

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À PERMEABILIDADE
ENDOTELIAL NA DENGUE**

JULIANA FREITAS LOPES

RIO DE JANEIRO

Maio/2016

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

L864 Lopes, Juliana Freitas

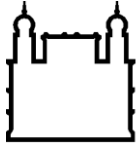
Investigação dos mecanismos associados à permeabilidade endotelial na dengue / Juliana Freitas Lopes. – Rio de Janeiro, 2016.
xv, 108 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 61-79

1. Dengue. 2. Dengue grave. 3. Permeabilidade vascular. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JULIANA FREITAS LOPES

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À PERMEABILIDADE
ENDOTELIAL NA DENGUE**

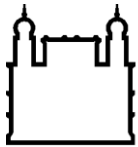
Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Doutor em Biologia
Celular e Molecular.

Orientadores: Dra. Patrícia Torres Bozza

Dr. Fernando Augusto Bozza

RIO DE JANEIRO

Maio/2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: Juliana Freitas Lopes

Investigação dos mecanismos associados à permeabilidade endotelial na Dengue.

ORIENTADORES: Dra. Patrícia Torres Bozza

Dr. Fernando Augusto Bozza

Aprovada em: 30 de maio de 2016

Examinadores: Dr. Thiago Moreno de Souza (FIOCRUZ)

Dr^a. Danielle da Glória de Souza (UFMG)

Dr^a. Veronica Morandi (UERJ)

Revisor (a): Dr^a Elzinandes Leal de Azeredo

Suplentes: Dr^a Elzinandes Leal de Azeredo

Dr^a Monique Trugilho

Rio de Janeiro, 30 Maio de 2016

*Dedico esta tese à minha mãe e irmã,
Arlene e Clarisse.*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha família, em especial a minha mãe e minha irmã por todo apoio, compreensão e amor.

Agradeço aos meus orientadores, Dr^a Patricia Torres Bozza e Fernando Augusto Bozza pelos exemplos de competência e dedicação, pelo apoio, paciência, orientação e incentivo. Obrigada pela confiança depositada para a realização deste projeto.

Ao Dr. Eugênio Hottz pela parceria, orientação e amizade construída desde o início deste projeto. Muito obrigada por tudo.

À Dr^a Verônica Morandi do Laboratório da Célula Endotelial e Angiogênese da UERJ por ter cedido gentilmente às células endoteliais utilizadas neste estudo.

Ao Dr. Guy A. Zimmerman da Universidade de Utah pela atenção dada sempre que possível, pelas discussões extremamente construtivas e carinho.

Ao Edson Assis, pela ajuda nas dosagens de mediadores inflamatórios, por estar sempre disposto a ajudar, pelas boas conversas, amizade e caronas. Obrigada “cabeça”.

Ao Dr. Alan Carneiro de Brito pela ajuda na técnica de *Western blotting*, pelo carinho e amizade.

Aos colaboradores do IPEC Rogério Valls-de-Souza, André M. Japiassú, Emerson C. Mesquita, Rodrigo Amâncio, Patrícia Brasil, Elizabeth Machado e Carolina Romero pela ajuda valiosa na análise dos dados clínicos de pacientes.

À Rose B. Rodrigues, conhecedora de todos os processos envolvidos na rotina administrativa do laboratório, facilitando assim processos indispensáveis ao nosso trabalho. Muito obrigada!

Á minha querida amiga Dr^a Carla Freitas pelo acolhimento quando cheguei ao laboratório, ajuda com os experimentos e principalmente pelas conversas e amizade. Obrigada Carlinha!

À Sally Liechoki, por todo o apoio, carinho, amizade e risadas durante esses “eternos” quatro anos. Obrigada!

À Giselle Lima Barbosa, pela parceria no grupo Dengue, carinho e amizade.

Este espaço é pequeno para os meus agradecimentos à todos os membros do Laboratório de Imunofarmacologia. Todos estão envolvidos diretamente ou indiretamente com este trabalho, e sou extremamente lisonjeada e agradecida em fazer parte deste grupo. Obrigada, Ligia Paiva, Ana Paula Monteiro, Luciana Moreira, Andreia Surrage, Lohanna Palhinha, Jéssica Pereira, Leonardo Assunção, Narayana Fazolini, Natalia Roque, Vinícius Guerra, Marcus Raposo, Ester Barreto, Eugenia Cabalen, Felipe Dutra, Glaucia Almeida, Henrique Nahal, Isabel Mattos, Livia Teixeira, Suelen Dias, Flora Magno.

Ao meu namorado Thiago Salama Rodrigues, pelo apoio, carinho e amor. Por sempre se mostrar compreensivo e ser meu parceiro nos momentos mais difíceis. Obrigada “Mô!”.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela oportunidade de participar do programa, pela ajuda proveniente do seminário discente, aos funcionários pela boa vontade e disponibilidade.

Aos professores da PGBCM, por compartilharem seus conhecimentos comigo durante das disciplinas que contribuíram fortemente para minha formação acadêmica.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) pela bolsa de estudos concedida durante esses quatro anos.

Aos integrantes da banca, pela gentileza de aceitarem o convite.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ e à FIOCRUZ pelo apoio científico e financeiro.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Dengue.....	1
1.1.1 Epidemiologia.....	1
1.1.2 Agente Etiológico.....	5
1.1.3 Manifestações Clínicas.....	7
1.1.4 Patogênese.....	11
1.2 Aumento da Permeabilidade Endotelial na Dengue.....	15
2. Justificativa.....	22
3. Objetivo Geral.....	23
3.1 Objetivos Específicos.....	23
4. Metodologia.....	24
4.1 Cultura de Células.....	24
4.2 Produção Viral.....	25
4.3 Titulação e Infecção Viral.....	25
4.4 Viabilidade Celular.....	26
4.5 Permeabilidade Endotelial.....	26
4.6 Quantificação de Citocinas.....	27
4.7 Amostras Clínicas.....	28
4.8 Lise celular e dosagem de proteínas.....	29
4.9 <i>Western Blotting</i>	30
4.10 Isolamento de plaquetas.....	30
4.11 Ativação de plaquetas com agonista ou DENV <i>in vitro</i>	31
4.12 Análise das micropartículas derivadas de plaquetas.....	31
4.13 Drogas.....	32
4.14 Análise estatística.....	32
5. Resultados.....	34
5.1 Células endoteliais são capazes de replicar o vírus dengue <i>in vitro</i>	34
5.2 O vírus DENV não altera diretamente a permeabilidade de células endoteliais <i>in vitro</i>	35
5.3 Células endoteliais infectadas com o vírus da dengue são capazes de secretar IL-6 e IL-8/CXCL-8.....	36
5.4 Plasmas de pacientes com dengue apresentado diferentes fases da doença induzem aumento de permeabilidade endotelial <i>in vitro</i>	37
5.5 Painel de citocinas/quimiocinas presentes em plasmas de pacientes infectados pelo DENV e controles.....	40

5.6	Envolvimento do MIF no aumento de permeabilidade endotelial induzido por plasmas de pacientes com dengue <i>in vitro</i> .	42
5.7	Envolvimento da IL-1 β no aumento da permeabilidade endotelial induzido por plasmas de pacientes com dengue <i>in vitro</i> .	43
5.8	Plasmas de pacientes dengue grave induzem uma maior fosforilação de ERK (P-ERK 42/44) e este evento parece ser dependente de MIF.	45
5.9	O vírus DENV 2 é capaz de aumentar a expressão do receptor de MIF (CD74) em células endoteliais infectadas.	46
5.10	Plaquetas estimuladas com o vírus DENV <i>in vitro</i> são capazes de secretar MIF.	47
5.11	Sobrenadante de plaquetas estimuladas com vírus DENV <i>in vitro</i> são capazes de aumentar a permeabilidade de células endoteliais <i>in vitro</i> de maneira dependente de MIF.	48
5.12	Micropartículas proveniente de plaquetas infectadas com vírus DENV <i>in vitro</i> são capazes de aumentar a permeabilidade de células endoteliais <i>in vitro</i> de maneira dependente de IL-1 β .	49
6.	Discussão	51
7.	Conclusões	60
8.	Bibliografia	62
9.	Anexos	81
9.1	Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. Hottz ED ¹ , Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza Blood. 2013 Nov 14;122(20):3405-14. doi: 10.1182/blood-2013-05-504449. Epub 2013 Sep	81
9.2	Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – IPEC/ FIOCRUZ.	93

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. 1: Distribuição global da dengue em 2014.	2
Figura 1. 2: Estrutura e organização do genoma do vírus dengue.	6
Figura 1. 3: História natural da dengue.	10
Figura 1. 4: Classificação atual dos casos de dengue sugerida pela OMS (adaptado de World Health Organization 2009).	11
Figura 5. 1: Replicação do vírus DENV 2 em células endoteliais HMEC-1	34
Figura 5. 2: Análise da permeabilidade e viabilidade de células endoteliais infectadas pelo vírus dengue in vitro.	35
Figura 5. 3: Quantificação de citocinas em sobrenadantes de células endoteliais infectadas pelo vírus DENV	36
Figura 5. 4: Análise cinética de permeabilidade e viabilidade de células endoteliais estimuladas por plasmas de pacientes infectados com dengue durante 2, 12 e 24 horas.	38
Figura 5. 5 Análise da permeabilidade endotelial induzida por plasmas de pacientes infectados pelo DENV em 2 horas.	39
Figura 5. 6 : Níveis Plasmáticos de citocinas/quimiocinas em pacientes infectados pelo vírus DENV.	41
Figura 5. 7 Efeito do antagonista do MIF (ISO-1) na permeabilidade endotelial. 42	
Figura 5. 8: Efeito do antagonista do receptor de IL-1(IL-1Ra) e do antagonista do MIF (ISO-1) na permeabilidade endotelial.	44
Figura 5. 9: Fosforilação de ERK em células endoteliais estimuladas com plasmas de pacientes infectados pelo DENV	45
Figura 5. 10 Análise da expressão de CD74 em células endoteliais infectadas pelo vírus DENV in vitro.	46
Figura 5. 11 Secreção de MIF por plaquetas estimuladas com o vírus DENV in vitro.	47
Figura 5. 12: Efeito do sobrenadante de plaquetas estimuladas sobre a permeabilidade endotelial in vitro.	48
Figura 5. 13 IL-1-β secretados por plaquetas induzem aumento de permeabilidade endotelial in vitro.	50
Figura 6. 1: Representação Esquemática de possíveis fatores envolvidos no aumento de permeabilidade na Dengue.	61
Tabela 1: Característica dos Pacientes com Dengue e Voluntários saudáveis.	28

Lista de Abreviaturas

ACD- Anticoagulante composto por ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose;

ADE – Amplificação dependente de anticorpos;

ALT – Alanina transaminase;

ANOVA – Análise de variância

ANVISA– Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST – Aspartato transaminase;

BHK – Células baby hamster kidney

B.O.D – Demanda bioquímica de oxigênio

BSA- Albumina de soro bovina

C – Proteína do capsídeo dos Flavivírus;

CCL - Quimiocina ligante do motivo CC;

CCR – Receptor de quimiocina do motivo CC;

CD – Cluster de diferenciação;

CLEC-5 – Receptor semelhante a lectina tipo C

CoA – Coenzima A

CO₂ – Dióxido de carbono;

CXCL – Quimiocina ligante do motivo CXC;

DC-SIGN – Não-integrina acoplada a ICAM-3 específica de célula dendrítica;

DENV – Vírus dengue;

DENV-2 AS – Genótipo Sudeste Asiático do DENV-2;

DENV-2 AM – Genótipo Americano do DENV-2;

DFND – Doença febril não dengue;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DTT – Ditioneitol

E – Proteína do envelope dos Flavivírus;

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético;

EGF– Fator de crescimento endotelial;

ERK – proteína de sinal extracelular regulado por cinases

P-ERK – proteína de sinal extracelular regulado por cinases fosforilada

ELISA – Ensaio imunoenzimático de captura

Fc γ R – Receptor para a fração Fc de imunoglobulina G;

FD – Febre do Dengue;

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto;

FHD – Febre Hemorrágica do Dengue;

FITC - Fluoresceína Isotiocinato

GRP– Proteína regulada por glicose

HBSS – Solução salina balanceada de Hanks

HCl– Ácido clorídrico

HLA – Antígeno leucocitário humano;

HMEC-1 – Células endoteliais de microvasculatura de derme humana

HRP– *horseradish* peroxidase

HSA – Albumina de soro humano;

HSP– Proteína de choque térmico

HUH-7– Células de linhagem de hepatocarcinoma humano 7

HUVEC– Células endoteliais da veia do cordão umbilical

Ig – Imunoglobulina;

IL- Interleucina

IMF – Intensidade média de fluorescência;

ICAM – Molécula de adesão intercellular;

IFN – Interferon;

IL-1Ra – Antagonista do receptor de IL-1;

IP-10 – Proteína 10 induzida por IFN;

IPEC– Instituto de Pesquisa Evandro Chagas

ISO-1– Inibidor de MIF

LPS – Lipopolissacarídeo;

M – Proteína da membrana dos Flavivírus;

MCP – Proteína quimioatraente de macrófago;

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade;

MIF – Fator inibidor da migração de macrófagos;

MIP – Proteína inflamatória de macrófagos;

MMP– Metaloproteinases

M.O.I – Multiplicidade de Infecção

MP – Micropartícula;

MS – Ministério da Saúde;

MTT– Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NaCl – Cloreto de sódio

NLR- Receptor do tipo NOD

NLRP3- NLR contendo domínio pirina 3

NS – Proteína não estrutural de Flavivírus;

OMS – Organização Mundial de Saúde;

OPAS – Organização Panamericana de Saúde;

ORF – Fase aberta de leitura

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico;

PBS – Tampão fosfato e salina;

PGE₁ – Prostaglandina E₁;

PE – Ficoeritrina

PF – Fator plaquetário;

PFU – Unidade formadora de placa;

PrM – Proteína pré-membrana dos Flavivírus;

PRP – Plasma rico em plaquetas;

PS – Penicilina e streptomina;

RANTES – Regulado por ativação, expresso e secretado por célula T normal;

RNA – Ácido Ribonucleico;

ROS – Espécies reativas de oxigênio;

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase acoplado a transcrição reversa;

SCD – Síndrome do choque por dengue;

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SE– Semana epidemiológica

SFB – Soro fetal bovino;

SHU– Síndrome hemolítica-urêmica

sIL2R – Receptor solúvel de IL-2;

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação;

SVS – Serviço de Vigilância em Saúde;

S1P – Esfingosina 1 fosfato.

TBS – Tampão Tris e salina;

TBS-T– Tampão Tris e salina com detergente tween

TF – Fator tissular;

TGF – Fator de crescimento e transformação;

TGO –Transaminase glutâmica oxalacética;

TGP –Transaminase Glutâmico Pirúvica;

TM – Trombomodulina

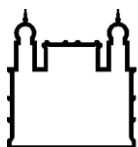
TMB –tetrametilbenzidina

TNF – Fator de necrose tumoral;

UV – Ultra-violeta;

VCAM – Molécula de adesão de célula vascular;

VEGF – Fator de crescimento de endotélio vascular;



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

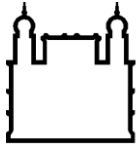
Investigação dos mecanismos associados à permeabilidade endotelial na Dengue.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Juliana Freitas Lopes

A Dengue é considerada, hoje, a principal arbovirose humana no mundo, infectando milhões de pessoas e causando milhares de mortes anualmente. A doença pode se manifestar por uma infecção assintomática ou apresentar quadros clínicos variados, que vão desde estados febris auto-limitados até quadros graves de hemorragia e choque, nos quais a plaquetopenia e aumento da permeabilidade vascular estão frequentemente associados. Nos casos graves da doença, os fatores que levam ao importante aumento da permeabilidade vascular ainda não foram totalmente esclarecidos e pouco se sabe sobre os mecanismos que possam identificar uma possível estratégia para a intervenção deste quadro. Portanto, este estudo tem como objetivo principal avaliar fatores celulares e moleculares associados à permeabilidade endotelial na dengue. Nós demonstramos que plasmas obtidos de pacientes com dengue induzem um aumento da permeabilidade endotelial *in vitro*, principalmente aqueles provenientes da fase de defervescência de pacientes graves. Além disso, identificamos as citocinas/quimiocinas presentes nestes plasmas e observamos uma participação importante do MIF e da IL-1 β na indução de permeabilidade endotelial. Em nosso modelo, as células endoteliais foram permissivas à infecção pelo vírus dengue, capazes de secretar IL-6 e IL-8, mas não foram observados efeitos diretos do vírus na permeabilidade de células endoteliais. Por fim, observamos que fatores produzidos por plaquetas foram capazes de induzir a permeabilidade endotelial *in vitro*, com o envolvimento das citocinas IL1- β e MIF neste processo. Logo, esses dados contribuem significativamente para a elucidação de fatores envolvidos no aumento de permeabilidade vascular observadas nas formas graves da infecção pelo vírus dengue.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Investigation of the mechanisms associated with endothelial permeability in Dengue.

Abstract

TESE DE DOUTORADO

Juliana Freitas Lopes

Dengue is considered today the main human arbovirus in the world, infecting millions of people and causing thousands of deaths annually. The disease can manifest as an asymptomatic infection or present different clinical conditions, ranging from self-limited febrile states to severe bleeding and shock, in which the thrombocytopenia and increased vascular permeability are often associated. In severe cases, the factors that lead to significant increase in vascular permeability have not yet been fully understood and little is known about the mechanisms that can identify a possible strategy for the intervention of this framework. Therefore, this study aims to evaluate the endothelial permeability in dengue. We have shown that plasmas obtained from dengue patients induces an increase in endothelial permeability *in vitro*, especially those from the defervescence phase of severe dengue patients. In addition, we identified cytokines/chemokines present in these plasmas and observed a significant role of MIF and IL-1 β in endothelial permeability. In our model, the endothelial cells were permissive to dengue infection, capable to secreting IL-6 and IL-8, but were not observed direct effects of the virus in the permeability of endothelial cells. Finally, we found that factors produced by platelets were able to induces endothelial permeability *in vitro*, involving IL-1- β and MIF in this process. Thus, these data greatly contribute to the elucidation of the factors involved in increased vascular permeability observed in the severe forms of dengue virus infection.

1. Introdução

1.1.Dengue

1.1.1 Epidemiologia

Nas últimas décadas, a população mundial está presenciando o ressurgimento de diversas arboviroses, sendo a dengue umas das mais importantes em termos de morbidade e mortalidade (Guzmán and Kourí 2002; Vasconcelos and Calisher 2016). A dengue, antes considerada uma doença esporádica, é hoje caracterizada como um grave problema de saúde pública com efeitos econômicos e sociais substanciais. Isto se deve principalmente ao aumento na extensão das áreas de risco para a transmissão da doença, com consequente aumento no número de casos, bem como dos casos graves da doença (Guzman and Harris 2015).

