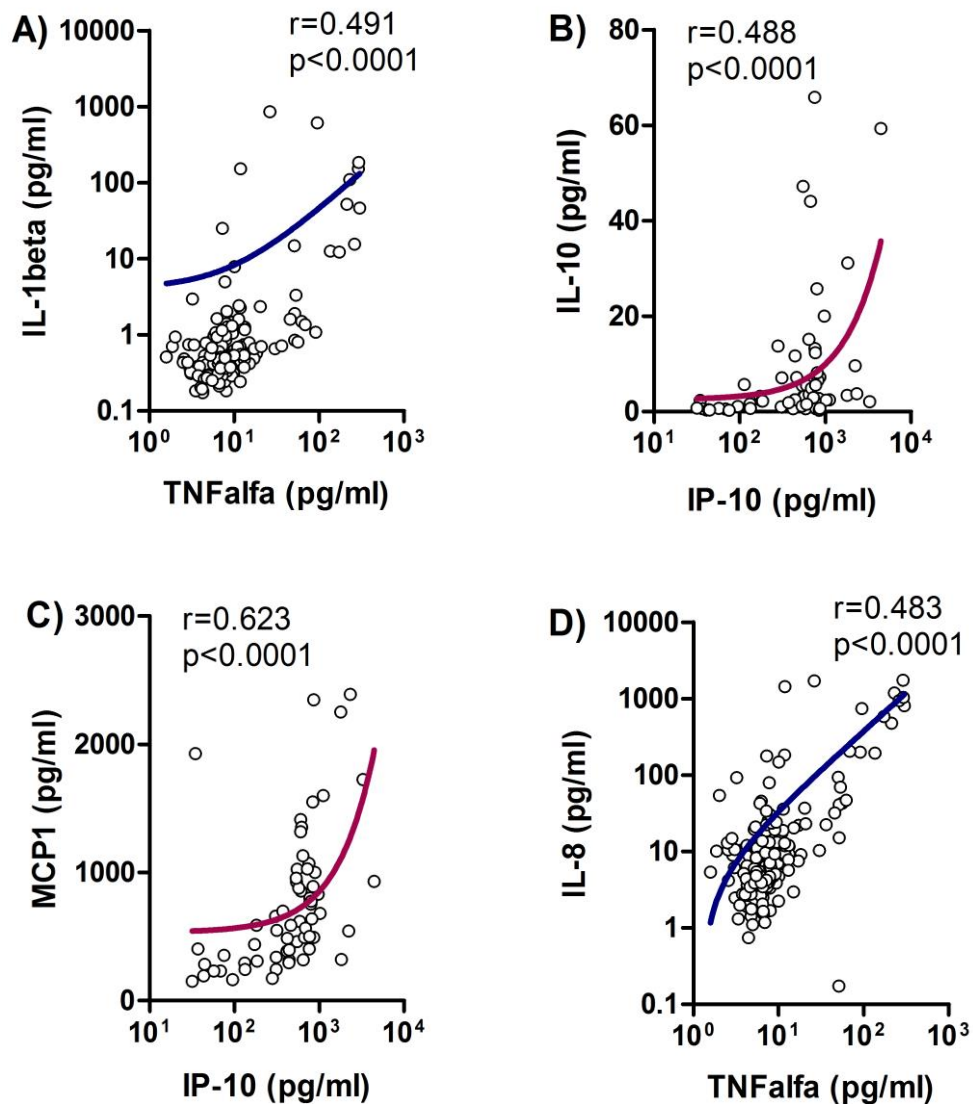


Figura 4.6 Avaliação de associação entre citocinas e quimiocinas

A) Níveis de TNF- α x IL-1 β , B) Níveis de IL-10 x IP10/CXCL10, C) Níveis de MCP1/CCL2 x IP10/CXL10, D) Níveis de IL-8/CXCL8 x TNF- α . Na análise estatística foi utilizada a correlação de Spearman. Valores de $p<0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 4.15 Correlação entre as dosagens de citocinas e quimiocinas com os dados laboratoriais dos casos confirmados de dengue

	Leucócitos	Linfócitos	Monócitos	Plaquetas	AST/TGO	ALT/TGP
IL-1β	NS (n=156)	NS (n=150)	NS (n=147)	NS (n=158)	NS (n=104)	NS (n=104)
TNF-α	NS (n=156)	NS (n=150)	NS (n=147)	NS (n=158)	NS (n=104)	NS (n=104)
IL-6	NS (n=61)	NS (n=59)	NS (n=56)	NS (n=62)	r= 0.371 p=0.009	r=0.340 p=0.018
IFN-γ	NS (n=25)	NS (n=24)	r=0.428 p=0.037	NS (n=25)	NS (n=19)	NS (n=19)
IL-10	r= -0.353 p=0.0001	r= -0.319 p=0.0001	NS n=151	r= -0.352 p=0.0001	r=0.305 p=0.0001	NS n=104
IP-10/CXCL10	r= -0.394 p=0.034	NS (n=59)	NS (n=57)	r= -0.272 p=0.034	r=0.388 p=0.008	r=0.336 p=0.024
MCP1/CCL2	NS (n=59)	r= -0.394 p=0.034	NS (n=55)	NS (n=60)	NS (n=43)	NS (n=43)
IL-8/CXCL8	NS (n=156)	NS (n=150)	NS (n=147)	NS (n=158)	NS (n=104)	NS (n=104)

Foi realizada a correlação de Spearman. NS: correlação não significativa; n: numero de pares analisados. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.10 Correlações entre os níveis circulantes dos marcadores de coagulação estudados com parâmetros laboratoriais associados à gravidade

Numa tentativa de demonstrar a existência de associações entre os dados laboratoriais e os diferentes parâmetros de coagulação, foram realizadas análises de correlações. Nossos resultados indicaram correlação inversa entre os níveis circulantes do TFPI com a contagem de plaquetas e correlação positiva com os níveis de AST/TGO e ALT/TGP (fig. 4.7).

Uma correlação positiva foi encontrada entre os níveis circulantes de TFPI e sTF (fig. 4.7). Não foi observada diferença estatística em relação aos demais marcadores de coagulação testados.

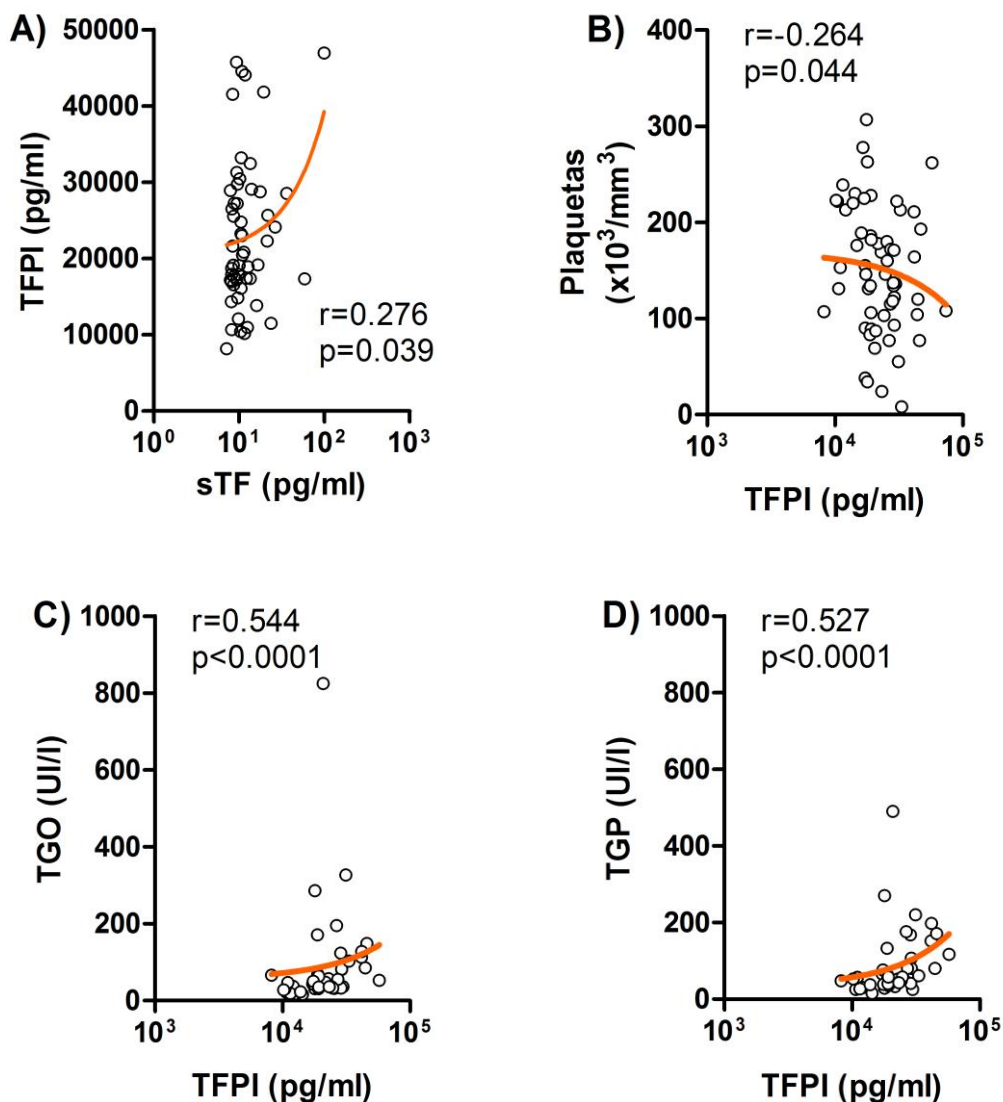


Figura 4.7 Avaliação de associação entre marcadores de coagulação e parâmetros laboratoriais

A) Níveis de sTF x TFPI, B) Níveis de TFPI x plaquetas, C) Níveis de TFPI x AST/TGO, D) Níveis de TFPI x ALT/TGP. Na análise estatística foi realizada a correlação de Spearman. Valores de $p<0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.11 Avaliação de possíveis biomarcadores de gravidade

Todos os parâmetros estudados (citocinas, quimiocinas e marcadores de coagulação) foram associados na tentativa de sugerir um potencial biomarcador de gravidade. Assim, demonstramos que níveis plasmáticos de IL-10 e IP-10/CXCL10 estiveram associados com parâmetros de gravidade como trombocitopenia e níveis séricos elevados das transaminases. Níveis significativamente elevados de IL-10 foram evidenciados nos pacientes DCSA/DG, e não observamos diferença estatística nos níveis de IP-10/CXCL10.

Na análise da área sob a curva ROC não encontramos bom valor preditivo para IP-10/CXCL10 (AUC=0.542, IC95%: 0.389-0.695, $p=0.586$) e IL-10 (AUC=0.653, IC95%: 0.569-0.737, $p=0.001$) na discriminação daqueles pacientes que desenvolverão DCSA/DG. No entanto, IL-10 apresentou um AUC considerado regular (figura 4.8).