Segundo registros da Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência da dengue aumentou cerca de 30 vezes nos últimos 50 anos (World Health Organization 2009; Guzman and Istúriz 2010; Guzman and Harris 2015). Mais de 100 países, principalmente de regiões tropicais e subtropicais, são considerados endêmicos e aproximadamente 390 milhões de pessoas se encontram em risco de contrair a doença com uma estimativa de 96 milhões de infecções anualmente (Gubler 1998a; Guzman and Istúriz 2010; World Health Organization 2012; Bhatt et al. 2013; Guzman and Harris 2015) (Figura 1.1). Além da expansão das regiões afetadas e do número de casos, um aumento significativo na incidência de dengue grave é observado. Aproximadamente 500 mil pessoas, principalmente crianças, são hospitalizadas por ano com a forma grave da doença, com uma taxa de mortalidade de cerca de 2,5% (Halstead 2007; World Health Organization 2009; Guzman and Istúriz 2010).

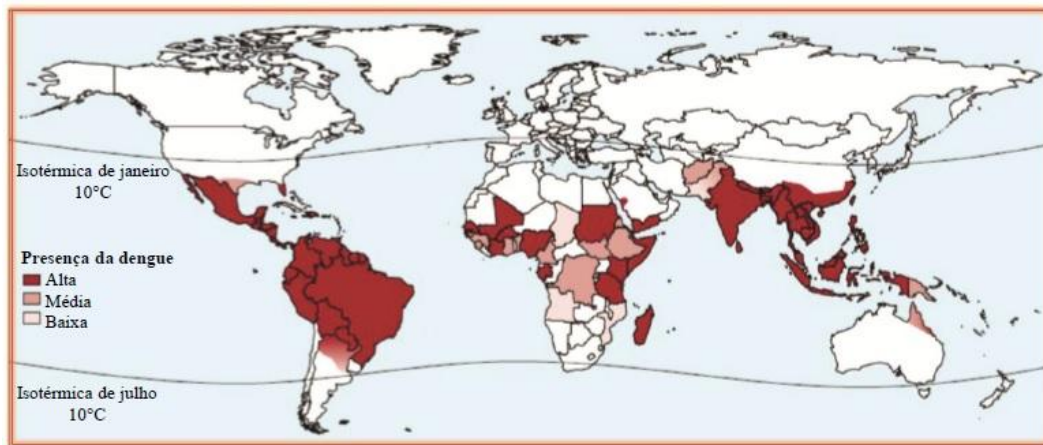


Figura 1. 1: Distribuição global da dengue em 2014. Áreas com alta, média e baixa probabilidade de ocorrência da dengue são mostradas no mapa (Adaptado de Guzman e Harris 2015).

A transmissão do vírus da dengue (DENV) é dependente do mosquito vetor *Aedes aegypti*, e em menor extensão do *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis* (Gubler 1998a). Para que haja transmissão, a fêmea do mosquito *Aedes* spp. deve picar um indivíduo infectado durante a fase virêmica da doença. Após o repasto sanguíneo, ocorre o período de incubação extrínseco, com duração de 8-12 dias, tornando o mosquito potencialmente transmissor do vírus (McBride and Bielefeldt-Ohmann 2000). Por consequência, ao picar um indivíduo susceptível ocorre a infecção do mesmo, promovendo o período de incubação intrínseco com duração média de 5-7 dias (McBride and Bielefeldt-Ohmann 2000). O ciclo se repete quando mosquitos não infectados se alimentam de um indivíduo nesta fase. A propagação do DENV está diretamente relacionada a distribuição geográfica dos vetores, sendo a densidade do mosquito um parâmetro importante no controle e prevenção da dengue (Bäck and Lundkvist 2013).

Do ponto de vista histórico, até a década de 1950, a transmissão urbana da dengue era remota, mas epidemias eram relatadas (Gubler 1998a). O ciclo de transmissão urbano se intensificou durante as alterações ecológicas decorrentes da Segunda Guerra Mundial, permitindo a dispersão do vetor e do vírus pelo sudoeste Asiático (Halstead 1988; Gubler 1998a; Ooi and Gubler 2009). Logo, diante do crescimento populacional e da urbanização desorganizada, associados à ausência de programas efetivos de controle do vetor, a transmissão endêmica/epidêmica na região foi estabelecida (Monath 1994; Gubler and Clark 1995; Gubler 2002; Mackenzie et al. 2004; Ooi and Gubler 2009). Desta maneira, com a circulação de mais de um sorotipo,

em conjunto ao intenso movimento de pessoas infectadas através de viagens aéreas internacionais, foi possível a distribuição do vetor e do DENV para as ilhas do Pacífico e logo para a América tropical (Halstead 1988; Gubler 1998b; Wilder-Smith and Gubler 2008; Ooi and Gubler 2009; Messina et al. 2014).

Nas Américas, durante as décadas de 50 e 60, a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) liderou programas para a erradicação do mosquito *A. aegypti*, ocasionando o controle da transmissão da febre amarela e conseqüentemente da dengue (Gubler and Clark 1995). No entanto, a interrupção do programa na década de 70 levou à reinfestação do continente e, posteriormente, à reintrodução do DENV (Gubler and Clark 1995; Halstead 2006). Bhatt e colaboradores (2013) estimaram que cerca de 13 milhões de infecções anuais foram atribuídas ao continente Americano, com quase a metade dos casos (5 milhões de infecções) ocorridos no Brasil (Bhatt et al. 2013).

No Brasil, a incidência de surtos de dengue cresce desde a década de 80. Em 1982, observou-se um primeiro surto em Roraima, em 1986 ocorreu a reintrodução do DENV1 no Rio de Janeiro, com mais de 60.000 casos reportados e em 1999, tivemos 204.000 casos em todo o país. A partir de 2000, o vetor já estava presente em todos os estados brasileiros e a transmissão do vírus se intensificou, levando à dengue a um dos principais problemas de saúde pública nacionais (Teixeira et al. 2013).

Segundo o mesmo estudo epidemiológico de Teixeira e colaboradores (2013), ocorreram no Brasil cerca de 8,4 milhões de casos de dengue entre 2000 e 2010, sendo os maiores números de casos notificados nos anos de 2002, 2008 e 2010. Nos dois primeiros anos mencionados, foram relatados cerca de 700 mil casos da doença, e mais de 1 milhão de casos em 2010. Com relação às manifestações clínicas graves da doença apresentadas nestes períodos, foram registrados cerca de 2.700 casos de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) com 150 óbitos em 2002, uma média de 2.898 casos de FHD com 485 óbitos em 2008, e cerca de 3.600 casos de FHD com 700 óbitos em 2010 (Teixeira et al. 2013; MS/SVS 2014).

Já em 2011, seguindo o panorama das grandes epidemias da década anterior, observaram-se altas prevalências e altas taxas de mortalidade. Segundo o Ministério da Saúde, foram notificados, em 2011, 689.277 casos de dengue e 2.936 casos de FHD. Neste mesmo ano 520 óbitos por dengue foram registrados (MS/SVS 2014). As epidemias dos anos de 2012 e 2013 foram associadas à reintrodução do DENV-4 e à

redução dos números de casos graves e de óbitos por dengue foram observados. O Ministério da Saúde notificou 1.006 casos de FHD em 2012 e 432 em 2013, com 317 e 67 óbitos, respectivamente. Por fim, em 2014 foram reportados 689 casos de dengue grave e 410 óbitos (MS/SVS 2014).

Logo, com a co-circulação dos quatro sorotipos no país e a imunização natural da população mediante infecções seguidas, uma tendência à infecção de pessoas mais jovens, que apresentam manifestações clínicas mais graves, passa a ser observada (Teixeira et al. 2013). Em 2016, até a semana epidemiológica (SE) 3 (03/01/2016 a 23/01/2016) foram registrados 73.872 casos de dengue no país, quase o dobro para o mesmo período de 2015 (40.916 casos) (MS/SVS 2015), com 137 casos com sinais de alarme e 9 casos graves (MS/SVS 2016). Em 2015, proporções dos sorotipos virais identificados foram: DENV 1 (94,1%), seguido de DENV 4 (4,8%), DENV 2 (0,7%) e DENV 3 (0,4%). Além disso, ainda não sabemos qual será o impacto do surgimento de novas arboviroses, como zika e chikungunya, sobre a transmissão e patogenicidade da dengue no Brasil (Azevedo et al. 2015; Furuya-Kanamori et al. 2016; Heukelbach et al. 2016).

Mediante ao panorama de expansão geográfica do vetor e do vírus, com um aumento na incidência dos casos de dengue, e conseqüentemente dos casos graves, estratégias para a prevenção e controle tornaram-se urgentemente necessárias (Achee et al. 2015; Liang et al. 2015). Terapias antivirais específicas, no entanto, não são conhecidas, e apenas tratamento de suporte é oferecido aos pacientes com a doença até o momento (Gubler 1998b; WHO 2009). Desta maneira, a principal forma de controlar a doença é com a eliminação e expansão do principal mosquito transmissor *A. aegypti*; porém, esta estratégia não tem conseguido conter o avanço da dengue na maioria dos países endêmicos (Gubler 1998a; Johnson and Roller 2015; Giraldo et al. 2016). As estratégias de combate vão desde o uso de pesticidas à conscientização da população com relação as formas de proliferação e transmissão do mosquito (Giraldo et al. 2016). Pesquisas recentes indicam que a eliminação genética do vetor, através da introdução de mutações letais nas populações de mosquito e controle da reprodução pela liberação de machos estéreis transgênicos, é uma estratégia promissora para conter a doença (Harris et al. 2011; Wise de Valdez et al. 2011). Além disso, alguns trabalhos relatam que a infecção do mosquito transmissor *A. aegypti* pela bactéria endossimbiótica *Wolbachia* é

capaz de limitar a infecção pelo vírus dengue, levando a uma diminuição da transmissão viral (Moreira et al. 2009; Walker et al. 2011).

Uma segunda estratégia contra a dengue seria o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Enquanto vacinas contra outros Flavivírus, como do vírus da febre amarela já foram desenvolvidas, as vacinas contra o DENV ainda estão sobre investigação intensa (Gould and Solomon 2008). Contudo, os principais desafios no desenvolvimento de vacinas incluem a presença de quatro sorotipos, o risco do desenvolvimento de dengue grave em indivíduos expostos a uma infecção secundária por sorotipo diferente, além do pouco entendimento sobre a patogênese da doença e a carência de modelos animais específicos adequados (Ramakrishnan et al. 2015). Mas nos últimos anos ocorreu um grande progresso e diversas vacinas de vírus vivo (atenuado, quimérico e vetor viral) e não-vivo (inativado, subunidade recombinante e DNA) foram desenvolvidas e algumas já completaram os estudos de fase clínica I e II (Satterfield et al. 2016). Uma das mais promissoras é a vacina Dengvaxia® CYD-TDV (*recombinant, live, attenuated, tetravalent dengue vaccine*) produzida pela empresa Sanofi Pasteur. A vacina é composta por quatro vacinas vivas atenuadas recombinantes, expressando as regiões prM-E dos quatro sorotipos do DENV (1-4) sendo considerada segura, imunogênica e eficaz (revisto por Ramakrishnan et al. 2015). A eficácia da vacina em prevenir casos de dengue grave e febre hemorrágica do dengue é de cerca de 90% em crianças, contudo estudos apontam aspectos controversos da vacina (Halstead and Russell 2016). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o registro da vacina, mas sem liberação para administração na população.

1.1.2 Agente Etiológico

O vírus DENV está classificado na família *Flaviviridae*, gênero *Flavivírus*, onde encontra-se até o momento quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a 4) (Guzmán and Kourí 2002; Chambers and Monath 2003). Todos os sorotipos parecem ter emergido de cepas silvestres de florestas de regiões do sudoeste asiático e são potencialmente infecciosos (revisto por Bäck and Lundkvist 2013). A infecção por qualquer dos quatro sorotipos pode ser assintomática ou causar doença de intensidade variada, desde febril auto-limitada (dengue branda ou clássica) até quadros graves com alterações de permeabilidade vascular, sangramentos e choque, podendo progredir para o óbito (Vaughn et al. 2000; World Health Organization 2009; Teixeira et al. 2013).

A partícula viral infecciosa possui aproximadamente 50 nm de diâmetro. A mesma é composta pelo nucleocapsídeo, que consiste de um conjunto com múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C) e pelo ácido ribonucleico (RNA) genômico. O RNA se apresenta como uma fita simples de polaridade positiva, e portanto infeccioso, com aproximadamente 11 kb e uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica para uma única poliproteína. A mesma será posteriormente clivada por uma combinação de proteases viral e do hospedeiro em proteínas estruturais (C-prM-E) constituintes da partícula viral e não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3- NS4A-NS4B-NS5) envolvidas na replicação e montagem do vírus bem como na modulação da resposta do hospedeiro (Chambers et al. 1990; Chambers and Monath 2003). Além disso, o vírus possui um envelope lipídico contendo em sua superfície as glicoproteínas E (envelope), essencial para a entrada do vírus na células hospedeira e M (membrana) (Figura 1.2) (Rice 2008; Murrell et al. 2011)

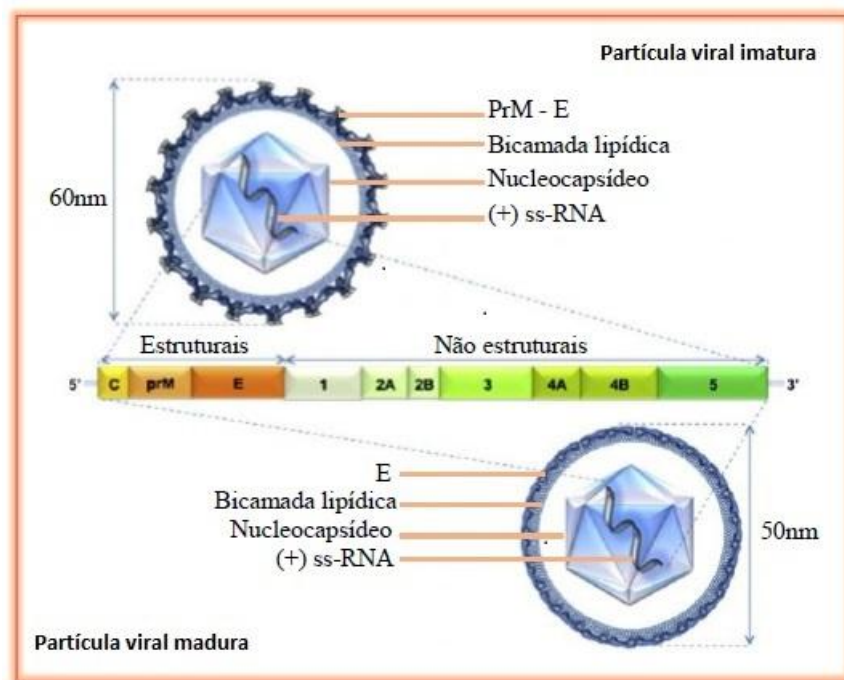


Figura 1. 2: Estrutura e organização do genoma do vírus dengue. Representação esquemática da partícula viral imatura (acima) e da partícula viral madura (abaixo). A única fase aberta de leitura (ORF), flanqueada pelas regiões não codificantes 5' e 3', codifica para as proteínas estruturais (C, prM e E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Adaptado de Herrero et al. 2013).

O vírus entra na célula hospedeira via endocitose mediada por receptor. Neste contexto, a proteína E parece ser a responsável pela ancoragem viral e a entrada do vírus (Anderson 2003). De maneira dependente do pH ácido do endossomo, ocorre a fusão do

envelope viral com a membrana endossomal, liberando o nucleocapsídeo para o citoplasma. O RNA de fita positiva é então transportado para o retículo endoplasmático onde passa a produzir as proteínas virais (estruturais e não estruturais) requeridas no processo. Uma fita negativa de RNA é sintetizada e serve de molde para a produção de novas moléculas de RNA de fita positiva. Este processo coordenado produz partículas virais que, após a maturação no aparelho de Golgi, são liberadas pela via secretora da célula do hospedeiro (Chambers et al. 1990; Chambers and Monath 2003; Bartenschlager and Miller 2008; Paranjape and Harris 2010).

A infecção pelo DENV se inicia com o repasto sanguíneo pelo vetor, e as primeiras células infectadas e alvos da replicação são aquelas localizadas no epitélio, como as células de Langerhans e células dendríticas dérmicas (Palucka 2000; Wu et al. 2000). *In vitro*, o DENV pode infectar uma variedade de células humanas, como monócitos/macrófagos, hepatócitos, linfócitos, células dendríticas, endoteliais, neuronais dentre outras diversas linhagens celulares. Da mesma forma, o vírus também é capaz de infectar diversas células *in vivo*, incluindo modelos de primatas e camundongos (Halstead 1979; Henchal and Putnak 1990; Clyde et al. 2006; Assunção-Miranda et al. 2010; Chan et al. 2015). Embora um receptor específico para o DENV ainda não tenha sido identificado, alguns já foram descritos (revisto por Hidari and Suzuki 2011). Evidências sugerem que o receptor DC-SIGN esteja envolvido na infecção de células dendríticas pelo DENV (Navarro-Sanchez et al. 2003; Tassaneeritthep et al. 2003). Além deste, foi proposto a interação com outras moléculas, incluindo o receptor para manose (MR) (Miller et al. 2008), a proteína regulada por glicose (GRP) 78 (Jindadamrongwech et al. 2004), o receptor para lipopolissacarídeo (LPS) CD14 (Chen et al. 1999) proteínas de choque térmico (HSP) 70 e 90 (Jorge Reyes-del Valle, Salvador Chavez-Salinas, Fernando Medina 2005) assim como receptores de fosfatidilserina TIM e TAM (Meertens et al. 2012; Cruz-Oliveira et al. 2015).

1.1.3 Manifestações Clínicas

Com relação aos aspectos clínicos, a infecção pelo vírus dengue em humanos pode ser assintomática ou manifestar quadros clínicos variados, que vão desde estados febris autolimitados até quadros graves de choque e hemorragia (World Health

Organization 2009). Os quatro sorotipos induzem aspectos clínicos semelhantes, contudo, podem variar quanto a gravidade da doença. Uma vez o indivíduo infectado, o vírus passa por um período de incubação, que varia de 4 a 7 dias, e subitamente os sintomas começam a aparecer. A partir de então, a doença adquire uma dinâmica onde observam-se três fases bem características: a fase febril, a fase crítica em torno do tempo de defervescência e a fase de convalescência ou recuperação espontânea (Gubler 1998a; World Health Organization 2009, 2012; Johnson and Roller 2015).

A fase febril inicial tem a duração de 3 a 7 dias, caracterizada pela febre alta ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$), acompanhada por dores de cabeça, vômitos, mialgia e dores nas articulações, por vezes, com uma erupção macular transiente. Manifestações hemorrágicas brandas, tais como petéquias são observadas nesta fase. Exames laboratoriais geralmente apresentam moderada plaquetopenia e elevação das aminotransferases hepáticas (Johnson and Roller 2015). Com relação aos aspectos sorológicos, é nesta fase onde encontramos os maiores picos de viremia (Figura 1.3).

A defervescência marca o início da fase crítica, caracterizada por intensa hemoconcentração, hipotensão, leucopenia, e plaquetopenia. Os níveis mais elevados do hematócrito e as contagens mais baixas de plaquetas (plaquetopenia grave $< 50.000/\text{mm}^3$) são geralmente observados nesta fase. Inicialmente, mecanismos compensatórios fisiológicos são regulados positivamente em uma tentativa de manter a homeostase vascular, com sucesso, o paciente evolui com melhora clínica sem complicações. Contudo, em alguns casos, podem ocorrer importantes alterações de permeabilidade que levam a um grave extravasamento de plasma com efusão pleural, ascite, comprometimento dos órgãos decorrente da hipoperfusão e choque, caracterizando assim a evolução para dengue grave o que pode levar a morte (Figura 1.3) (World Health Organization 2009, 2012; Johnson and Roller 2015). Apesar do vasto espectro de apresentações clínicas, não é possível prever a evolução de um paciente ainda na fase febril. Logo, uma triagem adequada e uma intervenção terapêutica com hidratação venosa pode tanto prevenir a evolução para condições clínicas mais graves, quanto reduzir significativamente a mortalidade nos casos de dengue grave.

A fase de recuperação (convalescência) se inicia com melhora do estado geral do paciente, estabilização ou redução do hematócrito, aumento progressivo da contagem de

plaquetas e reabsorção do líquido extravasado podendo durar algumas semanas. É nesta fase que conseguimos detectar anticorpos IgM e IgG anti-DENV (Figura 1.3) (World Health Organization 2009; Johnson and Roller 2015).

Com a expansão da dengue, novas populações geneticamente distintas apresentaram diferenças na apresentação clínica da doença. Desta maneira, a classificação proposta pela OMS em 1997, que estabelecia diretrizes para o diagnóstico dos pacientes com dengue, passou a falhar em classificar clinicamente pacientes graves que não preenchiam completamente os critérios anteriormente estabelecidos (Balmaseda et al. 2005; Bandyopadhyay et al. 2006; Deen et al. 2006; Rigau-Pérez 2006; World Health Organization 2009). Nesta classificação, inicialmente, os pacientes eram classificados como febre do dengue (FD) ou febre hemorrágica do dengue (FHD), sendo esta última caracterizada por manifestações hemorrágicas com hepatomegalia, plaquetopenia ($<100.000/mm^3$), hemoconcentração e hipoproteinemia. Pacientes com FHD eram ainda sub-classificados em quatro graus de gravidade (FHD I – IV) sendo os graus III e IV definidos como síndrome do choque por dengue (SCD) (World Health Organization 1997). Com isso, atualmente, os casos de dengue são classificados em dengue branda, com ou sem sinais de alarme e dengue grave (Figura 1.4) (World Health Organization 2009). Pacientes que se recuperam sem maiores complicações são classificados como dengue branda. Os sinais de alarme incluem dor abdominal, vômitos persistentes, sinais clínicos de extravasamento de fluido (hipotensão postural, oligúria), sangramento de mucosa, letargia, hepatomegalia (com aumento do fígado superior a 2 cm) ou aumento no hematócrito concorrente com declínio rápido da contagem de plaquetas. Já a dengue grave observam-se intenso extravasamento de plasma podendo levar ao choque, sangramento e grave comprometimento dos órgãos. Vale ressaltar que mesmo os pacientes que não apresentam sinais de alarme podem evoluir para dengue grave (World Health Organization 2009). Esta nova proposta de classificação se apresentou mais sensível e específica em detectar os casos graves de dengue em relação a classificação anterior (Narvaez et al. 2011).

Para a realização do presente estudo nós utilizamos a classificação revisada (atual) de casos (World Health Organization 2009), no entanto, existem muitos estudos atuais ainda classificam os pacientes em FD/FHD/SCD e os resultados destas publicações serão citados nesta tese de acordo com os critérios utilizados pelos respectivos autores.

No Brasil, a incidência de dengue branda e grave costumava ser maior em adultos, contrastando os casos do sudoeste asiático, onde a dengue grave ocorre predominantemente em crianças (Halstead 2006; Wakimoto et al. 2015). Entretanto, a partir de 2007, o Brasil apresentou um aumento significativo dos casos de dengue em indivíduos abaixo dos 15 anos de idade como também o aumento dos casos de dengue grave (Teixeira et al. 2008). Essa mudança de perfil epidemiológico associado as manifestações clínicas da doença cruza com aspectos da patogênese da infecção pelo DENV onde estudos estão continuamente sendo realizados para a melhor compreensão destas mudanças. Sendo assim, estudos que visam entender os mecanismos patogênicos envolvidos nos quadros de dengue, em especial nos casos de dengue grave, são de extrema importância para o estabelecimento de novos alvos terapêuticos e melhor manejo clínico da doença.

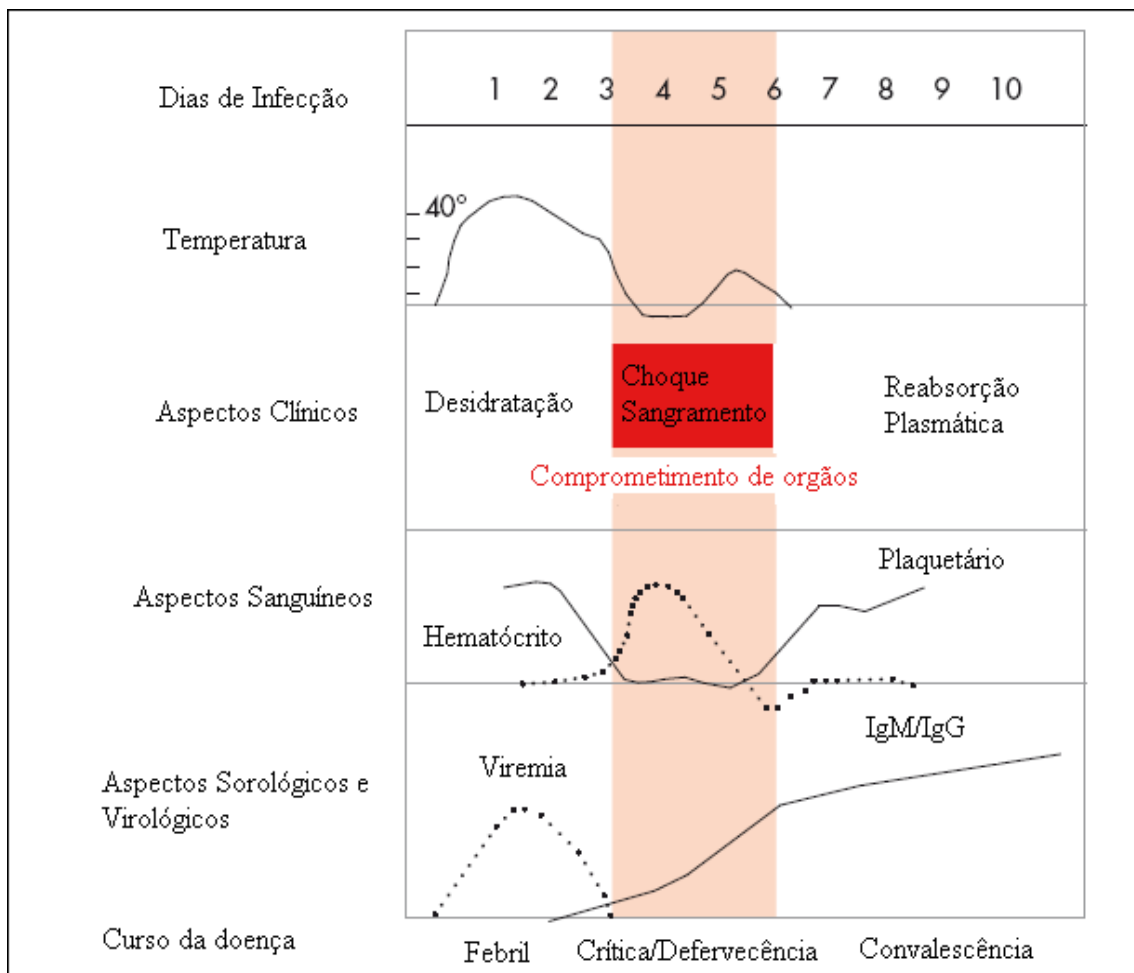


Figura 1. 3: História natural da dengue. Curso das alterações clínicas e laboratoriais após início dos sintomas (World Health Organization 2009).

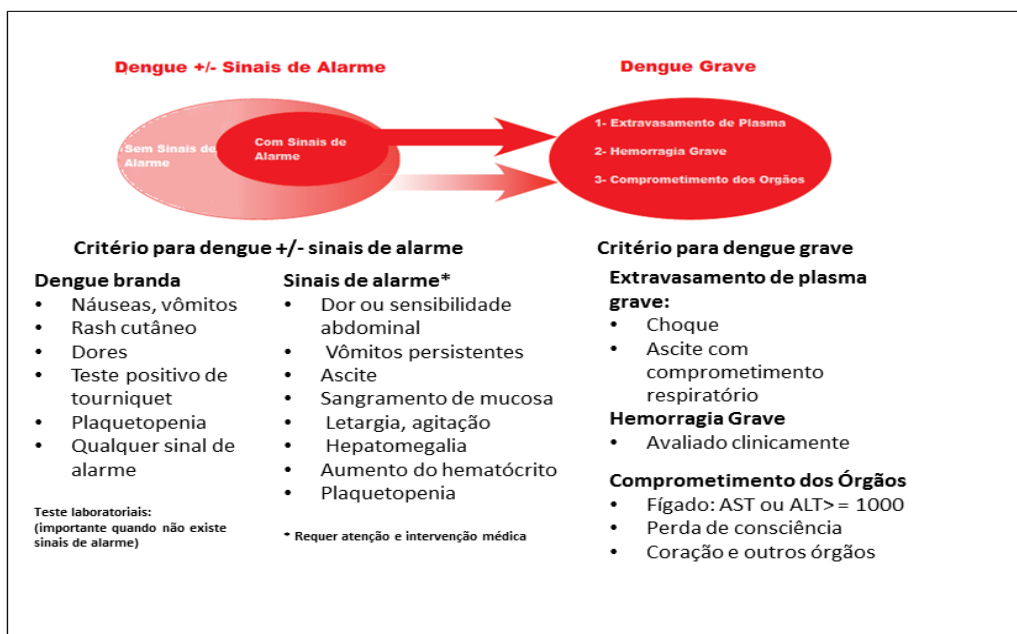


Figura 1. 4: Classificação atual dos casos de dengue sugerida pela OMS (adaptado de World Health Organization 2009).

1.1.4 Patogênese

Os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da infecção pelo vírus dengue são complexos e multifatoriais. Ao longo dos anos, inúmeros estudos baseados em diversas observações experimentais *in vitro*, estudos clínicos, dados epidemiológicos e desenvolvimento de modelos experimentais tentam estabelecer hipóteses que possam elucidar os aspectos fisiopatológicos na dengue (Noisakran and Perng 2008). Entretanto, ainda não sabemos que fatores levam alguns pacientes à desenvolverem a forma branda da doença enquanto outros evoluem para formas mais graves. Ainda sim, existe um consenso de que nenhuma hipótese sozinha explica precisamente os casos de dengue grave, mas que existe um balanço entre as interações de fatores virais e do hospedeiro que levam a uma ativação exacerbada do sistema

imunológico, com elevada secreção de mediadores inflamatórios, crucial para o desenvolvimento da vasculopatia característica dos casos graves (Pang et al. 2007; Bozza et al. 2008; Halstead 2015). Logo, os mecanismos moleculares envolvidos na intensificação da resposta inflamatória sistêmica na dengue e seus principais efetores ainda não foram completamente esclarecidos.

A resposta imune do hospedeiro frente a infecção pelo vírus dengue parece apresentar um perfil específico de ativação, que muitas vezes correlaciona-se com a evolução à dengue grave. Sabemos que a infecção primária pelo DENV confere proteção por toda a vida contra a reinfecção pelo sorotipo homólogo e proteção parcial de curto prazo para outros sorotipos (Whitehorn and Simmons 2011). Entretanto, observações clínico-epidemiológicas evidenciaram que infecções secundárias estavam associadas à evolução para a FHD, muito comum em áreas endêmicas (Halstead et al. 1969; Halstead 1988; Kouri et al. 1989). Este fato é reforçado pela observação de que infecções primárias entre crianças menores de um ano nascidas de mães imunes para o DENV-1, ou seja, que receberam anticorpos maternos contra o DENV, resultaram em maior gravidade da doença nestas populações (Kliks et al. 1988).

Destas observações formulou-se a hipótese da amplificação da infecção dependente de anticorpos (ADE – *antibody dependent enhancement*) como uma das hipóteses para o desenvolvimento de casos graves durante as infecções secundárias (Halstead and O'Rourke 1977). De acordo com esta hipótese, anticorpos específicos contra um sorotipo do DENV, provenientes da infecção primária, seriam capazes de reconhecer um outro sorotipo heterólogo, contudo sem a capacidade de neutralizá-lo. Isso levaria a uma opsonização do vírus infectante por anticorpos IgG não neutralizantes, formando um complexo imune (vírus-anticorpo anti-DENV) os quais se ligam a receptores $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$), presentes na superfície de células alvo, tais como monócitos e macrófagos. Por sua vez, isso facilitaria a entrada do DENV nestas células, culminando no aumento da replicação viral e, conseqüentemente, maior título viral, produção de citocinas e ativação de células do sistema imunológico. Acredita-se que este processo contribuiria para o desenvolvimento das formas graves da doença (Kliks et al. 1988; Vaughn et al. 2000; Guzman and Vazquez 2010).

Estudos *in vitro* confirmam que concentrações sub-neutralizantes de soros imunes de pacientes com dengue ou de anticorpos contra a proteína E promovem o

aumento da infecção de monócitos pelo DENV (Goncalvez et al. 2007; Dejnirattisai et al. 2013; Moi et al. 2013). Outros estudos mostram que a infecção de monócitos, macrófagos ou de células dendríticas via ADE promove não só à amplificação da replicação viral, mas também aumenta a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (Chareonsirisuthigul et al. 2007; Boonnak et al. 2008). Estes estudos sugerem que a relação entre ADE e a susceptibilidade das infecções secundárias a quadros clínicos mais graves não se explica simplesmente pelo aumento dos títulos de viremia, mas principalmente pelas alterações da resposta inflamatória do hospedeiro (Halstead 2014).

Além da produção de anticorpos sub-neutralizantes, alguns trabalhos sugerem que a resposta imune celular, principalmente as mediadas por células T, estão associadas ao desenvolvimento dos casos graves de dengue. Postula-se que durante uma infecção secundária ocorra um aumento da apresentação de antígenos, bem como da ativação de células T CD4+ e CD8+ de memória da primeira infecção (sorotipo diferente). Esta ativação de baixa especificidade acaba por ser mais intensa que a expansão das células T *naive* (não ativadas previamente) para o sorotipo infectante, promovendo uma alteração na resposta imunopatológica (Mongkolsapaya et al. 2003; Rothman 2011; Mathew et al. 2014). Neste contexto, há também um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interferon (IFN) γ e TNF- α , que podem agir diretamente sobre as células do endotélio vascular, resultando em aumento da permeabilidade e extravasamento do plasma (Mangada et al. 2002). Essa reação foi denominada “pecado antigênico original”.

Apesar dos dados epidemiológicos evidenciarem que a infecção secundária é um fator de risco para o desenvolvimento das formas graves da dengue, casos de FHD/SCD e até mesmo casos fatais têm sido descritos também em infecções primárias (Barnes e Rosen 1974). Estudos provenientes de regiões não endêmicas para o DENV (Chao et al. 2004) e casos de viajantes mostram que a frequência de FHD durante infecções primárias é similar ao observado em infecções secundárias (Meltzer e Schwartz 2009). No Rio de Janeiro, a introdução do DENV-3 em 2002, promoveu uma das piores epidemias da história do estado, onde 54% dos casos fatais foram causados por infecções primárias (Nogueira et al. 2005). Desse modo, somente hipóteses da ADE e do pecado original antigênico não são capazes de explicar todos os casos graves na dengue.

Estudos tem demonstrado uma liberação exacerbada de citocinas e quimiocinas em pacientes infectados pelo DENV (Pang et al. 2007; Pawitan 2011). Este fenômeno é conhecido como tempestade de citocinas (*cytokine storm*) e na infecção pelo DENV parece ser um dos principais eventos responsáveis pelo desenvolvimento observado na dengue grave. Sabemos que a ativação massiva de linfócitos B e T de memória, assim como de monócitos, macrófagos e células dendríticas, resulta na secreção de mediadores inflamatórios que se encontram elevados em pacientes com dengue. Muitos destes mediadores possuem seus níveis diretamente relacionados com a gravidade dos casos de dengue podendo servir inclusive como marcadores de gravidade. Trabalhos realizados com crianças e adultos infectados com diferentes sorotipos do DENV demonstraram um aumento significativo de citocinas e quimiocinas tais como Interferon do tipo gama (IFN- γ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucinas 4, 6, 7, 8, 10, 13, 15, 17 e 18 (IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), proteína quimiotática de monócitos do tipo 1 (MCP-1/CCL2), fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), proteína inflamatória de macrófagos (MIP1 β /CCL4), RANTES/CCL5, e proteína 10 induzida por interferon (CXCL10/IP-10) no plasma de pacientes com dengue grave. Dentre estes, IL-6, IL-10, IFN- γ , MIF, MCP-1/CCL2 parecem ser fortes candidatos a potenciais marcadores de dengue grave (Chen et al. 2006; Lee et al. 2006; Bozza et al. 2008; Levy et al. 2010; Srikiatkachorn and Green 2010; Rathakrishnan et al. 2012; Page and Liles 2013; Arias et al. 2014; John et al. 2015).