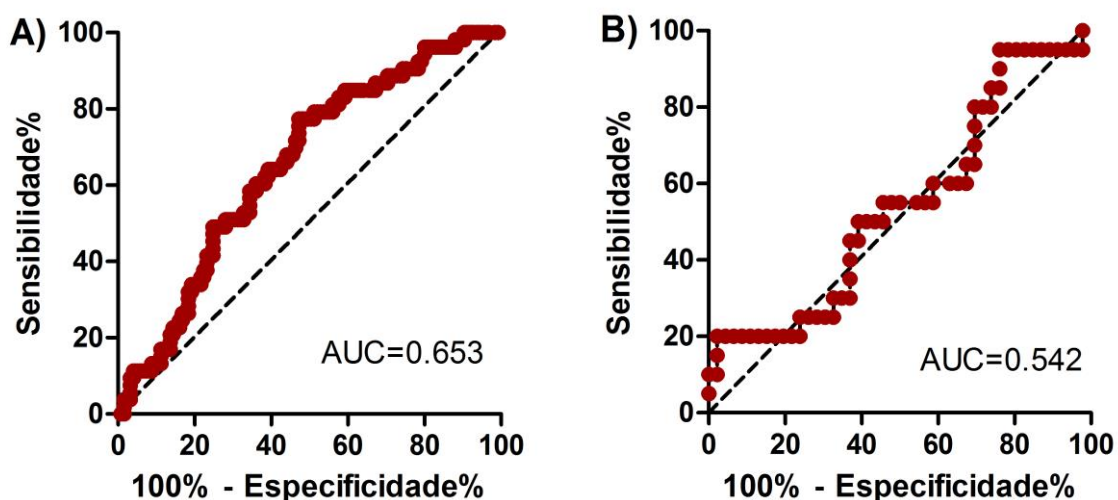


Figura 4.8 Curva ROC dos níveis circulantes de IL-10 e IP-10/CXCL10

A) IL-10 (n=178), B) IP-10/CXCL10 (n=66), n: número de pacientes.

5 DISCUSSÃO

5.1 A nova classificação OMS 2009, manifestações clínicas e características laboratoriais

No Brasil, a transmissão da dengue vem ocorrendo de forma continuada desde 1986, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes. O maior surto ocorreu em 2013, com aproximadamente 2 milhões de casos notificados e predomínio da circulação do sorotipo DENV-4 (40). Nosso estudo foi realizado em duas das regiões mais atingidas pela dengue no ano 2013 (Região Sudeste com 926.595 e Região Centro-Oeste com 270.797 casos notificados) (36).

De acordo com a nova classificação clínica proposta pela OMS no ano 2009 (68), o manejo adequado dos pacientes depende do reconhecimento precoce dos sinais de alarme. Esses sinais são importantes, uma vez que surgem antes do estabelecimento da dengue grave (203). O Brasil adotou oficialmente a nova classificação a partir de janeiro de 2014 (204). Neste estudo, observamos um predomínio de pacientes com quadros clínicos brandos e sem sinais de alarme (70,5%), em concordância com os dados do Ministério da Saúde 2013, sendo que apenas dois pacientes (0,9%) apresentaram a forma grave da doença.

Dentre os pacientes classificados como DCSA, evidenciamos que dor abdominal persistente (63,5%) e sangramento de mucosas (32,3%) foram os sinais de alarme mais frequentes, em acordo com estudos realizados na Ásia (205, 206) e no Brasil (207) que utilizaram também a nova classificação. A intensidade da dor abdominal não tem sido associada à gravidade nem com faixa etária (208, 209) (210). Várias hipóteses foram formuladas em relação à dor abdominal na dengue, como por exemplo, a distensão da cápsula hepática, a estimulação do plexo nervoso produzido pelo edema no espaço retroperitoneal, e a diminuição da perfusão mesentérica (211), o envolvimento do pâncreas (212, 213), ou do ducto biliar também foram relacionados (214, 215). No Peru, foi relatado um caso de infecção pelo DENV-4 que evoluiu com um quadro de colecistite aguda acalculosa (216).

Os sangramentos de mucosa mais frequentes foram gengivorragia e epistaxe, em concordância com outros estudos realizados na Ásia (206) e no Brasil (84). Em geral, os graus variáveis de hemorragia observados na dengue podem estar

relacionados a defeitos na primeira fase da hemostasia, como resultado de alterações nas plaquetas e aumento de permeabilidade vascular, mas também a partir de distúrbios na coagulação, como a coagulação intravascular disseminada nos casos graves (217). Estudo recente não encontrou associação entre aumento da permeabilidade vascular e sangramento, sugerindo que são fenômenos independentes, conforme estabelecido na nova classificação de OMS (218).

Com base na determinação de anticorpos anti-dengue IgG e na relação IgM/IgG, 85,2% dos casos confirmados de dengue deste estudo apresentaram infecção secundária, dentre estes a maioria (94,7%) eram de DCSA/DG. Esse método evidenciou que a maior parte da população estudada já tinha antecedente de infecção, provavelmente pelo DENV-1 e/ou DENV-2 no Brasil (219).

As infecções pelo DENV-4 geralmente são caracterizadas por um quadro clínico mais brando em comparação aos outros sorotipos (220-222), incluindo aqueles pacientes com coinfeção por outros vírus, como HIV (223). No entanto, vários estudos têm relatado casos de FHD (20, 97, 98, 220) e óbitos (224) com o sorotipo 4, principalmente nas infecções secundárias.

Trabalhos vêm demonstrando associação entre viremia, através da dosagem do antígeno NS1 como marcador de carga viral, e gravidade da doença, em geral nas infecções pelos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, (157, 225-228). No nosso estudo, em pacientes infectados pelo DENV-4, não encontramos diferença significativa nos níveis circulantes do antígeno NS1 (avaliado pela Densidade Óptica obtida no teste) entre os pacientes DSSA e DCSA/DG (dados não apresentados).

As principais alterações hematológicas relatadas em pacientes com dengue são: aumento do hematócrito, leucopenia e trombocitopenia (229). No nosso estudo, 54,2% dos pacientes apresentaram leucopenia e 24,1% trombocitopenia. A contagem de leucócitos e plaquetas foi significativamente mais baixa nos pacientes DCSA/DG em comparação com os pacientes DSSA. Esses resultados corroboram com estudos prévios realizados no Brasil em pacientes graves e brandos (73, 230). Além disso, 27,7% dos pacientes DCSA/DG apresentaram contagem de plaquetas $<50,000/\text{mm}^3$. De fato, a trombocitopenia acentuada é observada na infecção grave pelo DENV e associada, em alguns casos, com o aparecimento de manifestações hemorrágicas (217, 229).

Observamos que tanto a trombocitopenia como os elevados níveis séricos de transaminases foram associados com a presença de sangramento, corroborando os estudos anteriores (151, 231).

Hipóteses vêm sendo formuladas visando à elucidação dos prováveis mecanismos responsáveis pela trombocitopenia na dengue. Numa primeira abordagem o DENV afetaria as células progenitoras da medula óssea inibindo suas funções (232). Ainda, mecanismos indiretos ao vírus, diminuiriam capacidade proliferativa das células hematopoiéticas (233). De fato, existem evidências de que o DENV induz hipoplasia da medula óssea na fase aguda da doença (234), e estudo *in vitro* demonstrou que o DENV-4 se replica em células progenitoras da medula óssea humana alterando a sua capacidade proliferativa (235). Numa segunda abordagem, mais periférica, a infecção pelo DENV induziria consumo plaquetário em decorrência de coagulação intravascular disseminada, destruição das plaquetas em decorrência de uma maior lise pelo complemento e apoptose. Ainda, pelo envolvimento de anticorpos antiplaquetários (236, 237).

De acordo com dados da literatura, a leucopenia e trombocitopenia precedem ao aumento do hematócrito (68). A leucopenia é observada na fase aguda, assim como a trombocitopenia, no entanto atinge menores níveis na defervescência, período em que se observa aumento do hematócrito (68, 229). No entanto, não observamos diferença significativa nos valores do hematócrito, provavelmente devido ao baixo número de casos graves e também por conta da hidratação venosa recebida pelos pacientes DCSA/DG. Pacientes com outras doenças febris (ODF) apresentaram valores de referência dentro da normalidade e diferença significativa quando comparados com os grupos DSSA e DCSA/DG corroborando com a visão de que essas alterações hematológicas são características do DENV.

Nossos resultados corroboram com diversos trabalhos que demonstraram presença de leucopenia na dengue. De fato, uma redução no número de linfócitos T CD4 com inversão da taxa CD4/CD8 é descrita na fase aguda da doença (148, 160). As causas da redução de linfócitos são discutidas e parece envolver mecanismos de migração e apoptose. Recentemente, a equipe do nosso laboratório demonstrou uma maior frequência de linfócitos T CD4 e CD8 expressando o receptor de quimiocina CCR5 na fase aguda da doença. Nesse trabalho, foram observados baixos níveis da quimiocina CCL5/RANTES no sangue e elevada expressão em tecidos hepáticos de casos fatais, sugerindo a migração dos linfócitos para tecidos inflamados. Além disso, Torrentes e colaboradores demonstraram a associação entre um perfil de ativação de subpopulações de linfócitos T e susceptibilidade à apoptose, principalmente nos casos graves de dengue (238), indicando que apoptose poderia estar envolvida na redução periférica destes leucócitos.

O envolvimento hepático é uma das características da infecção pelo DENV. As alterações hepáticas, incluindo hepatomegalia e aumentos das transaminases já foram descritas tanto em casos de DC como de FHD (239-242). A Insuficiência hepática aguda associada com a dengue tem sido descrita mais frequentemente em crianças (243-245) e em alguns casos nos adultos (246-250). Em geral, o envolvimento hepático na maioria dos casos prolonga o curso clínico da infecção, mas não constitui um sinal de mal prognóstico. Nossos resultados demonstraram que cerca de 60% dos pacientes com níveis de transaminases acima dos valores normais, em particular pacientes DCSA/DG, apresentaram valores ainda mais elevados, e um dos pacientes desenvolveu hepatite grave.

A patogênese do envolvimento hepático na dengue ainda é pouco compreendida. Estudos demonstraram a presença do DENV nos hepatócitos e nas células de Kupffer (56). Sugere-se que ao contrário da febre amarela, a apoptose precoce dos hepatócitos infectados, seguida de uma rápida eliminação pelas células fagocíticas, poderia contribuir para a limitação da propagação do DENV. Por outro lado, a resposta efetora das células NK e TCD8 induziria à lesão nos hepatócitos pelo efeito citolítico direto destas células ou através das citocinas liberadas (251, 252).

De maneira geral, como relatado por outros autores, também observamos que os pacientes com dengue apresentaram maiores níveis séricos de AST/TGO quando comparados com os níveis de ALT/TGP. Esses dados diferem do encontrado em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite B ou C, em que os níveis de ALT/TGP são maiores que AST/TGO (239-242). Estudo demonstrou a inversão da taxa TGO/TGP na fase de convalescência da dengue (253). As diferentes variações nos níveis das transaminases durante a dengue não estão completamente elucidadas. A enzima AST/TGO é também produzida por outros órgãos, como coração, músculo esquelético, rins e cérebro, assim como pelas hemácias e leucócitos, enquanto a ALT/TGP é produzida principalmente pelo fígado. Assim, uma elevação dos níveis de AST/TGO na dengue, poderia refletir lesão em outros órgãos alvo (59, 254, 255). A enzima ALT/TGP possui meia vida mais curta que a AST/TGO. Assim, uma diminuição lenta nos níveis de AST/TGO na dengue, poderia ser devido à meia-vida mais prolongada desta enzima ou estaria refletindo uma recuperação mais lenta do fígado (251).