Dentre os mediadores citados, evidências sugerem que o MIF tem um papel importante na vasculopatia associada à dengue (Chuang et al. 2015). Dados do nosso grupo, demonstraram um importante papel do MIF na patogenia da dengue (Assunção-Miranda et al. 2010), assim como níveis elevados da mesma em pacientes que apresentaram FHD (Bozza et al. 2008). Nós observamos por infecção experimental primária, que camundongos deficientes para o MIF infectados pelo DENV, apresentaram redução significativa na letalidade, com manifestações clínicas de menor gravidade, menores títulos de viremia e diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, quando comparados aos animais selvagens (Assunção-Miranda et al. 2010). Logo, neste estudo pretendemos elucidar alguns aspectos da participação desta citocina na permeabilidade endotelial na dengue.

A ativação exacerbada do sistema complemento também parece estar envolvido na gravidade das infecções pelo DENV (Nishioka 1974). Neste contexto, a proteína NS-1 viral é considerada uma das principais indutoras de ativação do complemento. Avirutnan e colaboradores (2006) demonstram que a proteína NS-1 viral solúvel (sNS-1) é capaz de induzir de maneira sistêmica a ativação de anafilatoxinas do sistema complemento, assim como o complexo SC5b-9, o que poderia contribuir para o extravasamento vascular observado na dengue (Avirutnan et al. 2006). Além disso, já foram observados níveis elevados de C3a, C4a, C5a e fator D em pacientes com FHD quando comparados aos níveis dos pacientes com FD, evidenciando o papel destas moléculas na dengue grave (Nascimento et al. 2009). Outros fatores associados ao hospedeiro também são relacionados ao desenvolvimento de casos graves da doença. Estudos sugerem que polimorfismos nos genes ligados ao sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) e não HLA podem estar associados com a susceptibilidade à FHD (Chaturvedi et al. 2006).

Além dos fatores relacionados ao hospedeiro, fatores virais também têm sido associados à gravidade na dengue. Nesse contexto, estudos identificaram que o genótipo do DENV-2 proveniente do sudeste asiático está associado a epidemias graves, como a de Cuba em 1981 e a do Brasil em 2008 (Rico-Hesse et al. 1997; Teixeira et al. 2009), enquanto o genótipo americano do DENV-2 é caracterizado como o agente de epidemias que ocorrem sem registro de casos graves, como no Peru em 1995 (Leitmeyer et al. 1999; Cologna et al. 2005; Rico-Hesse 2007). Existem evidências de que as variabilidades genéticas entre as cepas virais também podem estar relacionadas a diferenças na aptidão viral (adaptabilidade ou *fitness*) e virulência (Cologna et al. 2004; Vu et al. 2010). A divergência na virulência entre estes genótipos foi atribuída a diferenças nas sequências da glicoproteína E e das regiões não codificantes 5' e 3' do genoma viral (Leitmeyer et al. 1999; Pryor et al. 2001). Além disso, comparações entre genótipos virais e dados epidemiológicos permitiram a associação das elevadas taxas de transmissão e da incidência de FHD com grupos virais específicos (Rico-Hesse et al. 1997).

1.2 Aumento da Permeabilidade Endotelial na Dengue

No contexto dos diferentes fatores envolvidos na patogênese da dengue, observamos que manifestações hemorrágicas com aumento de permeabilidade endotelial e consequente extravasamento de plasma são características importantes da dengue grave (Srikiatkachorn 2009; Dalrymple and Mackow 2012a; Spiropoulou and Srikiatkachorn 2013; Srikiatkachorn and Spiropoulou 2014). Sabemos que a complexa interação entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro podem levar a uma ativação das células endoteliais que perdem sua condição de barreira, permitindo um intenso extravasamento de plasma sanguíneo. Logo, com o comprometimento das funções vasculares, a compreensão dos fatores e mecanismos específicos pelos quais as disfunções das células endoteliais ocorrem é de extrema relevância na dengue.

A barreira endotelial assegura a manutenção da homeostase vascular e tecidual modulando diversos processos fisiológicos (Azzi et al. 2013). Células endoteliais, pericitos, células do músculo liso e a membrana basal coletivamente formam esta barreira (Gavard 2009; Azzi et al. 2013). Neste contexto, as células endoteliais ganham importância pelo seu perfil ativo multifuncional. As mesmas são responsáveis por formar o revestimento interno do vaso sanguíneo, regulando o fino ajuste da troca seletiva de moléculas entre o plasma sanguíneo e os tecidos irrigados (Sumpio et al. 2002). São as principais células envolvidas na angiogênese, vasculogênese e coagulação podendo responder aos estímulos celulares e moleculares presentes na circulação, assim como na manutenção do fluxo sanguíneo e tônus vascular (Sumpio et al. 2002). Além disso, células endoteliais podem ainda produzir componentes da matriz extracelular e são essenciais na orquestração das repostas imune-inflamatórias. Na condição de barreira, as células endoteliais não ativadas são semipermeáveis e capazes de controlar dinamicamente a passagem de moléculas de tamanhos variados, incluindo de caráter celular (Sukriti et al. 2015).

Quando ativadas, as células endoteliais podem adquirir um fenótipo hiperpermeável, pro-trombótico e pró-inflamatório e quando localizadas no sítio da infecção ou lesão tecidual são essenciais no reparo e remodelagem vascular, regulação da migração de leucócitos e consequentemente erradicação do patógeno/toxinas. Entretanto, a ativação endotelial pode ser prejudicial se for exacerbada, persistente e difusa. Neste sentido, várias doenças infecciosas incluindo sepse, síndrome hemolítico-urêmica (SHU), malária grave e dengue grave são caracterizadas pela excessiva permeabilidade, trombose vascular e inflamação que resultam em uma disfunção

endotelial (Page and Liles 2013). Em cada síndrome, o grau de ativação endotelial e subsequente disfunção contribui para a progressão e gravidade da doença.

Apesar das células endoteliais não serem os principais sítios de replicação do vírus da dengue, a ação direta do vírus em tais células constitui um aspecto importante no entendimento da patologia vascular que se apresenta na dengue. Antígenos virais, já foram encontrados em células endoteliais presentes no fígado, baço, e pulmões em amostras clínicas de tecidos humanos infectados provenientes de autópsias. Contudo, nos mesmos espécimes não foi possível identificar a presença de RNA viral o que caracterizaria a replicação em tais células *in vivo* (Jessie et al. 2004).

Evidências sugerem que as células endoteliais são ativadas durante a infecção pelo DENV (Srikiatkachorn and Kelley 2014). Este fato é corroborado pelos trabalhos que avaliam a presença de moléculas que podem levar a uma ativação/disfunção endotelial presentes nos plasmas de pacientes com dengue, especialmente dos que diferem entre dengue branda e dengue grave (Cardier et al. 2006). Esta avaliação é de supra importância para identificar possíveis biomarcadores que possam ajudar a identificar a evolução dos casos graves da doença.

Um dos principais mediadores de ativação/disfunção endotelial em doenças infecciosas, inclusive na dengue, são as proteínas angiogênicas: VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e seus receptores solúveis VEGF receptor-1 (VEGFR1) e VEGF receptor-2 (VEGFR2) e as angiopoetinas 1 e 2 (Srikiatkachorn et al. 2007; Michels et al. 2012). Ambas, dentre diversas funções são importantes indutores de permeabilidade (Bates et al. 2002). Thakur e colaboradores observaram elevados níveis de VEGF em plasmas de pacientes com FHD, em relação a forma branda da doença (Tseng et al. 2005; Sathupan et al. 2007; del Moral-Hernández et al. 2014; Thakur et al. 2016) e esses níveis parecem estar associados com a supressão dos níveis solúveis de VEGFR2 (Srikiatkachorn et al. 2007; Seet et al. 2009). A angiopoentina 2 antagoniza os efeitos da angiopoentina 1 desestabilizando o endotélio pelo desarranjo das moléculas de adesão célula-célula (Fiedler et al. 2006). Um contrabalanço das angiopoetinas 1 e 2 também foi observado em pacientes com as formas graves da dengue (Michels et al. 2012; van de Weg et al. 2014).

A expressão diferencial de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais durante a ativação endotelial inflamatória na dengue também constitui um aspecto

importante, podendo se relacionar com o aumento de permeabilidade vascular (Srikiatkachorn and Green 2010). Uma vez que ocorra esta ativação, a mesma pode levar diretamente ao dano do endotélio, liberando as moléculas de adesão no plasma sanguíneo. Assim, a identificação destas moléculas nos plasmas podem se relacionar com o aumento de permeabilidade observado na dengue grave. Neste contexto, estudos demonstram que formas solúveis de moléculas de adesão vascular (sVCAM), molécula de adesão intercelular (sICAM) e E-selectina (sE-selec) encontram-se elevados em pacientes FHD (Murgue et al. 2001; Koraka et al. 2004; Khongphatthanayothin et al. 2006; Martina et al. 2009; Liao et al. 2015). Desta forma, os níveis aumentados destas moléculas solúveis evidenciam uma disfunção endotelial na dengue que pode estar associado com o perfil de vasculopatia observado nos casos graves (Srikiatkachorn and Kelley 2014).

Além disso, um aspecto importante da manutenção da integridade do endotélio é a presença das junções aderentes e junções de oclusão (*tight junction*) (Komarova and Malik 2010; Park-Windhol and D'Amore 2016). As mesmas são as principais responsáveis pela ligação interendotelial, e a sua disfunção está diretamente associado ao aumento de permeabilidade vascular (Stevens et al. 2000; Vandenbroucke et al. 2008; Komarova and Malik 2010; Park-Windhol and D'Amore 2016). Neste contexto, a regulação da principal junção aderente do endotélio (VE-caderina) parece ser crucial no aumento de permeabilidade (Dejana and Vestweber 2013). Já foi observado que a deleção do gene para VE-caderina em camundongos resulta em uma letalidade ainda embrionária devido a não funcionalidade do sistema vascular provocado pelo fenótipo de hiperpermeabilidade (Corada et al. 1999). Na dengue, Appanna e colaboradores (2012) demonstraram que células endoteliais incubadas com plasmas de pacientes com dengue grave da fase de defervescência apresentavam significativa diminuição da expressão de VE-caderina e de zônulas de oclusão do tipo 1 (ZO-1) (Appanna et al. 2012). Estudos *in vitro* demonstram uma diminuição da expressão de VE-caderina em células endoteliais infectadas pelo DENV e incubadas com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (Dewi et al. 2008). Esses dados fortalecem a importante participação das proteínas de junção endotelial na permeabilidade na dengue.

Como mencionado no tópico 1.1.4, sobre a patogênese na dengue, diversos mediadores inflamatórios apresentam níveis elevados em pacientes FHD com relação aos pacientes FD (Srikiatkachorn and Green 2010; Kelley et al. 2012). Desta maneira,

acredita-se que alguns desses possam estar relacionados diretamente e/ou indiretamente com a ativação do endotélio, levando a uma disfunção e consequentemente aumento de permeabilidade. Células endoteliais podem ter sua permeabilidade alterada frente a ação de citocinas/quimiocinas tais como TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-8/CXCL-8, IL-10, IL-1- β , MCP-1/CCL-2, RANTES/CCL-5 e MIF (Reinhart et al. 2002; Srikiatkachorn and Green 2010; Page and Liles 2013; John et al. 2015)

Dentre os mediadores estudados, o TNF- α se apresenta como um importante indutor de permeabilidade e possui ação pró-coagulante. Com relação aos níveis desta molécula nos plasmas de pacientes com dengue grave, os dados parecem contraditórios. Alguns relatam aumento em pacientes FHD (Hober et al. 1993; Iyngkaran et al. 1995; Braga et al. 2001) em outros essa correlação parece estar associada à coortes que apresentam polimorfismos para determinado receptor (CLEC-5A) (Antonio et al. 2015). Estudos *in vitro*, mostram que o TNF- α pode induzir a ativação e apoptose de células endoteliais (Cardier et al. 2005) e em modelos experimentais parece ser responsável pelo aumento de permeabilidade e hemorragia através da produção de espécies reativas de oxigênio (Shresta et al. 2006; Wu-Hsieh et al. 2009).

Os mediadores IL-6 e IL-8/CXCL-8 também encontra-se aumentadas em pacientes com DHF (Butthep et al. 2012), assim como em células endoteliais infectadas pelo DENV *in vitro* (Huang et al. 2000). Tavalera e colaboradores sugeriram que a produção de IL-8 por células endoteliais infectadas contribui para a modificação da permeabilidade transendotelial. Além disso, outros mediadores parecem ter ganhado importância recentemente como fatores envolvidos no aumento de permeabilidade na dengue, tais como a proteína de alta mobilidade, box 1(HMGB-1) (Ong et al. 2012) e mediadores lipídicos, tais como esfingosina-1fosfato (S1P) (Michels et al. 2015).

Os mediadores inflamatórios vistos na dengue podem ser resultados de uma interação do endotélio com as células do sistema imune que levam a alterações de permeabilidade. Aumento de permeabilidade em monocamadas de células endoteliais tem sido demonstrada em sistemas *in vitro* de co-culturas com monócitos infectados (Carr et al. 2003). O TNF- α liberado dos monócitos tem sido apontado como um mediador importante neste processo (Bonner and O'Sullivan 1998; Carr et al. 2003; Dewi et al. 2004; Kelley et al. 2012). Além disso, células dentríticas infectadas pelo vírus DENV-2 foram capazes de secretar metaloproteinases (MMP9 e MMP2) em co-

culturas com células endoteliais e levar a perda de expressão de proteínas de adesão interendotelial com aumento da permeabilidade endotelial (Luplertlop et al. 2006).

Os níveis circulantes de NS-1 também parecem se correlacionar com a gravidade da doença (Libraty et al. 2002; Avirutnan et al. 2006). A mesma parece se ligar a células endoteliais e mesoendotéliais, preferencialmente da microvasculatura, via receptor heparano sulfato (Avirutnan et al. 2007). A proteína NS1 forma uma estrutura multimérica e pode ser tanto encontrada na superfície de células infectadas, quanto liberada como molécula solúvel no sobrenadante de culturas celulares e *in vivo* (Young et al. 2000; Libraty et al. 2002). Lin e colaboradores (2005) demonstraram a reatividade cruzada de anticorpos anti-NS1 com células endoteliais, culminando na ativação das mesmas. Esta ativação foi acompanhada pela produção de IL-6, CXCL8/IL-8 e MCP-1/CCL-2, bem como pelo aumento na expressão de ICAM-1 e na capacidade de aderência às células PBMCs (Lin et al. 2005). De modo interessante, após ligação às células endoteliais, os anticorpos anti-NS1 induziam apoptose mediada por óxido nítrico (NO) (Lin et al. 2002, 2004). Recentemente foi demonstrado que a NS-1 pode diretamente induzir o aumento de permeabilidade *in vitro* e *in vivo* (Beatty et al. 2015), como também pode causar a disruptura do endotélio via receptores do tipo *Toll* 4 (Modhiran et al. 2015).

Com relação ao perfil de ativação das diversas proteínas da cascata de coagulação na dengue, estudos demonstram que muitas delas estão desreguladas nos plasmas de pacientes com dengue, principalmente os que apresentam dengue grave (Suharti et al. 2002; Butthep et al. 2006; Sosothikul et al. 2007). Neste contexto, várias proteínas têm sido estudadas. Já foi observado que altos níveis da forma solúvel de trombomodulina (sTM) são encontrados, ainda na fase febril, em pacientes que evoluíram para casos mais graves da doença (Butthep et al. 2006; Pawitan 2011). Além disso, parece existir uma correlação de citocinas com fatores de coagulação na dengue (Suharti et al. 2002). Ainda são necessários estudos para a melhor elucidação de aspectos de coagulação na dengue, contudo sabemos que as plaquetas desempenham um papel importante nos dois processos.

Finalmente, sabemos que a plaquetopenia é uma das principais alterações hematológicas no curso da infecção pelo DENV. As maiores prevalências de plaquetopenia e as contagens mais baixas de plaquetas ($<50.000/\text{mm}^3$) são observadas

nas formas mais graves da dengue. As contagens de plaquetas se correlacionam tanto com as alterações de permeabilidade e instabilidade hemodinâmica quanto com a recuperação clínica ou mortalidade dos pacientes (Krishnamurti et al., 2001; Chen et al., 2007; Mourão et al 2007; Chua et al, 1993).

As plaquetas são células efectoras altamente especializadas e essenciais às respostas hemostáticas. É crescente o reconhecimento das plaquetas como células inflamatórias com atividades fundamentais na resposta imune inata e adaptativa (Weyrich et al. 2003; Semple et al. 2011; Vieira-de-Abreu et al. 2012). Plaquetas ativadas medeiam respostas imunes e inflamatórias a partir de uma série de mecanismos que incluem desde a secreção de citocinas e quimiocinas até interações justácrinas com leucócitos e células endoteliais. Estas interações sinalizam para a transcrição de genes específicos modulando a função destas células (Kaplanski et al. 1993; Weyrich et al. 2003; Nishimura et al. 2012). Hottz e colaboradores (2013) demonstraram que as plaquetas são ativadas durante a dengue ou quando ativadas pelo DENV *in vitro*, capazes de secretar citocinas/quimiocinas e podem sofrer apoptose (Hottz et al. 2013b). Com relação a interação entre as plaquetas e o endotélio, foi observado que células endoteliais infectadas aderem mais plaquetas à sua superfície, podem contribuir para plaquetopenia associada à dengue (Krishnamurti et al. 2002). Contudo, pouco se sabe sobre a influência direta/indireta das plaquetas na ativação/disfunção endotelial na dengue.

Visto esses dados, esse trabalho visou a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade endotelial na dengue, tanto para a elucidação de aspectos relacionados interação direta da célula endotelial com DENV, com pela ação de plasmas de pacientes com dengue e ainda pela ação de produtos secretados por plaquetas. Desta maneira acreditamos que este estudo possa contribuir de maneira significativa para o melhor entendimento das patologias vascular que observamos na dengue principalmente na gravidade à ela associada.

2. Justificativa

O aumento de permeabilidade vascular é um dos principais sintomas que definem as formas graves da infecção pelo vírus da dengue. Os fatores que permitem alguns pacientes evoluírem às formas mais graves da doença, ainda permanecem pouco esclarecidos, contudo sabemos que fatores virais e do sistema imune do hospedeiro estão envolvidos e culminam em uma intensa ativação/disfunção endotelial, levando ao aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma característico da dengue grave. Neste contexto, visto a carência de estratégias adequadas de intervenção terapêutica para o tratamento dos casos graves da doença, a elucidação dos possíveis fatores envolvidos nas alterações de permeabilidade endotelial na dengue, assim como a sua caracterização e impacto na patogênese das formas graves é fundamental no entendimento desta fisiopatologia. Além disso, com o advento destas informações será possível traçar novas estratégias que possam intervir e/ou prevenir gravidade associada à dengue. Assim, este estudo busca contribuir para o esclarecimento de alguns aspectos relacionados ao aumento de permeabilidade vascular induzidos tanto diretamente pelo vírus dengue, como indiretamente pelos mediadores presentes nos plasmas de pacientes infectados pelo DENV das diferentes fases da doença, e por subprodutos produzidos por plaquetas ativadas pelo vírus *in vitro*.

3. Objetivo Geral

- ✓ Investigar os mecanismos celulares e moleculares associados ao aumento de permeabilidade endotelial na dengue induzidos direta ou indiretamente pela infecção.

3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a infecção de células endoteliais pelo DENV, bem com seu efeito na permeabilidade endotelial e na produção de citocinas IL-6 e IL-8.
- ✓ Identificar fatores circulantes em plasmas de pacientes com dengue envolvidos no aumento de permeabilidade endotelial e possíveis vias de ativação intracelular endotelial.
- ✓ Avaliar a contribuição das interações entre plaquetas infectadas e células endoteliais na ativação e indução de permeabilidade mediada pelo vírus dengue.

4. Metodologia

4.1 Cultura de Células

Foram utilizadas células endoteliais da microvasculatura humana (HMEC-1-ATCC CRL-3243) confirmadas genotipicamente (Laudo 4881/13-Laboratório SONDA UFRJ) neste estudo. As células foram cultivadas em meio MDCB131 (Gibco-Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Sigma Aldrich), 10ng/ml de fator epidermal de crescimento (EGF- Sigma Aldrich), 1ug/ml de hidrocortisona (Sigma Aldrich), 10% de L-glutamina (Gibco-Thermo Fisher Scientific) e 1% de penicilina/streptomina (PS- Gibco-Thermo Fisher Scientific) à 37°C em atmosfera de 5% de CO². Para o cultivo utilizamos garrafas de cultura de 75cm² (Corning), revestidas com 2% de gelatina para cultura (Sigma Aldrich). As passagens foram feitas com solução de tripsina com 0,025% de EDTA (Gibco-Thermo Fisher Scientific). Neste trabalho foram utilizadas células entre as passagens 25 e 34.

Para a produção viral, foram utilizadas células C6/36 da glândula salivar de mosquitos *Aedes albopictus* cultivadas em meio L-15 (Leibovitz; Gibco Thermo Fisher Scientific), suplementados com 0,3% de triptose fosfato (Sigma Aldrich), 0,75 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich), 1,4 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais (Lonza) e 10% ou 2% de SFB, a 28°C em estufa do tipo B.O.D. As células foram cedidas gentilmente pela Dr^a Andreia Da Poian do Laboratório de Bioquímica de Vírus da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Para a quantificação viral foram utilizadas células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney* -linhagem de fibroblastos provenientes de rim de hamster) cedidas gentilmente pela Dr^a Andrea Gamarnik do Instituto Leloir. As mesmas foram cultivadas em placas de petri (BD biosciences) contendo 10 mL do meio mínimo essencial α (α -MEM-Gibco-Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de SFB, à 37°C em atmosfera de 5% de CO².

4.2 Produção Viral

Neste estudo utilizamos o vírus DENV-2 (cepa 16681) propagado em células C6/36 infectadas com multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 0,1 em meio de cultura L-15. Inicialmente, estabelecemos um período de adsorção viral de 90 minutos em meio sem SFB, após trocamos por um meio novo com 2% de SFB sendo as células mantidas por 9 dias a 28°C. Ao final do tempo de propagação viral, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1.000 x g por 5 min para a remoção de *debris* celulares, aliquotado em tubos criogênicos estéreis (Corning) e armazenados a -80°C. Células C6/36 não infectadas submetidas ao mesmo procedimento foram utilizadas como controle (mock). O DENV-2 16681 foi gentilmente cedido pelo Dr. Scott B. Halstead em 1996 e inicialmente produzido em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Vírus – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para obtenção do DENV-2 com título concentrado, tanto a suspensão viral quanto o mock foram centrifugados à 32.000 rpm por 1h em filtros de centrifuga Centricon YM-100 de acordo com as especificações do fabricante (Merck Millipore). Após a filtração, as frações retidas (DENV-2 concentrado e mock) foram coletadas e diretamente utilizadas nos experimentos.

4.3 Titulação e Infecção Viral

Os títulos virais dos estoques produzidos foram determinados por ensaio de plaque. Células BHK-21 confluentes, plaqueadas em placas de cultura (6, 12 ou 24 poços) foram infectadas com diluições seriadas crescentes do estoque viral na ausência de SFB. Após o período de adsorção de 90 min, o inóculo viral foi removido e adicionado às células meio semi-sólido, composto por solução de 1% de carboximetilcelulose (Sigma Aldrich) em meio de cultura α -MEM, suplementado com 1% de SFB e 1% de PS. As células foram incubadas por 5 dias a 37°C na atmosfera de

5% de CO₂. Ao final deste período, as células foram fixadas em 4% de formaldeído (Milipore) por 1 h, lavadas abundantemente em água destilada e coradas com solução de 1% de cristal violeta (Sigma Aldrich) com 20% de etanol (Vetec) por 40 min. O título viral foi calculado a partir do número de plaques contados nos poços correspondentes às diluições seriadas e expresso em unidade formadora de plaque por mL (PFU/mL). Nossos estoques variam de 1,2 a 1,7 x 10⁷ PFU/ml.

Para a infecção viral das células endoteliais HMEC-1, utilizamos o vírus DENV-2 produzido em M.O.I de 2. Mock e DENV inativado pelo calor (65° por 30min) foram utilizados como controles. Após o período de adsorção (90 min) o vírus foi retirado, adicionado o meio fresco e a infecção monitorada por 2h, 24h e 48h.

4.4 Viabilidade Celular

Para todos os ensaios propostos foi realizado a viabilidade celular pela técnica de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). As células foram cultivadas em placas de 96 poços com 100µl meio/poço (aproximadamente 10⁵ células/poço). Poços somente com meio de cultura foram utilizados com controle de absorbância (“blanks”), assim como células não estimuladas. Após os ensaios, adicionamos 10µl de solução de MTT (Sigma Aldrich) 5mg/ml em PBS por 2h a 4h em estufa sem luminosidade até a formação dos cristais de formazan. Em seguida, foram adicionados 100µl de detergente (SDS) e incubamos overnight em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 570nm. Os resultados foram expressos pelas médias dos valores da triplicata subtraindo as médias do “blank”.

4.5 Permeabilidade Endotelial

Placas de *Transwell* de 96 poços (0,4 µm de poro; 0.143 cm² de área Corning HTS-Transwell) foram inicialmente revestidas com 2% de gelatina para cultura de células por 1h (50µl/poço). A gelatina foi então retirada e as placas incubadas com meio de tratamento composto por MCDB 131 com 20% de SFB por 1h. Em seguida, células HMEC-1 (2x10⁵ /poço) foram cultivadas nos insertos por 72h para adquirirem confluência. Após, as mesmas foram estimuladas nos diferentes ensaios em seus respectivos tempos já descritos. Ao final de cada ensaio, a permeabilidade endotelial foi

mensurada através da passagem pela monocamada de células de 50 μ M Albumina-fluoresceína isotiocianato (FITC) (Sigma-Aldrich) diluído em PBS por 15 min para a câmara inferior do *Transwell*. A quantidade de Albumina-FITC foi lida em espectrofotômetro em filtro de fluorescência com comprimentos de onda de 485 de excitação e 520 de emissão (Molecular Devices).

4.6 Quantificação de Citocinas

As citocinas TNF- α , IL-8/CXCL-8, IL-6, IFN- γ , MCP-1/CCL2, IL1- β , VEGF, RANTES/CCL-5 e MIF foram quantificadas nos plasmas de pacientes com diagnóstico positivo para dengue e voluntários saudáveis utilizando o ensaio Multiplex para 8 citocinas (MilliPlex Human Cytokine Assay; Milipore) de acordo com as especificações do fabricante. Para o ensaio Multiplex, 50 μ L das amostras foram incubadas com microesferas marcadas com sondas fluorescentes conjugadas a anticorpos específicos para cada citocina alvo. As microesferas foram lavadas e incubadas com anticorpos de detecção conjugados a biotina, e posteriormente com estreptavidina conjugada a PE. As concentrações das citocinas foram determinadas usando uma leitora LuminexTM (Bio-Plex, Bio-Rad). As citocinas IL-8/CXCL-8, IL-6 e MCP-1/CCL2 nos sobrenadantes de cultura foram dosadas por Ensaio Imunoenzimático ELISA (Duo Set, R&D Systems) utilizando-se anticorpos monoclonais específicos (Duo set kit – R&D) de acordo com as especificações do fabricante. Para essas análises foi utilizado o protocolo da Pharmingen, onde placas de 96 poços (Nunc) foram revestidas com anticorpos de captura. As placas foram cobertas e incubadas em torno de 16 h na geladeira. No dia seguinte, após 3 lavagens com PBS/Tween, as placas foram bloqueadas com PBS/BSA 1% para evitar as ligações inespecíficas. Após 1 h de intervalo, as placas foram submetidas a quatro lavagens, com o reagente específico, onde foram adicionadas as curvas-padrão bem como os sobrenadantes das células. Novamente foram incubadas por 16 h na geladeira. No último dia, após lavagem, os anticorpos de detecção conjugados com biotina foram adicionados, deixando-se por mais 1 h. As lavagens foram feitas e o substrato (streptavidina-HRP) foi colocado para incubação por cerca de 30 min. Em seguida, o revelador (TMB-tetrametilbenzidina) foi adicionado até o aparecimento da curva e a reação foi parada com H₂SO₄ (1M). A leitura foi feita em leitora de placa a 450 nm. Os dados foram analisados através do programa Soft Max Pro, com as dosagens baseadas nas respectivas curvas-padrão.

4.7 Amostras Clínicas

Amostras de sangue periférico foram obtidas de 38 pacientes com dengue assistidos no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC) – FIOCRUZ durante a epidemia ocorrida em 2011, dos quais 17 apresentaram dengue branda, 17 apresentaram dengue com sinais de alarme e 4 apresentaram dengue grave, de acordo com os critérios de classificação da organização mundial de saúde (OMS,2009). Foram colhidos 17 mL de sangue a partir de punção venosa usando um escalpe de 21G em uma seringa contendo 3 mL de ACD (8 g/L de ácido cítrico, 22,4 g/L de citrato de sódio e 2 g/L de dextrose; pH 5,1). O sangue foi centrifugado a 200 x g por 20 min a temperatura ambiente, os plasmas foram recolhidos, identificados e armazenados à -80°C. Para os diferentes ensaios, os plasmas foram diluídos à 10%. O diagnóstico foi confirmado sorologicamente a partir da detecção de IgM e IgG contra a proteína viral E (E-Den01M and E-Den01G; PanBio) e/ou do antígeno viral NS1 (BioRad); ou molecularmente a partir da detecção do RNA viral. O sorotipo do DENV infectante foi determinado usando RT-PCR (Lanciotti et al, 1992; Johnson et al, 2005). A predominância do sorotipo de DENV detectável nas amostras analisadas foi DENV-1. Os pacientes foram atendidos no Hospital do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ) de acordo com projeto já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no mesmo instituto (2010, #016- Anexo 9.2). Todos os participantes foram esclarecidos sobre os termos da pesquisa e assinaram o Termo de consentimento esclarecido. A tabela 1 sumariza as características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos. Além disso, foram obtidas 20 amostras de sangue periférico de voluntários saudáveis (controles).

Tabela 1: Característica dos Pacientes com Dengue e Voluntários saudáveis.

	Controles (20)	Dengue Branda (17)	Dengue com sinais de alarme¹ (17)	Dengue Grave² (4)
Idade (Anos)	27 (26-35)	40 (18-65)	34 (18-51)	28 (20-38.5)
Gênero (masculino)	12 (40 %)	8 (47.05 %)	9 (52.9 %)	2 (50 %)
Contagem de Plaquetas,	–	148.4 (54-232)	139 (26-289)	29 (23.5-73.5)*

(x1,000 /mm³)

Hematócrito, %	–	40.81(36.70-44.80)	39.48 (28-47.70)	42.4 (39.3-42.4)
Albumina, g/dL	–	3.9 (3.2-4.6)	3.58 (3.1-3.9)	3.1 (2.9-3.4)*
TGO/AST, IU/L	–	58.33 (23-109)	63.89 (22-109)	145 (96.8-171.5)*
TGP/ALT, IU/L	–	71.78 (27-132)	65.56 (33-162)	104 (76.8-144.8)
Manifestações Hemorrágicas ³	–	2 (11.7 %)	5 (33,33 %)	4 (100 %)
Hidratação Venosa	–	2 (11.7%)	9 (52.9 %)	4 (100 %)
Infecção Secundária	–	5 (29.41 %)	11 (64.7 %)	3 (75.00 %)

¹Dor abdominal, vômito persistente, edema, hipotensão postural, sangramento de mucosa, ou aumento no hematócrito concorrente com declínio rápido da contagem de plaquetas;

²Extravasamento de plasma grave, acúmulo de líquido em cavidade – ascite (evidenciado por ultrassonografia abdominal) e/ou sangramento grave;

³Sangramento de gengiva, metrorragia, hematêmese, hematuria, petéquias e exantema;

*p < 0.05 comparado com dengue branda.

4.8 Lise celular e dosagem de proteínas

Após os diferentes estímulos, as células endoteliais (HMEC-1) foram lavadas 2 vezes com PBS 1X pH:7,4 e adicionados 100 µl/poço (placa de 24 poços) de tampão de lise composto por: 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10% de glicerol; 150mM de NaCl; 0.1mM de EDTA; 1mM de DTT; Inibidores de Protease (Complete mini-Roche) e Fosfatase (PhosStop tablets-Roche) de acordo com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Logo após as células foram lisadas mecanicamente por raspagem. O lisado celular foi sonificado por 10min, centrifugado em microcentrífuga (Eppendorf) a 13200 rpm/10 min e o sobrenadante armazenado a –20⁰C. As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry (Randall 1951) e cerca de 30µg de proteínas totais dos lisados de cada amostra foram aplicados no gel de SDS-PAGE para realização do *Western Blotting*.

4.9 Western Blotting

Inicialmente os lisados foram aquecidos à 100°C e adicionados ao tampão de amostra. O Gel SDS-PAGE foi preparado nas concentrações de 8%, 10% ou 12% de bis/acrilamida, conforme proteína a ser observada. O padrão de peso molecular utilizado foi o Rainbow TM (Amersham). Em seguida a corrida eletrolítica foi realizada por 90 minutos a 120V (Tris Base 250 mM, Glicina 2M, SDS 34 mM) e as proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), em sistema molhado a 200 mA por 2 horas (tampão de transferência Tris-HCl 25 mM (pH 8,3); glicina 192 mM e metanol 20% (v/v)). Após transferência, a membrana foi corada com solução 0,1% vermelho Ponceau (p/v) em ácido acético 5% e em seguida, lavada com água deionizada. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 60 minutos com Tampão TBST- Leite 5% (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,1% Tween® 20 e 5% de leite em pó desnatado, pH 8,0) a 25°C sob agitação. Após bloqueio, a membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários por vez: P-ERK e ERK (Cell Signaling) e anti-CD74 (Santa Cruz) 1:1000 *overnight*. Todos os anticorpos foram diluídos em tampão de bloqueio. No dia seguinte, a membrana foi lavada com 10 ml de Tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,1% Tween 20, pH 8,0) por cinco vezes durante 2 minutos e depois incubada com anticorpo secundário, para P-ERK e ERK utilizamos anti-rabbit IRDye 1:10000 e anti-mouse IRDye 1:10000 respectivamente (LI-COR) e para anti-CD74 utilizamos anti-mouse 1:10000) ligado à peroxidase por 1h, a 25°C sob agitação. Logo depois, a membrana foi lavada cinco vezes por 2 minutos com Tampão TBS-T. Finalmente, a formação do complexo antígeno-anticorpo foi revelada por reação de quimioluminescência, utilizando o kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate® (Thermo Scientific) e exposição de filme de raio-X Amersham Hyperfilm ECL (24 × 30 cm) (GE Healthcare) por intervalos variados para o CD74. Para P-ERK e ERK a leitura foi feita em no aparelho Odyssey^R CLX (LI-COR).

4.10 Isolamento de plaquetas

As plaquetas foram isoladas de doadores saudáveis utilizando o método de Hamburger e McEver (1990) adaptado por Hottz (2013). Foram coletados 50 ou 100 mL de sangue foram colhidos a partir de punção venosa usando escalpe de 21G em seringa contendo ACD (8 g/L de ácido cítrico, 22,4 g/L de citrato de sódio e 2 g/L de

dextrose; pH 5,1). O sangue foi centrifugado a 200 x g por 20 min a temperatura ambiente para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi coletado e centrifugado a 500 x g por 20 min na presença de 100 nM de PGE1 (Cayman Chemical 13010.1). O sobrenadante foi descartado, as plaquetas ressuspensas em PSG (5mM de PIPES, 145 mM de NaCl, 4mM de KCl, 50 μ M de Na₂HPO₄, 1 mM de MgCl₂.6 H₂O, 5,5 mM de glicose; pH 6,8) contendo 100 nM de PGE1 e centrifugadas a 500 x g por 20 min a temperatura ambiente. As plaquetas foram ressuspensas em meio 199 (M199 com EBSS, L-glutamina e HEPES; Lonza 12-117F) e mantidas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ até a realização dos ensaios.

4.11 Ativação de plaquetas com agonista ou DENV *in vitro*

Plaquetas isoladas de voluntários saudáveis foram incubadas com 0,5 U/mL de trombina (Sigma T1063), com o DENV-2 MOI 1 ou a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂, por 2 h. Passado este tempo, as células foram centrifugadas a 900 x g por 10 min e a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, armazenado a -80°C até o momento do uso e as plaquetas foram lavadas por três vezes com M199, a fim de garantir que as partículas virais não aderidas fossem removidas. Como controle experimental, as células foram incubadas com meio de cultura ou mock nas mesmas condições.

4.12 Análise das micropartículas derivadas de plaquetas

A população de micropartículas foi determinada calibrando o citômetro com esferas de látex de tamanhos definidos (Polybead, Polyscience Inc. #07310). A região das micropartículas foi desenhada para conter esferas de tamanho igual ou menor a 0,989 μ m (Figura 4.1painel superior). A quantificação das micropartículas derivadas de plaquetas foi expressa em micropartículas CD41⁺ por 100 plaquetas em cada amostra.