Além disso, coinfeção DENV e o vírus da hepatite B (242, 256), uso de drogas hepatotóxicas, como o paracetamol ou ainda com uso de ervas medicinais,

podem também contribuir para elevação das transaminases durante a infecção (257, 258). Neste estudo, não foi possível avaliar adequadamente estes antecedentes nos pacientes. Interessantemente, os pacientes com outras doenças febris (ODF) apresentaram níveis séricos das transaminases dentro da normalidade.

No nosso estudo um caso de dengue grave apresentou diagnóstico de Síndrome de Guillain-Barre (SGB) duas semanas depois do início da doença. Na literatura, a incidência de manifestações neurológicas pode variar entre 0.5-21% (259), sendo a SGB raramente diagnosticada (260-263). No entanto, o DENV como causa de SGB pode ser subestimado, uma vez que os pacientes podem ser oligossintomáticos ou não apresentar sintomas característicos da dengue (264). Evidências sugerem que as manifestações clínicas da SGB são resultado de reações imunológicas mediadas pelas células T ativadas que atravessam a barreira hematoencefálica e induzem lesão nas células de Schwann através das citocinas e quimiocinas liberadas (265).

Estudo relatou uma maior frequência de manifestações respiratórias e erupção maculopapulosa nas infecções pelo DENV-4 em comparação aos outros sorotipos (266). No nosso trabalho, outros sinais e sintomas não foram avaliados pela ausência de alguns desses dados na ficha clínica.

5.2 Citocinas e Mediadores inflamatórios na imunopatogênese da dengue

Muitos estudos realizados em amostras clínicas de pacientes com dengue na fase aguda mostram níveis circulantes aumentados de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas). Nós demonstramos que os pacientes DSSA e DCSA/DG apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados da citocina TNF- α quando comparadas com o grupo controle, corroborando estudos prévios e também, estudos do nosso grupo (147, 149, 152, 155, 267, 268).

O TNF- α é uma citocina frequentemente associada com a gravidade da dengue (150, 269). No entanto, estudos realizados em pacientes adultos brasileiros demonstraram associação do TNF- α com gravidade durante infecção pelo DENV-2 (149), mas não durante infecção pelo sorotipo DENV-3 (147). Não encontramos no nosso estudo, com predominância de infecção pelo sorotipo DENV-4, relação entre TNF- α e gravidade.

Níveis plasmáticos significativamente elevados de IL-6 foram encontrados nos pacientes DCSA/DG quando comparados aos pacientes DSSA. Altos níveis desta citocina foram observados em crianças asiáticas com FHD/SCD, além de uma associação com a gravidade da doença (270). Concentrações elevadas de IL-6 podem causar lesão tecidual em algumas doenças, e especialmente na dengue grave (271). Nossos resultados corroboram o estudo de Rathakrishnan e colaboradores que também utilizaram a nova classificação (161) e com demais estudos que encontraram níveis circulantes alterados de IL-6 nos pacientes (154, 272, 273). Interessantemente, foi demonstrada associação da IL-6 com o DENV-4 em pacientes com FHD e infecção secundária (274).

As citocinas proinflamatórias TNF- α , IL-1 β e principalmente IL-6 induzem a expressão de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, como proteína C reativa, amiloide P sérico (SAP) e fibrinogênio (275-277). As pentraxinas, proteína C reativa e SAP podem reconhecer antígenos dos patógenos ativando o sistema complemento pela ligação ao C1q (via clássica) (278). A proteína C reativa é frequentemente utilizada como marcador de inflamação e infecção (279) e na infecção pelo DENV, é um dos biomarcadores do diagnóstico precoce e prognóstico de gravidade (274, 280). De fato, encontramos uma tendência significativa de incremento nos níveis séricos da proteína C reativa nos pacientes DCSA/DG em comparação com os pacientes DSSA e o grupo ODF.

Não observamos diferença estatística nos níveis circulantes de IL-1 β nos pacientes com dengue, mas encontramos níveis aumentados nos primeiros dias de doença. A IL-1Ra é um antagonista natural da IL-1 sendo capaz de bloquear os seus efeitos (281, 282). Estudos prévios encontraram níveis alterados de IL-1Ra em pacientes brasileiros com DC (272, 283) e outro estudo encontrou associação com gravidade (154). É provável que o balanço entre IL-1 e IL-1Ra esteja influenciando o desfecho clínico durante a dengue.

Nós não encontramos diferença significativa na dosagem de IFN- γ entre os diferentes grupos estudados. Muitos estudos clínicos com dosagens de IFN- γ foram descritos, mas os resultados entre eles diferem. Por exemplo, níveis séricos aumentados de IFN- γ foram observados na DC, mas não na FHD (284). Em resposta a NS3 do DENV-3, pacientes com FHD produziram altas quantidades de IFN- γ quando comparados com pacientes com DC (285). Nosso grupo demonstrou aumento nos níveis circulantes do IFN- γ nos casos graves na epidemia de DENV-3 em 2002 (147).

Interessantemente, encontramos correlação positiva entre os níveis do IFN- γ e a contagem de monócitos. O IFN- γ aumenta a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) nos monócitos, ativando estas células as quais produzem mediadores inflamatórios. Além disso, o IFN- γ possui importante papel na resposta antiviral durante a infecção pelo DENV através da indução de moléculas efetoras e antivirais, como o óxido nítrico via monócitos (286).

A IL-10 é produzida por monócitos e linfócitos T sendo uma potente citocina anti-inflamatória e uma molécula importante na desativação dos monócitos (287). Na indução de resposta anti-inflamatória, IL-10 inibe a resposta proliferativa das células T e a transcrição de citocinas, principalmente IFN- γ (288, 289). Na sepse bacteriana, IL-10 é associada ao mau prognóstico, uma vez que altos níveis circulantes são detectados nos casos graves (287). Na infecção pelo DENV, os níveis circulantes de IL-10 já foram associados a derrame pleural nos pacientes com FHD (156). Nosso estudo encontrou níveis significativamente elevados de IL-10 nos pacientes DCSA/DG em concordância com outros (148, 156, 161, 290).

Dentre as citocinas por nós estudadas, IL-10 foi a que mais apresentou associações com os parâmetros laboratoriais de gravidade. Demonstramos correlação inversa entre os níveis séricos da IL-10 com contagem de plaquetas e leucócitos totais e correlação positiva com os níveis plasmáticos de AST/TGO e a relação albumina/globulina sérica, esta última relacionada com o fenômeno de extravasamento plasmático. Estudo demonstrou correlação negativa entre níveis de IL-10 e contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ em pacientes com FHD (291). Estudos prévios do nosso grupo também evidenciaram correlação inversa da IL-10 com contagem de plaquetas durante epidemia pelos DENV-1 e DENV-2 em 2001 (148), semelhante aos nossos dados com o DENV-4, reforçando a importância da IL-10 no contexto da infecção pelo DENV.

As plaquetas são ativadas diretamente pelo DENV e sofrem apoptose (236). Além disso, o aumento de agregados plaquetas-monócitos foram detectados na dengue e estes induziram a produção de várias citocinas incluindo a IL-10 (292).

Embora grande parte dos estudos referentes a IL-10 demonstrem seu envolvimento nos eventos relacionados à gravidade da doença e, portanto, como um potencial biomarcador de gravidade (293, 294), a análise da área sob a curva ROC não indicou seu valor preditivo na discriminação de pacientes que apresentaram sinais de alarme ou forma grave da doença.

Nosso estudo demonstrou aumento na circulação das quimiocinas IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL10 nos pacientes com dengue em relação aos controles. Apenas a IL-8/CXCL8 apresentou maiores níveis circulantes nos pacientes DSSA quando comparados com pacientes DCSA/DG corroborando com o estudo de Rathakrishnan e colaboradores (161). No entanto, outros estudos encontraram maiores níveis de IL-8/CXCL8 nos pacientes graves (159, 161, 192, 295).

IL-8/CXCL8 é uma quimiocina com efeito pro-inflamatório e capacidade de induzir a ativação e degranulação de neutrófilos. Nós observamos que tanto os pacientes DSSA e DCSA/DG apresentaram diminuição na contagem dos neutrófilos, sugerindo migração destas células. Juffrie e colaboradores demonstraram correlação positiva entre níveis circulantes de IL-8/CXCL8 e produtos de degranulação de neutrófilos (elastase e lactoferrina), sugerindo o envolvimento desta citocina na ativação dos neutrófilos na dengue (295). Nós encontramos maiores níveis de IL-8/CXCL8 nos primeiros dias de doença. Neste contexto, a produção precoce e abundante da quimiocina IL-8/CXCL8 pelas células refletiria o recrutamento inicial dos neutrófilos para os tecidos (296).

A CXCL10/IP10 é uma proteína pleiotrópica agindo nos monócitos, células NK e células T induzindo a migração e regulação destas células, sendo um importante mediador da resposta inflamatória (297). Nosso grupo já demonstrou níveis aumentados de CXCL10-/IP10 nos pacientes com dengue (160), e da mesma forma, nosso estudo corroborou esses achados.

Embora não tenhamos encontrado diferença significativa nos níveis de CXCL10-/IP10 nos pacientes DSSA e DCSA/DG, evidenciamos correlação positiva desta quimiocina com os níveis de transaminases (AST/TGO e ALT/TGP). Estudos já evidenciaram correlação positiva de IP-10/CXCL10 com a lesão hepática em pacientes infectados com vírus da hepatite C (298). Rathakrishnan e colaboradores encontraram associação direta entre IP-10/CXCL10 com transaminases nos pacientes com dengue (161).

Nós encontramos elevados níveis de MCP-1/CCL2 nos pacientes com dengue, os quais diminuíram significativamente no decorrer da infecção. Além disso, demonstramos correlação inversa com a contagem de linfócitos. MCP-1/CCL2 é uma quimiocina importante no recrutamento dos monócitos/macrófagos e responsável pela migração de células T de memória. MCP-1/CCL2 é produzida por muitas células, como fibroblastos, ECs, astrócitos, células epiteliais e células do

músculo liso. Estas células são importantes nas respostas antivirais na circulação periférica bem como nos tecidos (299).

Estudo demonstrou aumento da permeabilidade vascular em células endoteliais vasculares num mecanismo dependente de MCP-1/CCL2 produzida em resposta a monócitos infectados pelo DENV-2 (146). Estudos prévios do nosso grupo encontraram elevados níveis de MCP-1/CCL2 nos pacientes com dengue e associação com hipotensão e trombocitopenia (147, 283).