No intuito de isolar MPs de plaquetas expostas ao Mock ou ao DENV, nós testamos centrifugações em diferentes condições para obter a maioria das MPs nos sobrenadantes restando uma contaminação mínima por plaquetas. A centrifugação a 500 x g por 10 min mostrou um resultado satisfatório (Figura 4.1painel inferior).

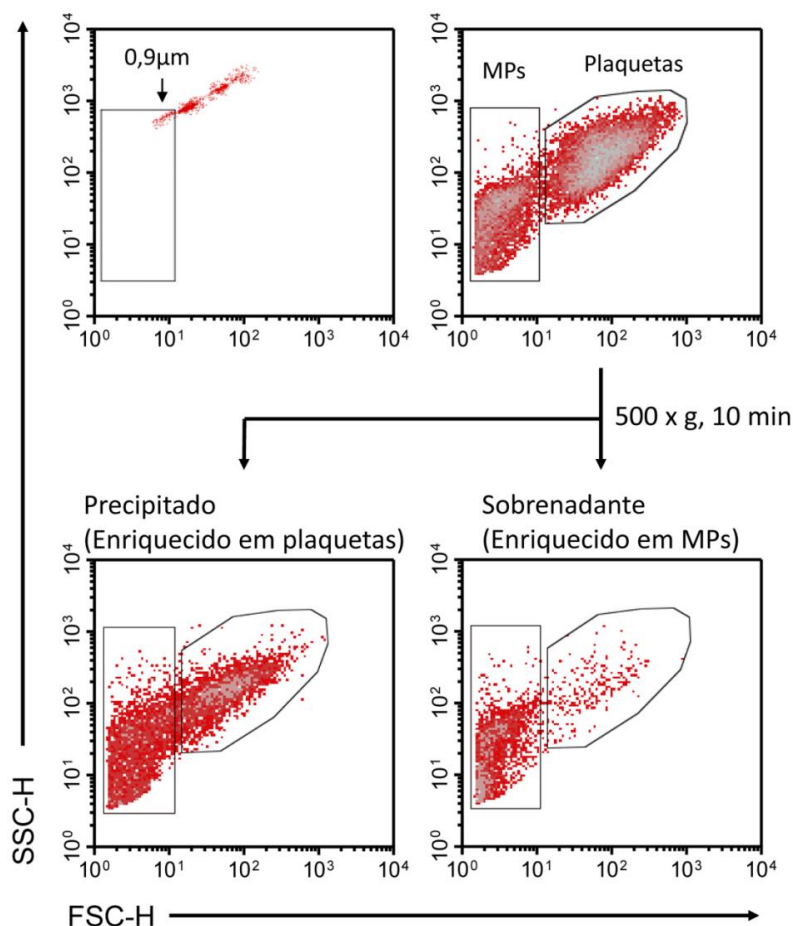


Figura 4. 1: Identificação das MPs por citometria de Fluxo e método para isolamento das MPs. Topo: Density plots representativos das microesferas de latex (polybeads) (esquerda) e de plaquetas + MPs (direita). Abaixo: Density plots representativos do precipitado (plaquetas) e sobrenadante (MPs) recuperados após centrifugação a 500 x g por 10 minutos.

4.13 Drogas

Para os ensaios de inibição, utilizamos o inibidor do MIF: ISO-1 (Calbiochem) na concentração final de 100 μ M/ml. Dimetilsufóxido (DMSO- Sigma Aldrich) foi utilizado como veículo na mesma concentração. Utilizamos o antagonista do receptor de IL1- β (IL1-Ra-R&D) na concentração final de 10 μ M/ml, o mesmo foi resuspenso em solução balanceada de Hank's (HBSS).

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os dados obtidos neste estudo foram representados como média e

erro padrão da média (EPM). As variáveis numéricas foram testadas para distribuição normal usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparações envolvendo mais de dois grupos a análise de variância (Oneway ANOVA) foi usada para determinar as diferenças. Para comparações entre plasmas de um mesmo doador, na presença ou ausência de estímulo, foi utilizado o teste t pareado ou o teste U de Mann-Whitney (no caso de distribuição não-paramétrica). Valores $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. Resultados

5.1 Células endoteliais são capazes de replicar o vírus dengue *in vitro*.

Considerando que a ativação e disfunção endotelial estão associados com a gravidade na infecção pelo dengue (Page and Liles 2013), nós buscamos identificar o efeito da ação direta do vírus DENV 2 na infecção de células endoteliais. Trabalhos já publicados identificaram que o vírus dengue é capaz de infectar células endoteliais primárias (HUVECs) *in vitro* (Bonner and O'Sullivan 1998; Huang et al. 2000; Calvert et al. 2015). Desta maneira, nós infectamos células endoteliais de linhagem (HMEC-1) com o vírus DENV 2 (cepa 16881) em uma M.O.I de 2 e observamos por ensaio de plaque a partir do sobrenadante das células endoteliais infectadas que as mesmas são capazes de produzir partículas virais infecciosas 48 horas após a infecção viral (Figura 5.1). Este resultado sugere que apesar das células endoteliais não serem as principais células alvo da infecção pelo DENV, em nosso modelo, as mesmas conseguem replicar o vírus dengue *in vitro*.

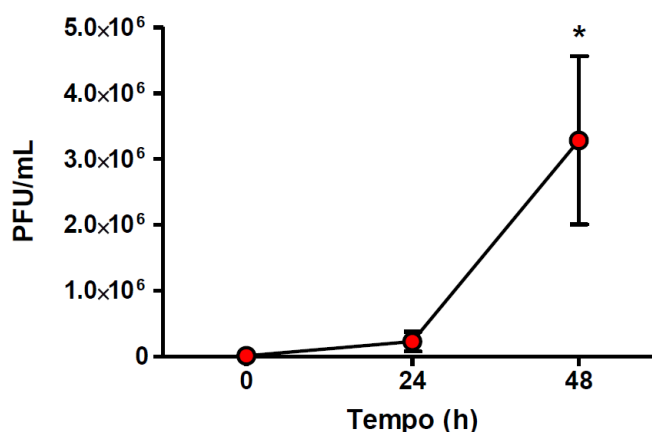


Figura 5. 1: Replicação do vírus DENV 2 em células endoteliais HMEC-1. Células endoteliais HMEC-1 foram infectadas com o vírus dengue 2 (cepa 16881/MOI 2). O sobrenadante foi recolhido nos tempos 0, 24 e 48 horas pós-infecção e as partículas virais presentes no sobrenadante foram quantificadas em ensaio de plaque em células BHK-21. Pontos representam médias \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. * significa $p < 0,05$ em relação ao tempo zero.

5.2 O vírus DENV não altera diretamente a permeabilidade de células endoteliais *in vitro*.

Visto que as células HMEC-1 conseguem sustentar a replicação viral, resolvemos investigar se a ação direta do vírus seria capaz de aumentar a permeabilidade endotelial *in vitro*. Neste ensaio, as células endoteliais foram cultivadas em sistema de *transwell*, infectadas com o vírus DENV 2 (M.O.I 2) e a avaliação na alteração de permeabilidade foi mensurada em 2, 24 e 48 h pós-infecção. Não observamos diferenças significativas na indução de permeabilidade das células endoteliais infectadas com o DENV em comparação as células estimuladas com Mock e DENV inativado pelo calor (controles) em todos os tempos analisados (Figura 5.2 A). Além disso, também não foi observado diferenças significativas na viabilidade das células endoteliais infectadas em comparação as células não infectadas e ao Mock (Figura 5.2 B). Nossos resultados demonstram que o vírus DENV não induziu aumento de permeabilidade de células endoteliais *in vitro* nas condições observadas, assim como não altera a viabilidade das mesmas.

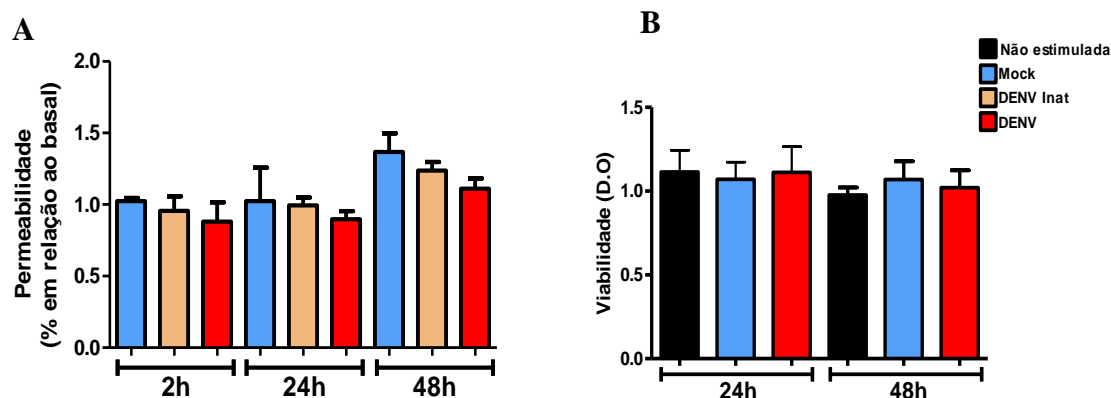


Figura 5. 2: Análise da permeabilidade e viabilidade de células endoteliais infectadas pelo vírus dengue *in vitro*. Células endoteliais foram infectadas com o vírus dengue 2 (cepa 16881/MOI 2) e a permeabilidade mensurada pela passagem de albumina conjugada à FITC através da monocamada em 2, 24 e 48 horas pós-infecção (A). O vírus DENV inativado pelo calor e o Mock foram utilizados como controles. A viabilidade celular foi analisada por MTT em 24h e 48h (B). Barras representam médias \pm erro padrão da média de três experimentos independentes.

5.3 Células endoteliais infectadas com o vírus da dengue são capazes de secretar IL-6 e IL-8/CXCL-8.

De acordo com os resultados obtidos na figura 5.2 A, nós resolvemos avaliar se as células HMEC-1 seriam passíveis de ativação pelo vírus DENV e capazes de produzir mediadores inflamatórios. Logo, nós infectamos as células endoteliais com o vírus DENV 2 (MOI 2) e recolhemos o sobrenadante para a dosagem de mediadores inflamatórios. Desta forma, a produção de IL-8/CXCL-8 (Figura 5.3A) e IL-6 (Figura 5.3B) foi avaliada nos tempos de 2, 24 e 48 horas pós-infecção. Nossos resultados demonstraram que o vírus dengue foi capaz de aumentar a produção de IL-8/CXCL-8 e IL-6 de maneira significativa no tempo de 48h após a infecção em comparação com os sobrenadantes das culturas estimuladas com o vírus inativado pelo calor ao mock. Não observamos diferenças significativas nos níveis destas citocinas após 2h e 24h pós-infecção, contudo foi observado uma tendência no aumento das mesmas no tempo de 24 horas.

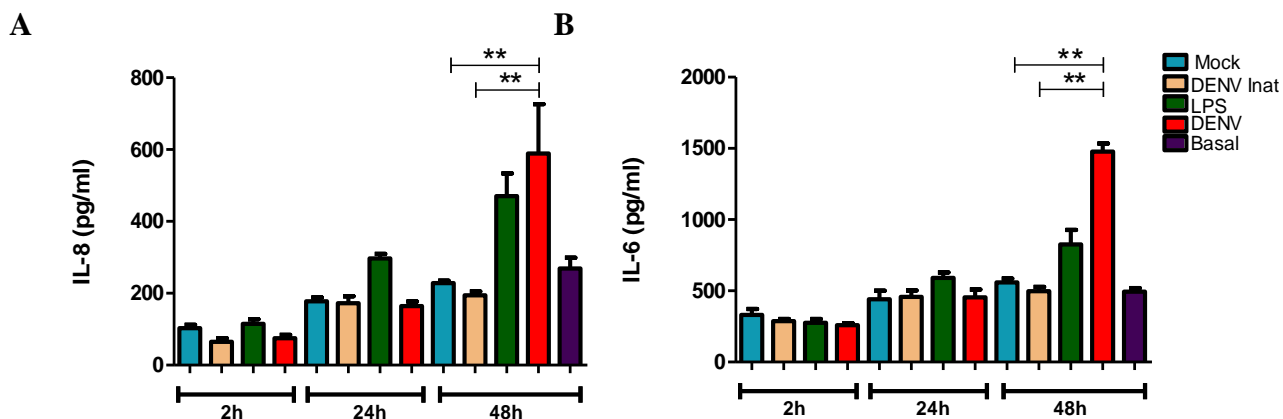


Figura 5. 3: Quantificação de citocinas em sobrenadantes de células endoteliais infectadas pelo vírus DENV. Células endoteliais foram infectadas com o vírus dengue 2 (cepa 16881/MOI 2) e os sobrenadantes recolhidos em 2, 24 e 48 horas pós-infecção, onde foram quantificados o IL-8/CXCL-8 (A), IL-6 (B). O vírus DENV inativado pelo calor, o mock e células não estimuladas foram utilizados como controles negativos e o LPS utilizado como controle positivo. Barras representam médias \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. ** significa $p < 0,001$.

5.4 Plasmas de pacientes com dengue apresentado diferentes fases da doença induzem aumento de permeabilidade endotelial in vitro.

Alguns trabalhos relatam a presença de mediadores inflamatórios nas amostras séricas e/ou plasmáticas de pacientes com dengue (Srikiatkachorn e Green 2010; John et al. 2015), e evidências sugerem o envolvimento destes mediadores no aumento de permeabilidade vascular nos casos graves de dengue (Page e Liles 2013). Desta maneira, nós resolvemos analisar se plasmas de pacientes com dengue das diferentes fases na doença seriam capazes de induzir aumento de permeabilidade endotelial. Para esta análise inicial, estimulamos células endoteliais (HMEC-1) com plasmas de pacientes representativos das diferentes fases da doença (Febre, defervescência e convalescência) de diferentes manifestações clínicas da doença (dengue branda, com sinais de alarme (SA) e grave), por duas, doze e vinte e quatro horas em sistema de *transwell* (Figura 5.4 A e B). Neste ensaio, observamos que os plasmas de pacientes com dengue grave, assim como os que apresentaram sinais de alarme foram capazes de induzir um maior aumento de permeabilidade comparado aos plasmas provenientes de pacientes que apresentaram manifestações brandas da doença (dengue branda). Além disso, plasmas da fase de defervescência parecem induzir uma maior permeabilidade com relação a fase febril. Nós observamos os maiores índices de aumento de permeabilidade nos plasmas de pacientes graves da fase de defervescência. Não foram observadas diferenças significativas de permeabilidade nas culturas estimuladas com plasmas provenientes da fase de convalescência (dados não mostrados). A viabilidade celular das culturas estimuladas com os mesmos plasmas foi analisada por MTT (Figura 5.4 C e D) onde observamos um decréscimo da viabilidade celular apenas nas culturas estimuladas plasmas de pacientes graves na fase de defervescência.

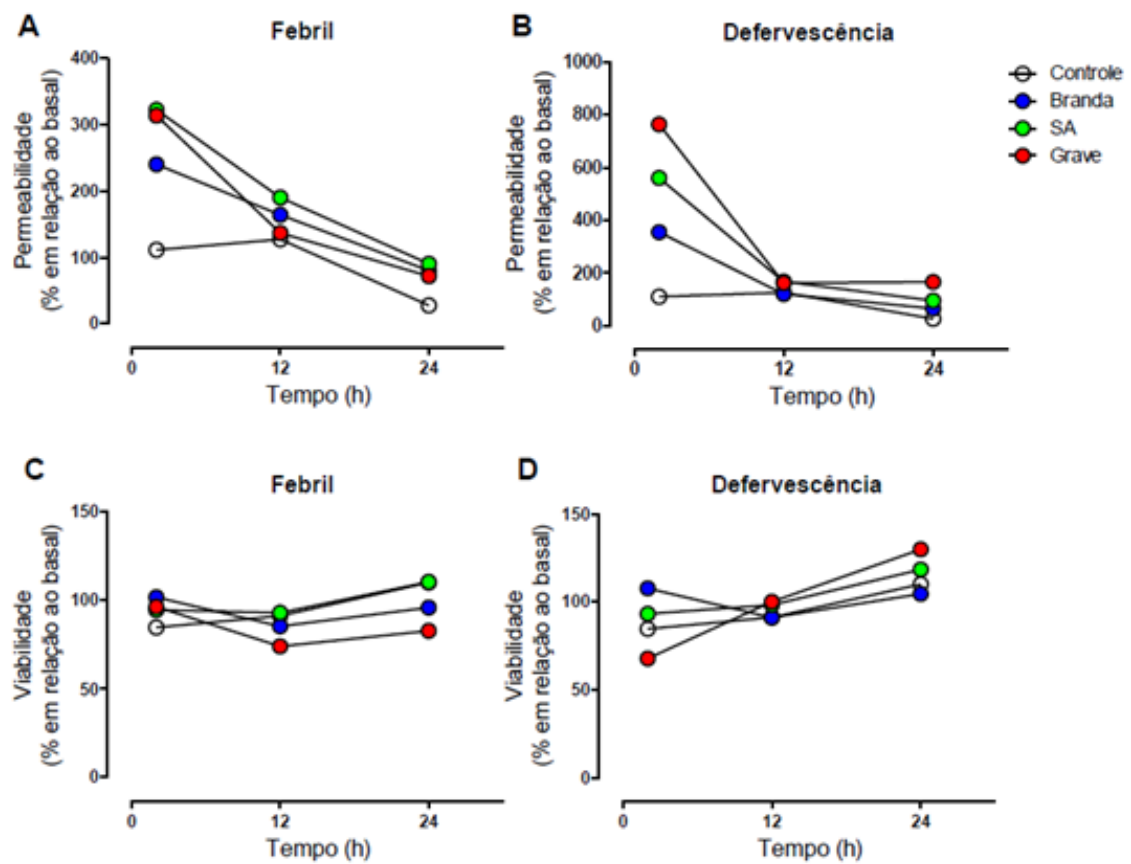


Figura 5. 4:Análise cinética de permeabilidade e viabilidade de células endoteliais estimuladas por plasmas de pacientes infectados com dengue durante 2, 12 e 24 horas. Células endoteliais foram incubadas com plasmas da fase febril (Figuras A e C) e defervescência (Figuras B e D) de pacientes que apresentaram dengue branda (azul), dengue com sinais de alarme (SA-verde) e dengue grave (vermelho). A permeabilidade foi mensurada pela passagem de albumina conjugada à FITC através da monocamada de células endoteliais (HMEC-1) (n=2 para cada plasma de diferentes manifestações clínicas). Plasmas de voluntários saudáveis foram utilizados como controle (branco). A viabilidade das células estimuladas foi obtida através da atividade do MTT (C e D). Os dados foram analisados percentualmente em relação ao basal (células não estimuladas).

A partir dos dados apresentados na figura 5.4, observamos que a indução de permeabilidade endotelial *in vitro* parece ocorrer de maneira mais intensa em tempos precoces de incubação. Logo, nós passamos a avaliar a permeabilidade somente no tempo de duas horas. Podemos demonstrar na Figura 5.5 que plasmas de pacientes com dengue branda, na fase febril e na defervescência foram capazes de induzir um aumento significativo de permeabilidade endotelial *in vitro* em comparação aos plasmas de voluntários saudáveis. Além disso, plasmas de pacientes dengue com sinais de alarme e dengue grave, da fase febril induziram de maneira significativa um aumento de permeabilidade em relação ao controle. Interessantemente, os plasmas da fase de defervescência das mesmas manifestações clínicas, apresentaram um aumento significativo de permeabilidade endotelial que foi significativo em relação aos controles, como também em relação aos plasmas da mesma fase de pacientes com dengue branda. Não observamos diferenças significativas na indução de permeabilidade nos plasmas da fase de convalescência. Estes resultados sugerem que fatores presentes nos plasmas de pacientes com dengue são capazes de induzir aumento de permeabilidade de células endoteliais *in vitro*. Logo, tais fatores parecem estar proeminentes nos plasmas da fase de defervescência de pacientes que apresentaram dengue com sinais de alarme e dengue grave.

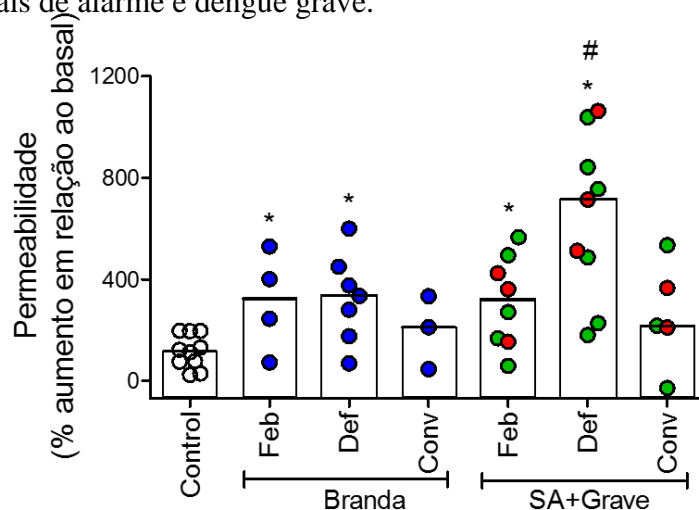


Figura 5. 5 Análise da permeabilidade endotelial induzida por plasmas de pacientes infectados pelo DENV em 2 horas. Células endoteliais foram incubadas com plasmas de pacientes dengue branda (azul/n=7), dengue com sinais de alarme (SA) (verde/n=6) e dengue grave (vermelho/n=3) das diferentes manifestações clínicas da doença (Feb-febril, Def-defervescência e Conv-convalescência) e por plasmas de voluntários saudáveis (branco/n=10) mensuradas a passagem de albumina conjugada à FITC através das monocamadas de células endoteliais. Os dados foram analisados percentualmente em relação ao basal (células não estimuladas). Barras representam médias ± erro padrão da média. *significa $p < 0,05$ em relação ao controle (voluntário saudável) e # em relação aos plasmas da mesma fase na dengue branda.

5.5 Painel de citocinas/quimiocinas presentes em plasmas de pacientes infectados pelo DENV e controles.

Diversos trabalhos buscam identificar possíveis mediadores inflamatórios em plasmas de pacientes com dengue, principalmente aqueles que estejam alterados nos casos graves da doença (Bozza et al. 2008; Srikiatkachorn and Green 2010; Rathakrishnan et al. 2012; Mangione et al. 2014; Ferreira et al. 2015; John et al. 2015). Logo, na tentativa de identificar alguns possíveis fatores que poderiam estar associados ao aumento de permeabilidade endotelial induzido pela ação dos plasmas de pacientes com dengue visto na figura 5.5, a quantificação de citocinas/quimiocinas foi realizada em nos plasmas de pacientes apresentando as diferentes manifestações clínicas da doença. Foram quantificados o TNF- α (Figura 5.6A), IL-8/CXCL-8 (Figura 5.6B), MCP-1/CCL-2 (Figura 5.6C), IFN- γ (Figura 5.6D), IL-6 (Figura 5.6E), VEGF (Figura 5.6F), RANTES/CCL-5 (Figura 5.6G), IL1- β (Figura 5.6H) e MIF (Figura 5.6I). Nós observamos níveis circulantes significativamente aumentados de TNF- α , CXCL-8 (IL-8), CCL-2 (MCP-1) e INF- γ , tanto em plasmas dos grupos de pacientes dengue branda quando dengue com SA/grave com relação aos controles. Já para IL-6, VEGF, RANTES/CCL-5 e IL1- β vimos um aumento significativo nos plasmas de pacientes SA e grave em relação aos plasmas controles. Não observamos diferenças significativas entre os grupos de pacientes, contudo, observamos uma tendência no aumento da concentração destes mediadores nos plasmas SA e grave com relação aos plasmas de pacientes dengue branda. De maneira interessante, esta tendência foi RANTES/CCL-5 e IL1- β apresentaram concentrações mais elevadas em pacientes com SA e grave. Para o MIF, vimos um perfil crescente de concentração em que plasmas de pacientes com dengue branda apresentaram maiores níveis em relação aos controles e nos pacientes com SA e graves, estes níveis foram ainda maiores ainda maiores em relação à dengue branda. Este perfil de citocinas/quimiocinas encontrado nos plasmas sugere um envolvimento de CCL-5 (RANTES), IL1- β e MIF como possíveis marcadores da patogênese da dengue.

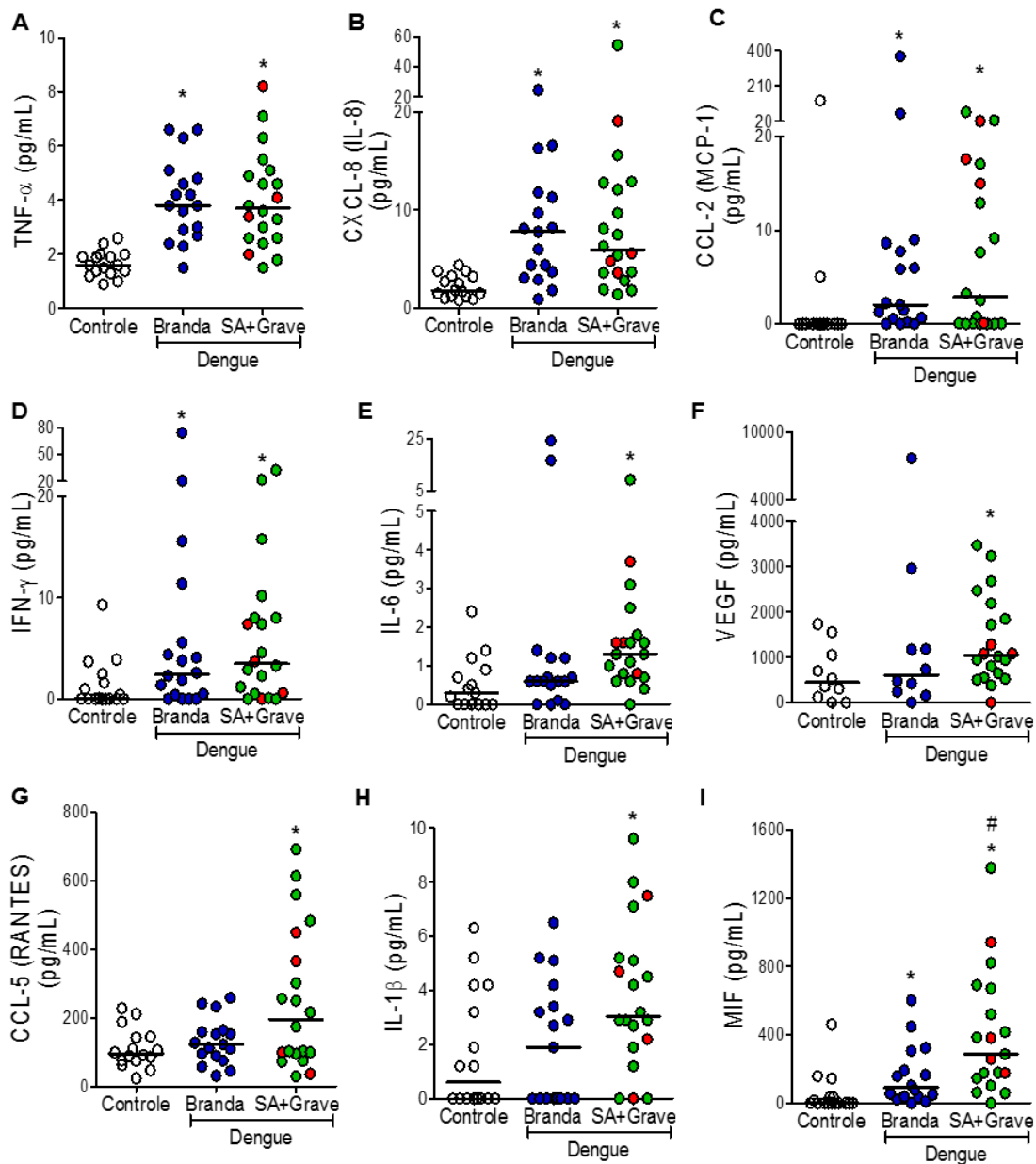


Figura 5.6 : Níveis Plasmáticos de citocinas/quimiocinas em pacientes infectados pelo vírus DENV. Quantificação dos níveis plasmáticos de TNF- α (A), IL-8/CXCL-8 (B), MCP-1/CCL-2 (C), INF- γ (D), IL-6 (E), VEGF (F), RANTES/CCL-5 (G), IL-1 β (H) e MIF (I) em plasmas de pacientes dengue branda (azul/n=17), com sinais de alarme (verde/n=16) e dengue grave (vermelho/n=4). Plasmas de voluntários saudáveis foram utilizados como controles (branco/n=16). As dosagens foram feitas em ensaio de Luminex. Gráficos expressos em *dot plot*. A linha representa a mediana. * representa $p < 0.05$ com relação ao controle e # com relação a dengue branda.

5.6 Envolvimento do MIF no aumento de permeabilidade endotelial induzido por plasmas de pacientes com dengue *in vitro*.

Estudos já demonstraram que a produção e quantidade de MIF podem estar associados ao desenvolvimento de várias doenças agudas infecciosas (Lue et al. 2002; Asare et al. 2013). Alguns trabalhos, inclusive do nosso grupo, demonstraram que pacientes com dengue grave apresentam altos níveis circulantes de MIF (Chen et al. 2006; Assunção-Miranda et al. 2010) e diferenças significativas foram encontradas entre os pacientes que sobreviveram à infecção comparados aos casos fatais (Chen et al. 2006). Logo, nós demonstramos que o tratamento dos plasmas com ISO-1 (antagonista do MIF), levou à inibição parcial e significativa na indução de permeabilidade de células endoteliais *in vitro*, quando comparados aos plasmas não tratados com ISO-1 (Figura 5.7). Esta inibição da indução de permeabilidade endotelial foi mais proeminente nos plasmas tratados de pacientes com SA e grave.

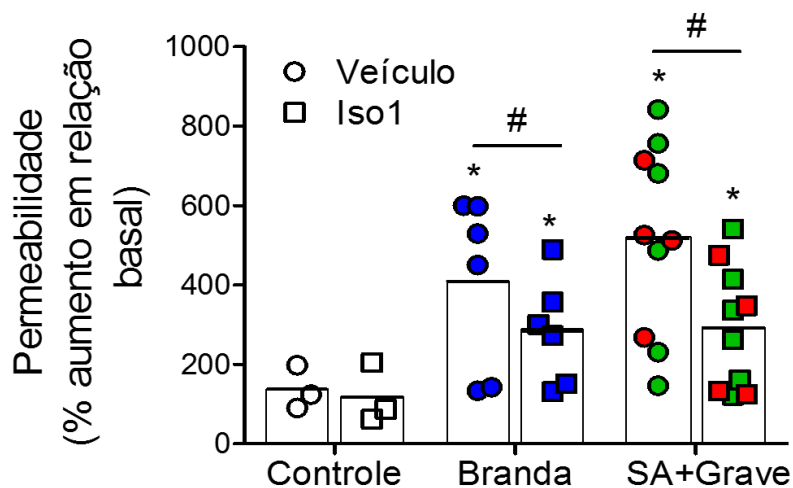


Figura 5. 7 Efeito do antagonista do MIF (ISO-1) na permeabilidade endotelial. Células endoteliais foram estimuladas com plasmas de pacientes com dengue branda (n=6), com sinais de alarme (SA n=6) e grave (n=4) na presença ou ausência do antagonista do MIF, ISO-1(100µM) ou de DMSO (veículo trinta minutos antes do estímulo). A permeabilidade endotelial foi mensurada pela passagem de albumina conjugada à FITC através da monocamada de células endoteliais. Os dados foram analisados percentualmente em relação ao basal (células não estimuladas). *significa $p < 0,05$ em relação ao controle (voluntários saudáveis). # significa $p < 0,05$ em relação aos plasmas não tratados.

5.7 Envolvimento da IL-1 β no aumento da permeabilidade endotelial induzido por plasmas de pacientes com dengue *in vitro*.

A Interleucina IL-1 β é uma importante citocina pró-inflamatória que se encontra aumentada durante a infecção pelo vírus dengue (Suharti et al. 2002; Bozza et al. 2008). Esta citocina tem sido associada ao aumento de permeabilidade endotelial, trombose e desregulação da homeostase vascular. Como demonstrado na figura 5.5, pacientes apresentando SA e graves apresentam aumento significativo dos níveis circulantes de IL-1 β . Sendo assim, nós resolvemos investigar o papel da IL-1 β na indução de permeabilidade *in vitro*. Desta maneira observamos que células endoteliais tratadas com o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) apresentaram uma diminuição significativa da indução de permeabilidade endotelial tanto nas células estimuladas com plasmas de pacientes SA quanto com plasmas de pacientes graves em relação às células estimuladas com plasmas controles (Figura 5.8). Além disso, de maneira interessante, nós vimos ainda que quando tratamos os plasmas com o antagonista do MIF (ISO-1) e as células endoteliais com o antagonista do receptor de IL-1 β (IL-1Ra) ao mesmo tempo, uma inibição ainda maior da indução de permeabilidade endotelial com relação às células estimuladas com plasmas não tratados foi observada. Estes resultados evidenciam uma participação importante do MIF e da IL-1 β na indução de permeabilidade *in vitro*.

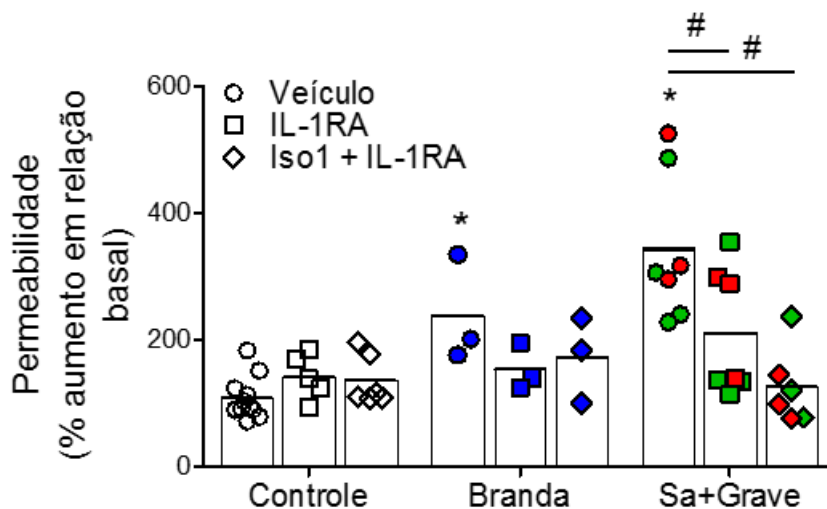


Figura 5. 8: Efeito do antagonista do receptor de IL-1(IL-1Ra) e do antagonista do MIF (ISO-1) na permeabilidade endotelial. Células endoteliais foram estimuladas com plasmas controles (branco/n=5) de pacientes com dengue branda (n=3), com sinais de alarme (SA n=4) e grave (n=3) na presença ou ausência do antagonista do receptor de IL-1 (IL1-Ra-10ug/ml) e MIF (ISO-1-100µM) ou de DMSO (veículo). A permeabilidade foi mensurada pela passagem de albumina conjugada à FITC através da monocamada de células endoteliais. Os dados foram analisados percentualmente em relação ao basal (células não estimuladas). * significa $p < 0,05$ em relação ao controle (voluntários saudáveis). # significa $p < 0,05$ em relação aos plasmas não tratados.

5.8 Plasmas de pacientes dengue grave induzem uma maior fosforilação de ERK (P-ERK 42/44) e este evento parece ser dependente de MIF.

Visto a importante participação do MIF e da IL-1 β na indução da permeabilidade endotelial *in vitro*, nosso próximo passo visou a investigação da via de sinalização possivelmente envolvida na ativação endotelial por plasmas de pacientes com dengue. Nós resolvemos investigar que possíveis vias poderiam estar ativadas nas células endoteliais. Já foi demonstrado que o MIF é capaz de aumentar a ativação vias de sinalização das MAPK quinases pelo aumento da fosforilação de ERK 1/2 (ERK 42/44) em células endoteliais na dengue (Lue et al. 2006; Yeh et al. 2013). Nos nossos resultados, as células endoteliais estimuladas com plasmas de pacientes graves foram capazes de induzir um aumento significativo da fosforilação de ERK (P-ERK 42/44) em células endoteliais estimuladas por duas horas em comparação as células endoteliais que foram estimuladas com os plasmas controles. Além disso, o tratamento com o inibidor do MIF (ISO-1), levou à uma diminuição parcial da fosforilação de ERK (P-ERK 42/44) quando comparados aos plasmas tratados com DMSO (veículo). Estes resultados sugerem que a permeabilidade endotelial na dengue, principalmente na dengue grave, pode ser regulada pela via das MAPK quinases.