Interessantemente, nós encontramos correlação positiva entre as citocinas IL-1 β e TNF- α ; e também entre a IL-8/CXCL8 e o TNF- α . No contexto da infecção e inflamação, as citocinas apresentam efeitos sinérgicos sobre o endotélio vascular, como por exemplo, o TNF- α , IL-1 β e IL-8/CXCL8, exacerbando ativação e consequente permeabilidade vascular. Além disso, outras citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ , IL-6 e quimiocinas como IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL10 já foram descritas em pacientes com dengue (146, 150, 158, 300, 301).

5.3 Distúrbios da coagulação na dengue

A hemostasia depende do equilíbrio entre os processos de coagulação e fibrinólise. Existem opiniões divergentes quanto à ativação alterada da fibrinólise e a possibilidade de existência de coagulação intravascular disseminada na dengue (193, 195, 302).

A via extrínseca da coagulação dependente do TF é o principal mecanismo através do qual se gera trombina em resposta a lesão vascular. O TF é uma proteína transmembrana de 47 kDa, presente nas células associadas com a parede vascular como células de músculo liso, fibroblastos e pericitos, sendo expresso nas lesões vasculares. As células endoteliais e os monócitos normalmente não expressam o TF, mas podem expressá-lo em resposta aos estímulos de citocinas como o TNF- α e IL-1 β . Desta forma, os monócitos e células endoteliais são fontes do TF solúvel (sTF) (303).

Nosso grupo demonstrou maior expressão do TF em monócitos de pacientes graves quando comparados aos pacientes brandos. Além disso, a contagem de plaquetas estava inversamente associada à expressão do TF nos monócitos, sugerindo que a ativação dessas células durante a infecção aumenta a expressão do TF contribuindo para trombocitopenia (200).

Estudo in vitro demonstrou que a infecção de células endoteliais pelo DENV induz expressão do TF e ativação do receptor PAR-1 (304). Outro estudo demonstrou maiores níveis plasmáticos do TF em crianças com SCD (196).

Em contraste ao TF, o TFPI é uma proteína anticoagulante produzida pelas células endoteliais, células do músculo liso e plaquetas, e atua inibindo o complexo TF-VIIa e o fator Xa, mas também apresenta propriedades anti-inflamatórias relacionadas à inibição de formação de trombina.

Neste estudo, encontramos níveis aumentados do TFPI nos pacientes com dengue quando comparados aos controles. Ainda, observamos correlação direta entre os níveis circulantes do sTF e TFPI. Possivelmente, o aumento dos níveis de TFPI durante a infecção pelo DENV seja um mecanismo regulador da expressão aumentada do TF e, conseqüentemente, da coagulação. Além disso, observamos que a contagem de plaquetas foi correlacionada inversamente com os níveis de TFPI. Provavelmente, a inibição do TF esteja relacionada com trombocitopenia.

Níveis plasmáticos reduzidos do sTF foram encontrados nos pacientes com dengue em comparação com os indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos na avaliação do sTF em nosso estudo diferem do trabalho de Wills e colaboradores (196) certamente devido ao quadro clínico mais brando dos pacientes infectados pelo DENV-4. No entanto, precisaríamos de um estudo comparativo com pacientes infectados por outros sorotipos para confirmar essa hipótese.

Geisbert e colaboradores mostraram que a administração de inibidor do TF reduziu a mortalidade de primatas que receberam dose letal do vírus ebola, mostrando que, de fato, a cascata da coagulação é um importante componente na patogenia das febres hemorrágicas virais (198, 199).

A trombomodulina (TM) é uma glicoproteína com propriedade anticoagulante, pela inibição da trombina e ativação da Proteína C (305). Além das ações anticoagulantes, as propriedades anti-inflamatórias da TM têm sido documentadas. Estudo mostrou que o tratamento de células endoteliais com anticorpo anti-trombomodulina induziu vias de sinalização inflamatórias (306). Além disso, os efeitos benéficos de TM foram demonstrados em ensaios clínicos. A trombomodulina alfa recombinante, com ações anticoagulantes e anti-inflamatórias foi efetiva na resolução rápida da coagulação intravascular disseminada, mostrando ser mais eficiente na inibição da coagulação do que a terapia tradicional com heparina (307)

Níveis aumentados de TM foram encontrados nos pacientes com FHD/SCD e associados com ativação das células endoteliais e choque (151, 196, 308). O estudo

de Del Moral-Hernandez e colaboradores demonstraram que pacientes com FHD e infectados pelo DENV-2 apresentaram maiores níveis circulantes de TM quando comparados com pacientes infectados pelo DENV-1 (308). Não encontramos diferença significativa nos níveis plasmáticos de TM nos pacientes analisados, provavelmente devido ao perfil brando do grupo analisado e o predomínio do DENV-4. No entanto, níveis significativamente mais elevados foram encontrados nos pacientes entre os dias 4-7 de doença.

Níveis diminuídos de fibrinogênio foram encontrados nas formas brandas e graves da dengue (194, 196). O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda e uma quantidade considerável tem que ser consumida antes que os níveis plasmáticos diminuam. Nós encontramos níveis significativamente diminuídos de fibrinogênio nos pacientes DCSA/DG em comparação com pacientes DSSA, mas em ambos os níveis de fibrinogênio não foram estatisticamente diferente dos controles.

Outra associação interessante foi encontrada entre os níveis de transaminases e presença de sangramentos nos pacientes. Embora o envolvimento do fígado pudesse contribuir nos transtornos hemostáticos, os estudos só encontraram testes de coagulação muito alterados nos pacientes DENV+ com insuficiência hepática, sugerindo-se que a função de síntese hepática dos fatores de coagulação geralmente é bem compensada (242).

Finalmente, nosso estudo tem algumas limitações a ter em conta, como o desenho de corte transversal com número insuficiente de pacientes graves e tamanho amostral heterogêneo para a análise dos parâmetros estudados, embora represente o perfil de resposta inflamatória encontrada na epidemia pelo DENV-4.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

- ✓ A epidemia de 2013 apresentou uma maior incidência do DENV-4 e em sua maioria os pacientes apresentaram manifestações clínicas brandas, corroborando com os dados apresentados pelo Ministério da Saúde.
- ✓ Uma maior proporção de infecção secundária foi demonstrada nos pacientes, em concordância com os dados epidemiológicos do Brasil.
- ✓ Níveis elevados de citocinas (TNF- α , IL-10 e IL-6) e quimiocinas (IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL10) foram observados nos grupos de pacientes infectados pelo DENV em relação aos controles, indicando o envolvimento destas proteínas na dengue.
- ✓ Níveis elevados de IL-10 e de IP-10/CXCL10 foram correlacionados a trombocitopenia e aos níveis das transaminases hepáticas, sugerindo uma importante participação em potencial destes mediadores inflamatórios na patogênese da doença.
- ✓ Não encontramos um bom valor preditivo de IL-10 e IP-10/CXCL10 na discriminação daqueles pacientes que desenvolverão DCSA/DG. No entanto pacientes DCSA/DG apresentaram maiores níveis de IL-10, enfatizando sua importância na dengue.
- ✓ Baixos níveis circulantes de TF e altos níveis de TFPI foram detectados nos pacientes com dengue, sugerindo desregulação da cascata da coagulação.

Como perspectiva, pretendemos estudar mediadores inflamatórios e de coagulação em pacientes infectados por outros sorotipos do DENV, também propomos analisar a expressão do TF e receptores PAR-1 e PAR-2 nos leucócitos humanos durante a infecção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. N Engl J Med. 2012;366(15):1423-32. Epub 2012/04/13.
2. Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. Science. 2013;342(6157):415. Epub 2013/10/26.
3. Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. Trop Med Health. 2011;39(4 Suppl):3-11. Epub 2012/04/14.
4. WHO. Dengue and severe dengue. Fact sheet N°117. Geneva 2014 [updated March 2014]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
5. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(2):200-7. Epub 2011/02/05.
6. WHO. Dengue, countries or areas at risk, 2013. Geneva2014; Available from: <http://www.who.int/ith/en/>.
7. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev. 1998;11(3):480-96. Epub 1998/07/17.
8. Halstead SB. Dengue: Overview and History. In: Halstead SB, editor. Dengue. London: Imperial College Press; 2008. p. 1-28.
9. Rigau-Perez JG. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. Am J Trop Med Hyg. 1998;59(2):272-4. Epub 1998/08/26.
10. Brathwaite Dick O, San Martin JL, Montoya RH, Del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the americas. Am J Trop Med Hyg. 2012;87(4):584-93. Epub 2012/10/09.

11. Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(7):532-41. Epub 2011/06/15.
12. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108 Suppl 1:11-7. Epub 2014/01/30.
13. Kuno G. Emergence of the severe syndrome and mortality associated with dengue and dengue-like illness: historical records (1890 to 1950) and their compatibility with current hypotheses on the shift of disease manifestation. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):186-201. Epub 2009/04/16.
14. Severo OP. Eradication of the *Aedes Aegypti* Mosquito from the Americas. Yellow fever, a symposium in commemoration of Carlos Juan Finlay; Philadelphia Jefferson Medical College; 1955. p. 39-59.
15. Löwy I. Representação e intervenção em saúde pública: vírus, mosquitos e especialistas da Fundação Rockefeller no Brasil. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos.* 1999;5:647-77.
16. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003;27(1):1-13. Epub 2003/05/03.
17. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ.* 1989;67(4):375-80. Epub 1989/01/01.
18. Pinheiro F. Re-Emergence of Dengue and Emergence of Dengue Haemorrhagic Fever in the Americas. *Dengue Bulletin.* 1997;21:16-24.
19. Allicock OM, Lemey P, Tatem AJ, Pybus OG, Bennett SN, Mueller BA, et al. Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Mol Biol Evol.* 2012;29(6):1533-43. Epub 2012/02/10.

20. Lorono Pino MA, Farfan Ale JA, Rosado Paredes EP, Kuno G, Gubler DJ. Epidemic dengue 4 in the Yucatan, Mexico, 1984. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993;35(5):449-55. Epub 1993/09/01.
21. Boshell J, Groot H, Gacharna M, Márquez G, González M, Gaitán MO, et al. Dengue en Colombia. *Biomedica*. 1986;6(3-4):6. Epub 1986-12-01.
22. Forshey BM, Morrison AC, Cruz C, Rocha C, Vilcarromero S, Guevara C, et al. Dengue virus serotype 4, northeastern Peru, 2008. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(11):1815-8. Epub 2009/11/07.
23. Fernandez J, Vera L, Tognarelli J, Fasce R, Araya P, Villagra E, et al. Detection of dengue virus type 4 in Easter Island, Chile. *Arch Virol*. 2011;156(10):1865-8. Epub 2011/06/22.
24. Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, Álvarez M, Rodríguez R, Kourí G, et al. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 1997;1:193-9.
25. Pan American Health Organization (PAHO). Five-fold increase in dengue cases in the Americas over the past decade Washington, D.C.2014 [28/07/2014]; Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9657%3Alos-casos-de-dengue-en-las-americas-se-quintuplicaron-en-diez-anos-segun-nuevos-datos-de-la-opsoms&catid=740%3Anews-press-releases&Itemid=1926&lang=en.
26. Pan American Health Organization (PAHO). Description of the current epidemiological trends of dengue in the Americas. Washington, D.C.2014 [28/07/2014]; Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=en.
27. Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect*. 2000;2(13):1643-9. Epub 2000/12/13.

28. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota previa. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1983;25(1):53-4. Epub 1983/01/01.
29. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986;81(2):245-6. Epub 1986/04/01.
30. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85(2):253. Epub 1990/04/01.
31. Nogueira RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991;86(2):269. Epub 1991/04/01.
32. Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(7):925-6. Epub 2001/10/31.
33. Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. Emerg Infect Dis. 2005;11(9):1376-81. Epub 2005/10/19.
34. Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC, Jr., Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. Emerg Infect Dis. 2010;16(3):576-8. Epub 2010/03/06.
35. Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, de Moraes Bronzoni RV, Bosch I, Nogueira ML. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. PLoS One. 2013;8(3):e59422. Epub 2013/03/28.
36. Casos de Dengue, casos graves e óbitos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013 [database on the Internet]. Sistema de Vigilância

em Saúde. 2014. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>.

37. dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol J.* 2011;8:387. Epub 2011/08/05.

38. Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):938-40. Epub 2011/05/03.

39. Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(11):1858-64. Epub 2012/10/25.

40. Ministério da Saúde. Dengue. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2014 [cited 2014]; Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>.

41. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 27 de 2014. *Boletim Epidemiológico* [Internet]. 2014; 45(16):[6 p.]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/17/BE-2014-45--16---Dengue--SE27-.pdf>.

42. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004;10(12 Suppl):S98-109. Epub 2004/12/04.

43. Sun P, Kochel TJ. The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis. *Scientific World Journal.* 2013;2013:843469. Epub 2013/03/12.

44. Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, Nelson MA, Herring BL, Hapel AJ, et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host

factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol Ther.* 2013;137(2):266-82. Epub 2012/10/30.

45. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):532-43. Epub 2011/07/16.

46. Crill WD, Chang GJ. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J Virol.* 2004;78(24):13975-86. Epub 2004/11/27.

47. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):523-40. Epub 2009/05/23.

48. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol.* 2005;174(1):395-403. Epub 2004/12/22.

49. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1165-8. Epub 2002/10/02.

50. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14333-8. Epub 2003/11/13.

51. Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* 2002;21(11):2757-68. Epub 2002/05/29.

52. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol.* 2005;79(17):11053-61. Epub 2005/08/17.

53. Mazzon M, Jones M, Davidson A, Chain B, Jacobs M. Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis.* 2009;200(8):1261-70. Epub 2009/09/17.
54. Carrington LB, Simmons CP. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Front Immunol.* 2014;5:290. Epub 2014/07/06.
55. Palucka AK. Dengue virus and dendritic cells. *Nat Med.* 2000;6(7):748-9. Epub 2000/07/11.
56. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 2004;189(8):1411-8. Epub 2004/04/10.
57. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000;6(7):816-20. Epub 2000/07/11.
58. Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009;40(2):253-62. Epub 2009/03/28.
59. Pova TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One.* 2014;9(4):e83386. Epub 2014/04/17.
60. Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e17. Epub 2008/02/13.
61. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;197(7):823-9. Epub 2003/04/12.

62. Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, et al. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*. 2006;124(3):485-93. Epub 2006/02/14.
63. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*. 2003;4(7):723-8. Epub 2003/06/05.
64. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog*. 2008;4(12):e1000244. Epub 2008/12/20.
65. Zaitseva E, Yang ST, Melikov K, Pourmal S, Chernomordik LV. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001131. Epub 2010/10/16.
66. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):365-75. Epub 2009/04/22.
67. Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses. *J Mol Biol*. 2014;426(6):1148-60. Epub 2013/12/10.
68. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New Edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf.
69. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998;352(9132):971-7. Epub 1998/09/30.
70. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis*. 1997;176(2):313-21. Epub 1997/08/01.

71. Cao XT, Ngo TN, Wills B, Kneen R, Nguyen TT, Ta TT, et al. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Viet Nam. *Trop Med Int Health*. 2002;7(2):125-32. Epub 2002/02/14.
72. Halsey ES, Vilcarrromero S, Forshey BM, Rocha C, Bazan I, Stoddard ST, et al. Performance of the tourniquet test for diagnosing dengue in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(1):99-104. Epub 2013/05/30.
73. Oliveira EC, Pontes ER, Cunha RV, Froes IB, Nascimento D. Alterações hematológicas em pacientes com dengue. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(6):682-5. Epub 2010/03/09.
74. Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanarooj S, et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *The Pediatric infectious disease journal*. 2007;26(4):283-90; discussion 91-2. Epub 2007/04/07.
75. Michels M, Sumardi U, de Mast Q, Jusuf H, Puspita M, Dewi IM, et al. The predictive diagnostic value of serial daily bedside ultrasonography for severe dengue in Indonesian adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6):e2277. Epub 2013/06/21.
76. Brito CA, Albuquerque Mde F, Lucena-Silva N. Evidência de alterações de permeabilidade vascular na dengue: quando a dosagem de albumina sérica define o quadro? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(2):220-3. Epub 2007/06/15.
77. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1997. Available from: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>.
78. Phuong CX, Nhan NT, Kneen R, Thuy PT, van Thien C, Nga NT, et al. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful? *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70(2):172-9. Epub 2004/03/03.

79. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*. 2006;11(8):1238-55. Epub 2006/08/15.
80. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 2006;368(9530):170-3. Epub 2006/07/11.
81. Rigau-Perez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(5):297-302. Epub 2006/04/25.
82. Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martinez E, et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC infectious diseases*. 2011;11:106. Epub 2011/04/23.
83. Jayaratne SD, Atukorale V, Gomes L, Chang T, Wijesinghe T, Fernando S, et al. Evaluation of the WHO revised criteria for classification of clinical disease severity in acute adult dengue infection. *BMC Res Notes*. 2012;5:645. Epub 2012/11/22.
84. Lima FR, Croda MG, Muniz DA, Gomes IT, Soares KR, Cardoso MR, et al. Evaluation of the traditional and revised world health organization classifications of dengue cases in Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(10):1299-304. Epub 2013/11/12.
85. Prasad D, Kumar C, Jain A, Kumar R. Accuracy and applicability of the revised WHO classification (2009) of dengue in children seen at a tertiary healthcare facility in northern India. *Infection*. 2013. Epub 2013/02/06.
86. Tsai CY, Lee IK, Lee CH, Yang KD, Liu JW. Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(4):271-81. Epub 2012/10/02.
87. Macedo GA, Gonin ML, Pone SM, Cruz OG, Nobre FF, Brasil P. Sensitivity and specificity of the World Health Organization dengue classification schemes for

severe dengue assessment in children in Rio de Janeiro. PLoS One. 2014;9(4):e96314. Epub 2014/04/30.

88. Horstick O, Jaenisch T, Martinez E, Kroeger A, See LL, Farrar J, et al. Comparing the Usefulness of the 1997 and 2009 WHO Dengue Case Classification: A Systematic Literature Review. Am J Trop Med Hyg. 2014. Epub 2014/06/25.

89. Rothman AL, Medin CL, Friberg H, Currier JR. Immunopathogenesis Versus Protection in Dengue Virus Infections. Current tropical medicine reports. 2014;1(1):13-20. Epub 2014/06/03.

90. Bente DA, Rico-Hesse R. Models of dengue virus infection. Drug Discov Today Dis Models. 2006;3(1):97-103. Epub 2007/12/19.

91. Jaiswal S, Pearson T, Friberg H, Shultz LD, Greiner DL, Rothman AL, et al. Dengue virus infection and virus-specific HLA-A2 restricted immune responses in humanized NOD-scid IL2rgammanull mice. PLoS One. 2009;4(10):e7251. Epub 2009/10/06.

92. Tan GK, Ng JK, Trasti SL, Schul W, Yip G, Alonso S. A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(4):e672. Epub 2010/05/04.

93. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg. 1977;26(3):337-43. Epub 1977/05/01.

94. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology. 1997;230(2):244-51. Epub 1997/04/14.

95. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol. 1999;73(6):4738-47. Epub 1999/05/11.

96. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005;79(2):853-9. Epub 2004/12/23.
97. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, 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.* 2010;4(3):e617. Epub 2010/03/09.
98. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisyakorn U, Scott RM, et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(2):191-202. Epub 2003/03/19.
99. Anantapreecha S, Chanama S, A An, Naemkhunthot S, Sa-NGasang A, Sawanpanyalert P, et al. Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol Infect.* 2005;133(3):503-7. Epub 2005/06/21.
100. Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simoes JB, Nogueira Fde B, da Rocha Queiroz Lima 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.* 2013;7(3):e2095. Epub 2013/03/22.
101. Ministério da Saúde. Dengue. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª edição ed. Brasília DF2010.
102. Nogueira RM, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Virol.* 1992;143(6):423-7. Epub 1992/11/01.
103. Reich NG, Shrestha S, King AA, Rohani P, Lessler J, Kalayanarooj S, et al. Interactions between serotypes of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. *J R Soc Interface.* 2013;10(86):20130414. Epub 2013/07/05.

104. Ferreira GL. Global dengue epidemiology trends. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54 Suppl 18:5-6. Epub 2012/10/04.
105. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med*. 1970;42(5):350-62. Epub 1970/04/01.
106. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38(1):172-80. Epub 1988/01/01.
107. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;11(4):223-7. Epub 2002/06/07.
108. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56(5):566-72. Epub 1997/05/01.
109. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013. Epub 2013/03/09.
110. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ*. 1980;58(1):1-21. Epub 1980/01/01.
111. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 2):365-75. Epub 2007/01/26.
112. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988;239(4839):476-81. Epub 1988/01/29.
113. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, et al. Dengue Virus (DV) enhancing antibody activity in preillness

plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. *J Infect Dis.* 2005;192(3):510-9. Epub 2005/07/05.

114. de Araujo JM, de Filippis AM, Schatzmayr HG, de Araujo ES, Britto C, Cardoso MA, et al. Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(9):952-4. Epub 2009/03/06.

115. Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneetrithep B, Marovich MA. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 2011;85(4):1671-83. Epub 2010/12/03.

116. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9(7):921-7. Epub 2003/06/17.

117. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 2006;176(6):3821-9. Epub 2006/03/07.

118. Markoff LJ, Innis BL, Houghten R, Henchal LS. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis.* 1991;164(2):294-301. Epub 1991/08/01.

119. Huang YH, Chang BI, Lei HY, Liu HS, Liu CC, Wu HL, et al. Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. *Clin Exp Immunol.* 1997;110(1):35-40. Epub 1997/11/14.

120. Chuang YC, Lei HY, Lin YS, Liu HS, Wu HL, Yeh TM. Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation. *J Immunol.* 2011;187(12):6483-90. Epub 2011/11/15.

121. Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(5):515-23. Epub 2011/04/20.
122. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol*. 2001;63(2):143-9. Epub 2001/02/15.
123. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol*. 2003;69(1):82-90. Epub 2002/11/19.
124. Halstead SB. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr Int Child Health*. 2012;32 Suppl 1:5-9. Epub 2012/06/08.
125. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(3):180-3. Epub 2001/09/20.
126. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, et al. Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis*. 2001;184(11):1369-73. Epub 2001/12/26.
127. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens*. 2002;60(4):309-18. Epub 2002/12/11.
128. Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, et al. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(6):559-62. Epub 2004/11/24.
129. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens*. 2004;64(4):469-72. Epub 2004/09/14.

130. Noecker CA, Amaya-Larios IY, Galeana-Hernandez M, Ramos-Castaneda J, Martinez-Vega RA. Contrasting associations of polymorphisms in FcγRIIIa and DC-SIGN with the clinical presentation of dengue infection in a Mexican population. *Acta Trop*. 2014. Epub 2014/06/10.
131. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):821-3. Epub 1987/01/01.
132. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(1):33-42. Epub 2002/03/15.
133. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511. Epub 2004/07/02.
134. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20. Epub 2010/03/23.
135. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. Epub 2006/02/25.
136. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S53-72. Epub 2009/11/26.
137. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35. Epub 2008/07/25.
138. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annual review of immunology*. 2010;28:321-42. Epub 2010/03/24.
139. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity*. 2007;27(3):370-83. Epub 2007/09/26.

140. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(2):222-9. Epub 1993/02/01.
141. Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Pinto LM, Smith N, Despres P, et al. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN-alpha production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(6):e2257. Epub 2013/06/12.
142. Sun P, Fernandez S, Marovich MA, Palmer DR, Celluzzi CM, Boonnak K, et al. Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology.* 2009;383(2):207-15. Epub 2008/11/18.
143. Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;338:67-82. Epub 2009/10/06.
144. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology.* 2014;32:659-702. Epub 2014/03/25.
145. Fink J, Gu F, Ling L, Tolfvenstam T, Olfat F, Chin KC, et al. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(2):e86. Epub 2007/12/07.
146. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 12):3623-30. Epub 2006/11/14.
147. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8:86. Epub 2008/06/27.

148. Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 2001;204(4):494-507. Epub 2002/01/05.
149. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(2):229-32. Epub 2001/04/04.
150. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48(3):324-31. Epub 1993/03/01.
151. Orsi FA, Angerami RN, Mazetto BM, Quaino SK, Santiago-Bassora F, Castro V, et al. Reduced thrombin formation and excessive fibrinolysis are associated with bleeding complications in patients with dengue fever: a case--control study comparing dengue fever patients with and without bleeding manifestations. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):350. Epub 2013/07/31.
152. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, 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*. 1991;88(5):1473-80. Epub 1991/11/01.
153. Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(1):142-7. Epub 2006/01/13.
154. Suharti C, van Gorp EC, Dolmans WM, Setiati TE, Hack CE, Djokomoeljanto R, et al. Cytokine patterns during dengue shock syndrome. *Eur Cytokine Netw*. 2003;14(3):172-7. Epub 2003/12/06.
155. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to

development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis.* 1999;179(4):755-62. Epub 1999/03/09.

156. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol.* 1999;59(3):329-34. Epub 1999/09/29.

157. Libraty DH, Endy TP, Hough HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis.* 2002;185(9):1213-21. Epub 2002/05/10.

158. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol.* 1998;161(11):6338-46. Epub 1998/12/02.

159. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 1998;56(3):280-5. Epub 1998/10/23.

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

161. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One.* 2012;7(12):e52215. Epub 2013/01/04.

162. Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, de Oliveira-Pinto LM. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(4):437-49. Epub 2006/09/05.

163. van de Weg CA, Pannuti CS, de Araujo ES, van den Ham HJ, Andeweg AC, Boas LS, et al. Microbial translocation is associated with extensive immune activation

in dengue virus infected patients with severe disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2236. Epub 2013/05/30.

164. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol*. 2006;143(2):345-56. Epub 2006/01/18.

165. Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001;30(3):229-33. Epub 2001/05/04.

166. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. 1991;30(43):10363-70. Epub 1991/10/29.

167. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood reviews*. 2003;17 Suppl 1:S1-5. Epub 2003/12/31.

168. McMichael M. New models of hemostasis. *Topics in companion animal medicine*. 2012;27(2):40-5. Epub 2012/10/04.

169. Mackman N. The many faces of tissue factor. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7 Suppl 1:136-9. Epub 2009/07/28.

170. Malarstig A, Siegbahn A. The intersubject variability of tissue factor mRNA production in human monocytes--relation with the toll-like receptor 4. *Thrombosis research*. 2007;120(3):407-13. Epub 2006/12/13.

171. Osterud B. Tissue factor/TFPI and blood cells. *Thrombosis research*. 2012;129(3):274-8. Epub 2011/12/27.

172. Ott I. Inhibitors of the initiation of coagulation. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;72(4):547-52. Epub 2011/03/12.

173. Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol.* 2006;208(3):327-39. Epub 2005/11/02.
174. Petaja J. Inflammation and coagulation. An overview. *Thrombosis research.* 2011;127 Suppl 2:S34-7. Epub 2011/01/05.
175. van der Poll T, de Boer JD, Levi M. The effect of inflammation on coagulation and vice versa. *Current opinion in infectious diseases.* 2011;24(3):273-8. Epub 2011/02/19.
176. Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie.* 2010;30(1):10-2, 4-6. Epub 2010/02/18.
177. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Critical care medicine.* 2010;38(2 Suppl):S26-34. Epub 2010/01/30.
178. Olson ST, Bjork I. Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. *Semin Thromb Hemost.* 1994;20(4):373-409. Epub 1994/01/01.
179. Vine AK. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina (Philadelphia, Pa).* 2009;29(1):1-7. Epub 2008/12/04.
180. Ferreira CN, Sousa MdO, Dusse LMSA, Carvalho MdG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2010;32:416-21.
181. Cimmino G, D'Amico C, Vaccaro V, D'Anna M, Golino P. The missing link between atherosclerosis, inflammation and thrombosis: is it tissue factor? Expert review of cardiovascular therapy. 2011;9(4):517-23. Epub 2011/04/27.
182. Antoniak S, Mackman N. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection. *Blood.* 2014;123(17):2605-13. Epub 2014/03/19.
183. Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation.* 2004;109(22):2698-704. Epub 2004/06/09.

184. Ruf W. Emerging roles of tissue factor in viral hemorrhagic fever. *Trends in immunology*. 2004;25(9):461-4. Epub 2004/08/25.
185. Ramachandran R, Hollenberg MD. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *British journal of pharmacology*. 2008;153 Suppl 1:S263-82. Epub 2007/12/07.
186. Chen JP, Cosgriff TM. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2000;11(5):461-83. Epub 2000/08/11.
187. Serra MF, Diaz BL, Barreto EO, Cordeiro RS, Nazare Meirelles MN, Williams TJ, et al. Mechanism underlying acute resident leukocyte disappearance induced by immunological and non-immunological stimuli in rats: evidence for a role for the coagulation system. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2000;49(12):708-13. Epub 2001/02/24.
188. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;99(2):305-15. Epub 2008/02/19.
189. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in immunopathology*. 2012;34(1):43-62. Epub 2011/11/01.
190. Goeijenbier M, van Wissen M, van de Weg C, Jong E, Gerdes VE, Meijers JC, et al. Review: Viral infections and mechanisms of thrombosis and bleeding. *J Med Virol*. 2012;84(10):1680-96. Epub 2012/08/30.
191. Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S, Thisyakorn U, Lusher J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97(4):627-34. Epub 2007/03/30.
192. Avila-Aguero ML, Avila-Aguero CR, Um SL, Soriano-Fallas A, Canas-Coto A, Yan SB. Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection. *Cytokine*. 2004;27(6):173-9. Epub 2004/08/12.

193. Mairuhu AT, Mac Gillavry MR, Setiati TE, Soemantri A, ten Cate H, Brandjes DP, et al. Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence. *The Lancet infectious diseases*. 2003;3(1):33-41. Epub 2002/12/31.
194. Wills B, Tran VN, Nguyen TH, Truong TT, Tran TN, Nguyen MD, et al. Hemostatic changes in Vietnamese children with mild dengue correlate with the severity of vascular leakage rather than bleeding. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;81(4):638-44. Epub 2009/10/10.
195. Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HL, Lin YS, et al. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *Journal of medical virology*. 2001;63(3):247-51. Epub 2001/02/15.
196. Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, Daramola OA, Dung NM, Loan HT, et al. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;35(3):277-85. Epub 2002/07/13.
197. Chuansumrit A, Chaiyaratana W. Hemostatic derangement in dengue hemorrhagic fever. *Thromb Res*. 2013. Epub 2013/10/15.
198. Geisbert TW, Hensley LE, Jahrling PB, Larsen T, Geisbert JB, Paragas J, et al. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet*. 2003;362(9400):1953-8. Epub 2003/12/20.
199. Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, Davis KJ, Kagan E, Hensley LE. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(11):1618-29. Epub 2003/11/26.
200. de Azeredo EL, Kubelka CF, Albuquerque LM, Barbosa LS, Damasco PV, Avila CA, et al. Tissue factor expression on monocytes from patients with severe

dengue fever. *Blood cells, molecules & diseases*. 2010;45(4):334-5. Epub 2010/09/18.

201. Jiang Z, Tang X, Xiao R, Jiang L, Chen X. Dengue virus regulates the expression of hemostasis-related molecules in human vein endothelial cells. *The Journal of infection*. 2007;55(2):e23-8. Epub 2007/06/19.

202. de Souza VA, Tateno AF, Oliveira RR, Domingues RB, Araujo ES, Kuster GW, et al. Sensitivity and specificity of three ELISA-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. *J Clin Virol*. 2007;39(3):230-3. Epub 2007/05/19.

203. Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health*. 2011;16(8):936-48. Epub 2011/06/01.

204. Ministério da Saúde. Dengue: monitoramento das primeiras Semanas Epidemiológicas (SE) de 2014, Brasil. *Boletim Epidemiológico* [Internet]. 2014; 44. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/23/Boletim-dengue-abril.pdf>.

205. Leo YS, Gan VC, Ng EL, Hao Y, Ng LC, Pok KY, et al. Utility of warning signs in guiding admission and predicting severe disease in adult dengue. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):498. Epub 2013/10/25.

206. Rathakrishnan A, Klekamp B, Wang SM, Komarasamy TV, Natkunam SK, Sathar J, et al. Clinical and immunological markers of dengue progression in a study cohort from a hyperendemic area in Malaysia. *PLoS One*. 2014;9(3):e92021. Epub 2014/03/22.

207. Cavalcanti LP, Mota LA, Lustosa GP, Fortes MC, Mota DA, Lima AA, et al. Evaluation of the WHO classification of dengue disease severity during an epidemic in 2011 in the state of Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(1):93-8. Epub 2014/03/15.

208. Duran A, Ochoa E, Alcocer S, Gomez M, Millano M, Martinez O, et al. Frecuencia de signos y síntomas gastrointestinales del dengue. Analisis de una cohorte de 1484 pacientes. *Invest Clin*. 2013;54(3):299-310. Epub 2013/12/21.
209. Pires Neto Rda J, de Sa SL, Pinho SC, Pucci FH, Teofilo CR, Evangelista PD, et al. Dengue infection in children and adolescents: clinical profile in a reference hospital in northeast Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(6):765-8. Epub 2014/01/30.
210. Wong JG, Gan VC, Ng EL, Leo YS, Chan SP, Choo R, et al. Self-reported pain intensity with the numeric reporting scale in adult dengue. *PLoS One*. 2014;9(5):e96514. Epub 2014/05/03.
211. Santiago A, Fernandez-Sein A. Dengue in children: critical points in management. *P R Health Sci J*. 2001;20(4):343-6. Epub 2002/02/16.
212. Setiawan MW, Samsi TK, Wulur H, Sugianto D, Pool TN. Epigastric pain and sonographic assessment of the pancreas in dengue hemorrhagic fever. *J Clin Ultrasound*. 1998;26(5):257-9. Epub 1998/06/03.
213. Simadibrata M. Acute pancreatitis in dengue hemorrhagic fever. *Acta Med Indones*. 2012;44(1):57-61. Epub 2012/03/28.
214. Wu KL, Changchien CS, Kuo CM, Chuah SK, Lu SN, Eng HL, et al. Dengue fever with acute acalculous cholecystitis. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(6):657-60. Epub 2003/07/31.
215. Sharma N, Mahi S, Bhalla A, Singh V, Varma S, Ratho RK. Dengue fever related acalculous cholecystitis in a North Indian tertiary care hospital. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(4):664-7. Epub 2006/05/09.
216. Marin J, Vilcarromero S, Forshey BM, Celis-Salinas JC, Ramal-Asayag C, Morrison AC, et al. Compromiso gastrointestinal agudo en pacientes con dengue por serotipo 4: Comunicacion de un caso y revision de la literatura. *Rev Chilena Infectol*. 2013;30(5):541-7. Epub 2013/11/20.

217. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology*. 2000;13(2):261-76. Epub 2000/08/16.
218. Orsi FA, Angerami RN, Mazetto BM, Quaino SK, De Paula EV, Annichino-Bizzachi JM. Bleeding complications in dengue are not associated with significant changes in the modulators of the endothelial barrier. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(6):799-803. Epub 2014/06/12.
219. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Análise de situação e tendências - 2010. Available from: http://www.dengue.org.br/informe_da_dengue_2010.pdf.
220. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000;181(1):2-9. Epub 1999/12/23.
221. Thomas L, Najjioullah F, Besnier F, Valentino R, Cesaire JR, Cabie A. Clinical Presentation of Dengue by Serotype and Year of Epidemic in Martinique. *Am J Trop Med Hyg*. 2014. Epub 2014/05/29.
222. Nishiura H, Halstead SB. Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. *J Infect Dis*. 2007;195(7):1007-13. Epub 2007/03/03.
223. Silva C, Bressan C, Romero C, Valls R, Grinstein B, Nogueira R, et al. DENV-4 infections in HIV positive patients. XVIII Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine; Rio de Janeiro, Brasil2012.
224. Limonta D, Falcon V, Torres G, Capo V, Menendez I, Rosario D, et al. Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. *Infection*. 2012. Epub 2012/04/25.

225. Wang W-K, Chao D-Y, Kao C-L, Wu H-C, Liu Y-C, Li C-M, et al. High Levels of Plasma Dengue Viral Load during Defervescence in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever: Implications for Pathogenesis. *Virology*. 2003;305(2):330-8.
226. Duyen HT, Ngoc TV, Ha do T, Hang VT, Kieu NT, Young PR, et al. Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *J Infect Dis*. 2011;203(9):1292-300. Epub 2011/02/22.
227. Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(9):e1309. Epub 2011/09/13.
228. Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeung N, et al. Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(7):e1244. Epub 2011/08/04.
229. Oishi K, Saito M, Mapua CA, Natividad FF. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother*. 2007;13(3):125-33. Epub 2007/06/27.
230. Azin FR, Goncalves RP, Pitombeira MH, Lima DM, Branco IC. Dengue: profile of hematological and biochemical dynamics. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(1):36-41. Epub 2012/10/11.
231. Fiestas Solorzano V, Sihuincha Maldonado M, Donaires Toscano F, Durand Velazco S, Garcia MM, Mamani E, et al. Características clínicas de pacientes internados en el Hospital de Apoyo de Iquitos "Cesar Garayar Garcia" durante la epidemia de dengue, enero-febrero de 2011. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;28(1):78-82. Epub 2011/05/04.
232. Murgue B, Cassar O, Guigon M, Chungue E. Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *J Infect Dis*. 1997;175(6):1497-501. Epub 1997/06/01.

233. Basu A, Jain P, Gangodkar SV, Shetty S, Ghosh K. Dengue 2 virus inhibits in vitro megakaryocytic colony formation and induces apoptosis in thrombopoietin-inducible megakaryocytic differentiation from cord blood CD34+ cells. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008;53(1):46-51. Epub 2008/03/29.
234. Tsai JJ, Liu LT, Chang K, Wang SH, Hsiao HM, Clark KB, et al. The importance of hematopoietic progenitor cells in dengue. *Therapeutic advances in hematology*. 2011;3(1):59-71. Epub 2012/02/01.
235. Nakao S, Lai CJ, Young NS. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood*. 1989;74(4):1235-40. Epub 1989/09/01.
236. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost*. 2013;11(5):951-62. Epub 2013/02/26.
237. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol*. 2006;19(2):127-32. Epub 2006/07/05.
238. Torrentes-Carvalho A, Marinho CF, de Oliveira-Pinto LM, de Oliveira DB, Damasco PV, Cunha RV, et al. Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue. *Immunobiology*. 2014;219(5):329-40. Epub 2014/02/11.
239. Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res Virol*. 1997;148(4):273-7. Epub 1997/07/01.
240. Souza LJ, Alves JG, Nogueira RM, Gicovate Neto C, Bastos DA, Siqueira EW, et al. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(2):156-63. Epub 2004/09/14.
241. Lee LK, Gan VC, Lee VJ, Tan AS, Leo YS, Lye DC. Clinical relevance and discriminatory value of elevated liver aminotransferase levels for dengue severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1676. Epub 2012/06/09.

242. Trung DT, Thao le TT, Hien TT, Hung NT, Vinh NN, Hien PT, et al. Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(4):774-80. Epub 2010/10/05.
243. Chongsrisawat V, Hutagalung Y, Poovorawan Y. Liver function test results and outcomes in children with acute liver failure due to dengue infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009;40(1):47-53. Epub 2009/03/28.
244. Poovorawan Y, Hutagalung Y, Chongsrisawat V, Boudville I, Bock HL. Dengue virus infection: a major cause of acute hepatic failure in Thai children. *Ann Trop Paediatr.* 2006;26(1):17-23. Epub 2006/02/24.
245. Kumar R, Tripathi P, Tripathi S, Kanodia A, Venkatesh V. Prevalence of dengue infection in north Indian children with acute hepatic failure. *Ann Hepatol.* 2008;7(1):59-62. Epub 2008/04/01.
246. Ling LM, Wilder-Smith A, Leo YS. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 2007;38(3):265-8. Epub 2007/02/20.
247. Viswanathan S, Iqbal N, Anemon PP, Kumar GS. Fatal fulminant hepatic failure in a diabetic with primary dengue. *J Trop Med.* 2010;2010:413561. Epub 2011/01/15.
248. Giri S, Agarwal MP, Sharma V, Singh A. Acute hepatic failure due to dengue: A case report. *Cases J.* 2008;1(1):204. Epub 2008/10/04.
249. Lawn SD, Tilley R, Lloyd G, Finlayson C, Tolley H, Newman P, et al. Dengue hemorrhagic fever with fulminant hepatic failure in an immigrant returning to Bangladesh. *Clin Infect Dis.* 2003;37(1):e1-4. Epub 2003/06/28.
250. Tan SS, Bujang MA. The clinical features and outcomes of acute liver failure associated with dengue infection in adults: a case series. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(2):164-9. Epub 2013/03/05.

251. Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(7):608-14. Epub 2006/02/18.
252. Sung JM, Lee CK, Wu-Hsieh BA. Intrahepatic infiltrating NK and CD8 T cells cause liver cell death in different phases of dengue virus infection. *PLoS One.* 2012;7(9):e46292. Epub 2012/10/11.
253. Tristao-Sa R, Kubelka CF, Zandonade E, Zagne SM, Rocha Nde S, Zagne LO, et al. Clinical and hepatic evaluation in adult dengue patients: a prospective two-month cohort study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(6):675-81. Epub 2013/01/09.
254. Miranda CH, Borges Mde C, Schmidt A, Pazin-Filho A, Rossi MA, Ramos SG, et al. A case presentation of a fatal dengue myocarditis showing evidence for dengue virus-induced lesion. *European heart journal Acute cardiovascular care.* 2013;2(2):127-30. Epub 2013/11/14.
255. Lizarraga KJ, Nayer A. Dengue-associated kidney disease. *Journal of nephrology.* 2014;3(2):57-62. Epub 2014/04/29.
256. Tang Y, Kou Z, Tang X, Zhang F, Yao X, Liu S, et al. Unique impacts of HBV co-infection on clinical and laboratory findings in a recent dengue outbreak in China. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(2):154-8. Epub 2008/08/12.
257. Gan CS, Chong SY, Lum LC, Lee WS. Regular paracetamol in severe dengue: a lethal combination? *Singapore Med J.* 2013;54(2):e35-7. Epub 2013/03/07.
258. Ranganathan SS, Sathiadas MG, Sumanasena S, Fernandopulle M, Lamabadusuriya SP, Fernandopulle BM. Fulminant hepatic failure and paracetamol overuse with therapeutic intent in febrile children. *Indian J Pediatr.* 2006;73(10):871-5. Epub 2006/11/09.
259. Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascon J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet neurology.* 2013;12(9):906-19. Epub 2013/08/21.

260. Assir MZ, Ahmad HI, Masood MA, Kamran U, Yusuf NW. Deaths due to dengue fever at a tertiary care hospital in Lahore, Pakistan. *Scand J Infect Dis*. 2014. Epub 2014/02/05.
261. Goncalves E. Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (Guillain-Barre syndrome) following dengue fever. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011;53(4):223-5. Epub 2011/09/15.
262. Chaudhary SC, Mohanty D, Sonkar SK, Gupta DK, Gupta A. Unusual manifestation of dengue fever. *BMJ Case Rep*. 2011;2011. Epub 2011/01/01.
263. Santos NQ, Azoubel AC, Lopes AA, Costa G, Bacellar A. Guillain-Barre syndrome in the course of dengue: case report. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(1):144-6. Epub 2004/05/04.
264. Soares CN, Cabral-Castro M, Oliveira C, Faria LC, Peralta JM, Freitas MR, et al. Oligosymptomatic dengue infection: a potential cause of Guillain Barre syndrome. *Arq Neuropsiquiatr*. 2008;66(2A):234-7. Epub 2008/06/12.
265. Puccioni-Sohler M, Orsini M, Soares CN. Dengue: a new challenge for neurology. *Neurol Int*. 2012;4(3):e15. Epub 2013/01/29.
266. Halsey ES, Marks MA, Gotuzzo E, Fiestas V, Suarez L, Vargas J, et al. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1638. Epub 2012/05/09.
267. Burke-Gaffney A, Keenan AK. Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 alpha/beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunopharmacology*. 1993;25(1):1-9. Epub 1993/01/01.
268. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res*. 2006;123(1):25-30. Epub 2006/03/29.

269. Iyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med J.* 1995;36(2):218-21. Epub 1995/04/01.
270. Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(1):70-5. Epub 2001/08/16.
271. Rachman A, Rinaldi I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. *Acta medica Indonesiana.* 2006;38(2):105-8. Epub 2006/06/27.
272. Pinto LM, Oliveira SA, Braga EL, Nogueira RM, Kubelka CF. 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.* 1999;94(3):387-94. Epub 1999/06/01.
273. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(1-2):71-5. Epub 2001/05/19.
274. Levy A, Valero N, Espina LM, Anez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(1):16-23. Epub 2009/09/08.
275. Ganter U, Arcone R, Toniatti C, Morrone G, Ciliberto G. Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *EMBO J.* 1989;8(12):3773-9. Epub 1989/12/01.
276. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989;242(2):237-9. Epub 1989/01/02.
277. Herrmann JL, Blanchard H, Brunengo P, Lagrange PH. TNF alpha, IL-1 beta and IL-6 plasma levels in neutropenic patients after onset of fever and correlation

with the C-reactive protein (CRP) kinetic values. *Infection*. 1994;22(5):309-15. Epub 1994/09/01.

278. Du Clos TW. Pentraxins: structure, function, and role in inflammation. *ISRN inflammation*. 2013;2013:379040. Epub 2013/10/30.

279. Lelubre C, Anselin S, Zouaoui Boudjeltia K, Biston P, Piagnerelli M. Interpretation of C-reactive protein concentrations in critically ill patients. *BioMed research international*. 2013;2013:124021. Epub 2013/11/29.

280. Ho TS, Wang SM, Lin YS, Liu CC. Clinical and laboratory predictive markers for acute dengue infection. *J Biomed Sci*. 2013;20(1):75. Epub 2013/10/22.

281. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002;13(4-5):323-40. Epub 2002/09/11.

282. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(12):2930-40.

283. de-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setubal S, et al. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1beta and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(1):48-56. Epub 2012/02/09.

284. Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, et al. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(1):43-50. Epub 2005/03/23.

285. Malavige GN, McGowan S, Atukorale V, Salimi M, Peelawatta M, Fernando N, et al. Identification of serotype-specific T cell responses to highly conserved regions of the dengue viruses. *Clin Exp Immunol*. 2012;168(2):215-23. Epub 2012/04/05.

286. Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes

during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis.* 2005;5:64. Epub 2005/08/20.

287. Lehmann AK, Halstensen A, Sornes S, Rokke O, Waage A. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect Immun.* 1995;63(6):2109-12. Epub 1995/06/01.

288. Tsai TT, Chuang YJ, Lin YS, Wan SW, Chen CL, Lin CF. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 2013;20:40. Epub 2013/06/27.

289. Malavige GN, Jeewandara C, Alles KM, Salimi M, Gomes L, Kamaladasa A, et al. Suppression of virus specific immune responses by IL-10 in acute dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(9):e2409. Epub 2013/09/17.

290. Perez AB, Garcia G, Sierra B, Alvarez M, Vazquez S, Cabrera MV, et al. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol.* 2004;73(2):230-4. Epub 2004/05/04.

291. Malavige GN, Huang LC, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. *PLoS One.* 2012;7(11):e50387. Epub 2012/12/05.

292. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, de Assis EF, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol.* 2014;193(4):1864-72. Epub 2014/07/13.

293. Malavige GN, Gomes L, Alles L, Chang T, Salimi M, Fernando S, et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):341. Epub 2013/07/26.

294. Brasier AR, Ju H, Garcia J, Spratt HM, Victor SS, Forshey BM, et al. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(2):341-8. Epub 2012/02/04.

295. Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun.* 2000;68(2):702-7. Epub 2000/01/20.
296. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 2008;48:171-97. Epub 2007/09/22.
297. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine & growth factor reviews.* 1997;8(3):207-19. Epub 1998/02/14.
298. Reiberger T, Aberle JH, Kundi M, Kohrgruber N, Rieger A, Gangl A, et al. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther.* 2008;13(8):969-76. Epub 2009/02/07.
299. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research.* 2009;29(6):313-26. Epub 2009/05/16.
300. Chen JP, Lu HL, Lai SL, Campanella GS, Sung JM, Lu MY, 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.* 2006;177(5):3185-92. Epub 2006/08/22.
301. Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *The Ceylon medical journal.* 1991;36(2):63-5. Epub 1991/06/01.
302. Van Gorp EC, Setiati TE, Mairuhu AT, Suharti C, Cate Ht H, Dolmans WM, et al. Impaired fibrinolysis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 2002;67(4):549-54. Epub 2002/07/13.

303. Butenas S. Tissue factor structure and function. *Scientifica*. 2012;2012:964862. Epub 2012/01/01.
304. Huerta-Zepeda A, Cabello-Gutierrez C, Cime-Castillo J, Monroy-Martinez V, Manjarrez-Zavala ME, Gutierrez-Rodriguez M, et al. Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;99(5):936-43. Epub 2008/05/02.
305. Okamoto T, Tanigami H, Suzuki K, Shimaoka M. Thrombomodulin: a bifunctional modulator of inflammation and coagulation in sepsis. *Critical care research and practice*. 2012;2012:614545. Epub 2012/04/07.
306. Nara H, Okamoto H, Minota S, Yoshio T. Mouse monoclonal anti-human thrombomodulin antibodies bind to and activate endothelial cells through NF-kappaB activation in vitro. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(5):1629-37. Epub 2006/04/29.
307. Ogawa Y, Yamakawa K, Ogura H, Kiguchi T, Mohri T, Nakamori Y, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin improves mortality and respiratory dysfunction in patients with severe sepsis. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2012;72(5):1150-7. Epub 2012/06/08.
308. Del Moral-Hernandez O, Martinez-Hernandez NE, Mosso-Pani MA, Hernandez-Sotelo D, Illades-Aguiar B, Flores-Alfaro E, et al. Association DENV1 and DENV2 infection with high serum levels of soluble thrombomodulin and VEGF in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(2):370-8. Epub 2014/03/07.

8 ANEXOS

ANEXO A. FICHA CLÍNICA

Projeto Dengue
Laboratório de Imunologia Viral - FIOCRUZ
2013

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?				
Recebe 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	Ictericidade	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	Epístaxe	Metrorragia
Outras:				

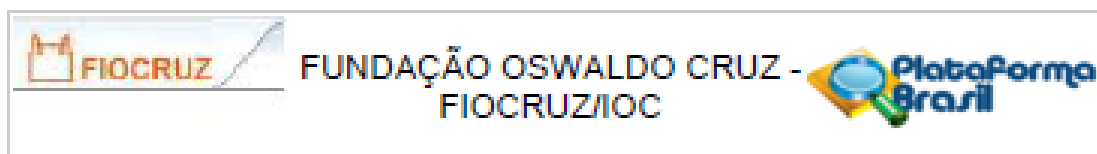
LABORATORIAL

1º HT: _____ 1º Plaqueta: _____ data: ___/___/___
2º HT: _____ 2º Plaqueta: _____ data: ___/___/___
último HT: _____ última Plaqueta: _____ data: ___/___/___

Anexar dados do hemograma e bioquímico

Outras informações:

ANEXO B. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ



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

Área Temática:

Versão: 2

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)2581-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 425.620

A folha de rosto. A avaliação genética será apenas de polimorfismos, sendo enquadrado na área temática 3, em que não é necessária a avaliação pela CONEP.

TCLE. O texto deste documento é esclarecedor sobre a pesquisa e seu objetivo geral, traz suficiente informação sobre a venopuntura a qual serão submetidos os voluntários e fornece o nome, endereço e telefone do responsável pela pesquisa, assim como os do Comitê de Ética. Consta do TCLE o pedido de consentimento dos responsáveis por voluntários menores de idade. O Termo de assentimento, por faixa etária, para menores de 18 anos foi acrescentado.

Projeto de Pesquisa no formato da PB e no formato de projeto científico. Consta no documento no formato da PB a FIOCRUZ/IOC no Apoio Financeiro, com dados do CEP FIOCRUZ/IOC: CNPJ, email e telefone.

O Cronograma foi atualizado.

Foram anexados os termos de compromisso/participação das Instituições Co-participantes (Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro/RJ, Fundação Municipal de Saúde de Niterói/RJ, UFMS e UFPE)

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade Indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, em sua 189ª Reunião Ordinária, realizada em 16.12.2013, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se por aprovar o projeto de pesquisa em pauta.

Situação do Parecer:

Aprovado

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

ANEXO C. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Instituição: Fundação Oswaldo Cruz-IOC e Hospital Rio-Laranjeiras
Projeto de Pesquisa: IMUNOPATOLOGIA DA DENGUE: Envolvimento da imunidade inata e adaptativa na imunopatologia da infecção pelo Dengue
Investigadores: Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco, Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto, Dra. Elzinandes Leal Azeredo, Dra. Claire Fernandes Kubelka.
Objetivo da Pesquisa: ESTUDAR A DOENÇA DA DENGUE PARA MELHORAR OS TRATAMENTOS E AJUDAR O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA EFICAZ.

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 Hospital Rio-Laranjeiras. 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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz-IOC e Centro de Referência de Dengue (CRD) - Hospital Plantadores de Cana, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Projeto de Pesquisa: IMUNOPATOLOGIA DA DENGUE: Envolvimento da imunidade inata e adaptativa na imunopatologia da infecção pelo Dengue

Investigadores: Prof. DR. LUIZ JOSÉ DE SOUZA, DRA. LUZIA MARIA DE OLIVEIRA PINTO, DRA. ELZINANDES LEAL AZEREDO, DRA. CLAIRE FERNANDES KUBELKA.

Objetivo da Pesquisa: ESTUDAR A DOENÇA DA DENGUE PARA MELHORAR OS TRATAMENTOS E AJUDAR O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA EFICAZ.

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz-IOC e Centro Especializado em Doenças Infecciosas - Parasitárias (CEDIP), Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Projeto de Pesquisa: IMUNOPATOLOGIA DA DENGUE: Envolvimento da imunidade inata e adaptativa na imunopatologia da infecção pelo Dengue

Investigadores: Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, Dra. Lúzia Maria de Oliveira Pinto, Dra. Elzinandes Leal Azeredo, Dra. Claire Fernandes Kubelka.

Objetivo da Pesquisa: ESTUDAR A DOENÇA DA DENGUE PARA MELHORAR OS TRATAMENTOS E AJUDAR O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA EFICAZ.

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 CEDIP. 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. Lúzia Maria de Oliveira Pinto (021) 8755-7771

Dra. Elzinandes L Azeredo (021) 7183-9093