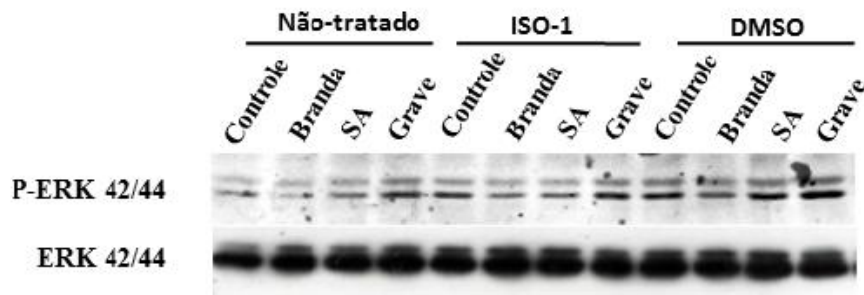


Figura 5. 9: Fosforilação de ERK em células endoteliais estimuladas com plasmas de pacientes infectados pelo DENV. Células HMEC-1 foram estimuladas com plasmas de pacientes com dengue branda, dengue com SA, grave e de voluntários saudáveis (controle) por duas horas. Os mesmos plasmas foram tratados com antagonista do MIF (ISO-1) e DMSO (veículo). A análise de fosforilação de ERK (P-ERK) foi feita por *Western Blotting* e ERK total foi utilizada como controle sendo representativo de dois experimentos independentes.

5.9 O vírus DENV 2 é capaz de aumentar a expressão do receptor de MIF (CD74) em células endoteliais infectadas.

Uma vez que observamos a participação do MIF plasmático na indução de permeabilidade endotelial *in vitro* (Figura 5.7), nós nos questionamos se o vírus dengue poderia interferir indiretamente na permeabilidade através da regulação da expressão do receptor de MIF CD74. Desta maneira nós avaliamos a expressão de CD74 em células endoteliais infectadas pelo vírus DENV em 24h após a infecção. Nós observamos que o vírus DENV é capaz de aumentar a expressão de CD74 em 24h após a infecção em comparação aos controles negativos (célula não estimulada, mock e DENV inativado) e ao controle positivo (LPS). Este resultado sugere que o vírus dengue pode potencializar a ação do MIF pelo aumento da expressão do seu receptor podendo contribuir de maneira significativa para o aumento de permeabilidade vascular associado a dengue.

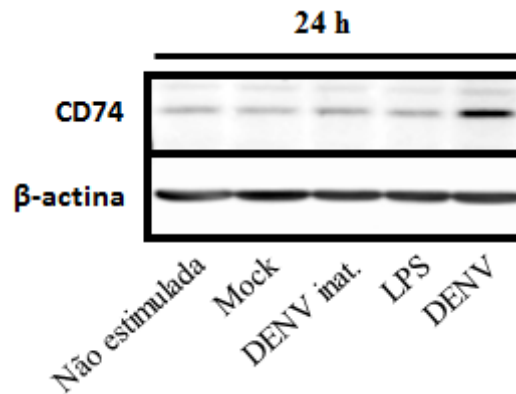


Figura 5. 10 Análise da expressão de CD74 em células endoteliais infectadas pelo vírus DENV *in vitro*. Células endoteliais HMEC-1 foram infectadas com vírus DENV 2 (16881/MOI 2) por 24 horas e a análise da expressão de CD74 foi feita por *Western Blotting*. β-actina foi utilizada como controle de carregamento. Célula não estimulada, mock, e DENV inativado foram utilizados como controle negativo. LPS foi utilizado com controle positivo. *Blotting* representativo de dois experimentos independentes.

5.10 Plaquetas estimuladas com o vírus DENV *in vitro* são capazes de secretar MIF.

Inúmeros estudos vêm demonstrando o importante papel das plaquetas na patogênese da dengue (Jayashree et al. 2011; Hottz et al. 2013a, 2013b; Nascimento et al. 2014; de revisto por Azeredo et al. 2015). As plaquetas são capazes de expressar, estocar e/ou sintetizar e liberar uma variedade de fatores, incluindo citocinas, que podem regular a interação com o endotélio alterando suas funções em condições patológicas. Logo, considerando a associação do MIF com o aumento de permeabilidade, nós analisamos se as plaquetas estimuladas pelo vírus dengue *in vitro* seriam capazes de secretar MIF. Assim, plaquetas de voluntários saudáveis foram incubadas com o vírus DENV (MOI 1) e o sobrenadante recolhido nos tempos de 1,5, 3, 6 e 18 horas após a infecção. Nós observamos um aumento significativo na secreção de MIF em todos os tempos analisados (Figura 5.11). Estes resultados sugerem que as plaquetas estimuladas pelo vírus DENV podem constituir uma possível fonte de MIF, que poderá agir na permeabilidade endotelial.

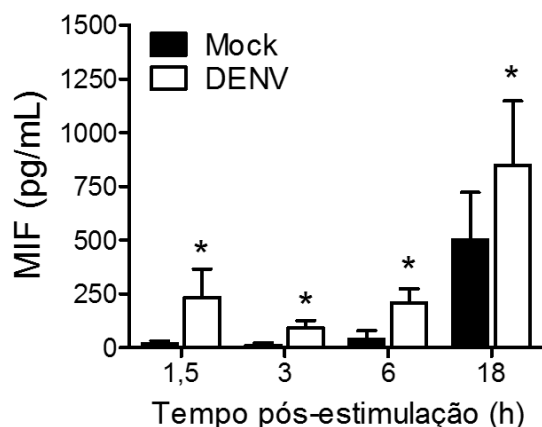


Figura 5. 11 Secreção de MIF por plaquetas estimuladas com o vírus DENV *in vitro*. Plaquetas de voluntários saudáveis foram incubadas com o vírus DENV 2 (cepa 166881/MOI 1) por 1,5, 3, 6, e 18 horas. A secreção de MIF foi mensurada por ELISA. Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos com plaquetas de doadores independentes. * significa $p < 0,05$ plaquetas estimuladas com o DENV vs mock.

5.11 Sobrenadante de plaquetas estimuladas com vírus DENV *in vitro* são capazes de aumentar a permeabilidade de células endoteliais *in vitro* de maneira dependente de MIF.

Dados recentes do nosso grupo demonstraram que a ativação plaquetária em pacientes com dengue pode contribuir para o aumento de permeabilidade vascular (Hottz *et al.*, 2013). Considerando os dados que demonstraram que as plaquetas estimuladas pelo vírus dengue são capazes de secretar MIF, nós resolvemos analisar se o sobrenadante de plaquetas estimuladas seria capaz de aumentar a permeabilidade de células endoteliais *in vitro*. Para isso, estimulamos células endoteliais em sistema de *Transwell* com o sobrenadante de plaquetas estimuladas com DENV-2 *in vitro* (6 horas de infecção) por 2 horas. Nós observamos um aumento significativo da permeabilidade endotelial nas células tratadas com o sobrenadante de plaquetas estimuladas com DENV-2 e com trombina (controle positivo) quando comparado as células não estimuladas. Além disso, quando tratamos os sobrenadantes de plaquetas estimuladas com o DENV com o antagonista do MIF (ISO-1). Estes resultados demonstram que o MIF provenientes das plaquetas estimuladas pode alterar a permeabilidade de células endoteliais *in vitro*.

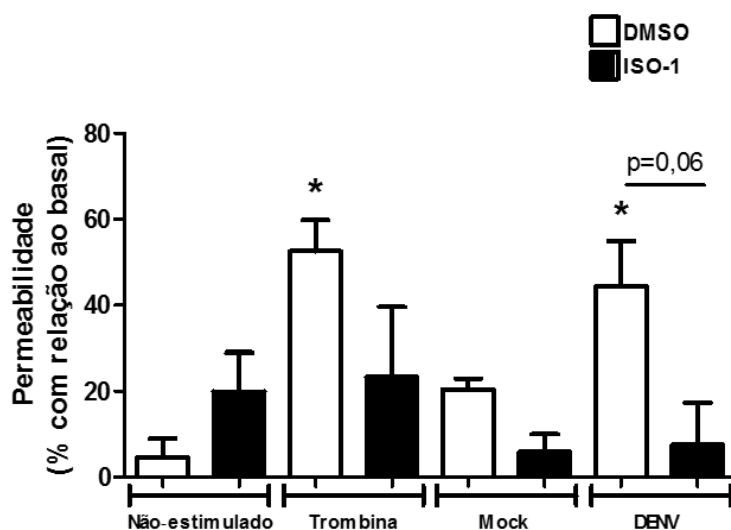


Figura 5. 12: Efeito do sobrenadante de plaquetas estimuladas sobre a permeabilidade endotelial *in vitro*. Células endoteliais forma estimuladas por 2 h com sobrenadantes de plaquetas de voluntários saudáveis incubadas com o vírus DENV 2 (cepa 166881/MOI 1) por 6 horas tratado com ISO-1 (100 μ M) ou DMSO (veículo) por 30min. A permeabilidade foi mensurada pela passagem de albumina conjugada à FITC através da monocamada de células endoteliais. * significa $p < 0,05$ com relação aos sobrenadantes tratados com DMSO.

5.12 Micropartículas proveniente de plaquetas infectadas com vírus DENV *in vitro* são capazes de aumentar a permeabilidade de células endoteliais *in vitro* de maneira dependente de IL-1 β .

Micropartículas (MPs) são pequenos corpos membranares que medem 0.1-1.0 μm que são liberados por células ativadas e sob condição de morte celular e estão associados com diversas patologias, com a manutenção da integridade vascular (Burnier et al. 2009). Plaquetas são capazes de secretar micropartículas sob condições patológicas (Hottz et al. 2013a; Tamir et al. 2016). Já foi observado que micropartículas estão alteradas em plasmas de pacientes dengue grave (Punyadee et al. 2015). Recentes dados do nosso grupo demonstraram que plaquetas provenientes de plasmas de pacientes com dengue são ricas em micropartículas. Além disso, plaquetas ativadas pelo vírus dengue *in vitro* foram capazes de secretar IL-1 β (Hottz et al. 2013a). Assim, examinamos o efeito das MPs contendo IL-1 β sobre a permeabilidade endotelial. Para isso, nós tratamos monocamadas de células endoteliais microvasculares humanas (HMEC-1) com MPs recuperadas de plaquetas expostas ao DENV-2 ou mock e medimos a permeabilidade da monocamada através de um ensaio de *Transwell*. MPs de plaquetas expostas ao DENV-2 promoveram um aumento na permeabilidade das células endoteliais (Figura 1.13) e este aumento na permeabilidade foi bloqueado na presença do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Figura 1.13). Estes resultados sugerem que MPs plaquetárias contendo IL-1 β podem ativar o endotélio resultando em um aumento de permeabilidade endotelial durante a infecção pelo DENV.

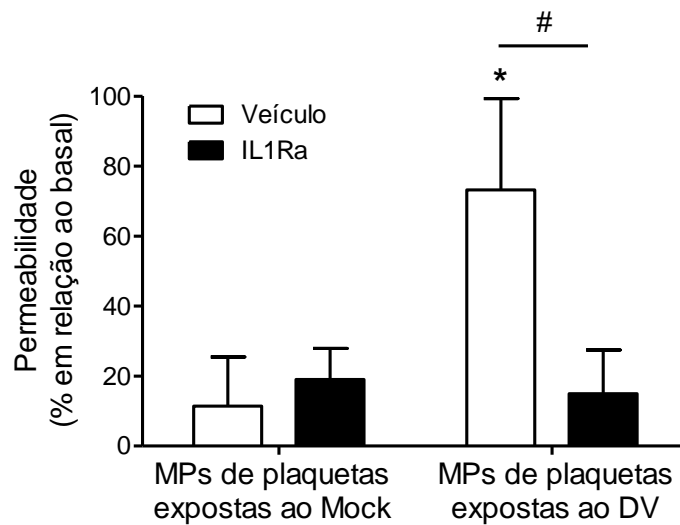


Figura 5. 13 IL-1- β secretados por plaquetas induzem aumento de permeabilidade endotelial in vitro. Células endoteliais foram incubadas com micropartículas recuperadas de plaquetas expostas ao Mock ou ao DENV e a permeabilidade mensurada pela passagem passiva de albumina conjugada à FITC através de monocamada. As células endoteliais foram estimuladas na presença ou ausência do IL-1Ra. Barras representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos com plaquetas de doadores independentes. * significa $p < 0,05$ em relação ao Mock; # indica $p < 0,05$ entre células tratadas com IL-1Ra ou veículo.

6. Discussão

Alterações de permeabilidade vascular e plaquetopenia são manifestações comuns na infecção pelo DENV. Apesar da patogênese da dengue não ser completamente entendida, muitas evidências suportam um papel central das citocinas pró-inflamatórias na evolução para formas mais graves da doença (Anderson et al. 1997; Suharti et al. 2002; Pang et al. 2007; Bozza et al. 2008). Acredita-se que exista uma complexa interação entre o vírus, a resposta imune do hospedeiro e células endoteliais levam a um impacto sobre a integridade da barreira vascular com disfunção endotelial que tem por consequência o intenso extravasamento de plasma. Atualmente, o estudo da participação das células endoteliais tem ganhado importância e o entendimento dos mecanismos envolvidos na ativação destas células podem contribuir significativamente para a compreensão da vasculopatia envolvida na doença (Srikiatkhachorn 2009).

A infecção de células endoteliais pelo vírus dengue tem sido proposto como um dos possíveis fatores que possam contribuir para a gravidade na dengue (Dalrymple and Mackow 2012b). Neste trabalho nós observamos que as células HMEC-1 foram capazes de replicar o vírus DENV-2 *in vitro*, e o mesmo foi capaz de estimular a liberação de mediadores inflamatórios em tais células, contudo, sem alterar diretamente a permeabilidade. Estudos relacionados a permissividade da infecção de células endoteliais pelo vírus DENV *in vitro* são controversos. Por exemplo, já foi observado que células endoteliais replicavam o vírus DENV na mesma cepa utilizada neste estudo (16881) (Raekiansyah et al. 2014), outros demonstram que apenas uma pequena porcentagem de células endoteliais pode ser infectada pelo DENV, mesmo em uma MOI alta (Arévalo et al. 2009). Esta controvérsia pode estar relacionada a diferentes metodologias utilizadas, variação da origem de células endoteliais como também a cepa viral escolhida. Alguns estudos em dengue empregaram a linhagem ECV304 como sendo endotelial (Avirutnan et al. 1998; Bosch et al. 2002; Liew and Chow 2006), sendo esta célula posteriormente identificada como sendo uma linhagem de carcinoma de bexiga (Drexler et al. 2002). Além disso, células endoteliais de diferentes origens teciduais, tais como LSEC-1 (células endoteliais sinusoidais de fígado humano), HBMEC (células endoteliais de cérebro humano) ou HPMEC-AT1.6R (linhagem de

células endoteliais de pulmão humano), que possuem diferentes características respondendo de maneira diferente a infecção pelo vírus dengue (Talavera et al. 2004; Azizan et al. 2006; da Conceição et al. 2013). Contudo, o mecanismo de como células endoteliais infectadas modulam o extravasamento de plasma permanece não esclarecido.

Com relação a indução de permeabilidade induzida diretamente pelo vírus, nós não observamos diferenças significativas. Esses dados são corroborados por trabalhos que demonstram que o vírus DENV diretamente não induz permeabilidade endotelial (Raekiansyah et al. 2014; Calvert et al. 2015). De fato, no curso da infecção pelo DENV, a fase de defervescência, onde observamos as manifestações graves da doença, não coincide com o pico de viremia (fase febril), logo nossos resultados *in vitro* reforçam a ideia de uma participação indireta do DENV da indução de permeabilidade endotelial.

Apesar de o DENV não induzir diretamente a permeabilidade endotelial, nós encontramos níveis elevados de IL-6 e IL-8/CXCL-8 nas células endoteliais infectadas pelo DENV. Já foi demonstrado que células endoteliais infectadas pelo DENV são capazes de produzir e liberar citocinas e quimiocinas tais como IL-6, IL-8/CXCL-8 e RANTES/CCL5, dentre outras (Bunyaratvej et al. 1997; Huang et al. 2000; Bosch et al. 2002). Estes dados demonstram que o vírus pode ativar células endoteliais, sem necessariamente induzir permeabilidade.

Neste estudo, buscamos identificar fatores presentes nos plasmas pacientes infectados com o DENV que possam estar associados com a permeabilidade endotelial. Nossos resultados demonstraram que plasmas de pacientes com dengue são capazes de aumentar a permeabilidade endotelial *in vitro*, e diferenças significativas foram observadas na permeabilidade das células tratadas com plasmas de pacientes graves na fase de defervescência. Estes dados são corroborados pelos trabalhos que demonstram que é na fase crítica (defervescência), principalmente de pacientes que desenvolveram dengue grave, onde ocorrem os maiores eventos de aumento de permeabilidade endotelial, com extravasamento de plasma sanguíneo, hemorragia e comprometimento dos órgãos (World Health Organization 2009; Whitehorn and Simmons 2011; Johnson and Roller 2015). Logo, a partir destes resultados, foi possível buscar fatores nos

plasmas de pacientes com dengue que pudessem estar associados com esse aumento de permeabilidade.

Durante este estudo, um aumento de vários mediadores inflamatórios foi encontrado nos plasmas de pacientes com dengue, sugerindo uma regulação complexa na patogênese desta doença. Nós encontramos maiores níveis circulantes de TNF- α , IL-8/ CXCL-8, MCP-1/CCL-2, IFN γ , IL-6 e VEGF em pacientes com dengue, contudo, tais mediadores não parecem estar associados à gravidade da doença. Existe muita controvérsia na literatura com relação a associação destes mediadores com a gravidade na dengue (Srikiatkachorn and Green 2010; John et al. 2015). Para o TNF- α , nossos dados estão de acordo com outros trabalhos que apresentaram elevados níveis desta citocina em soro de pacientes infectados, indicando que a mesma pode ter uma participação importante na dengue, mas sem associação com a gravidade na dengue (Azeredo et al. 2001; Braga et al. 2001; Bozza et al. 2008; Levy et al. 2010; Arias et al. 2014; Mangione et al. 2014). Entretanto, níveis de TNF- α já foram relacionados com manifestações hemorrágicas na dengue, inclusive em modelos experimentais (Gagnon et al. 2002; Chen et al. 2007). Esta contraditoriedade pode ser atribuída a diferenças entre as coortes estudadas, assim como nos polimorfismos de alelos de TNF- α (Chuansumrit et al. 2013).

Com relação ao MCP-1/CCL-2, Lee e colaboradores demonstraram que esta quimiocina está em níveis elevados em plasmas de pacientes com FHD e SCD (Lee et al. 2006). Além disso, estudos *in vitro* utilizando a proteína recombinante desta quimiocina demonstrou que a mesma foi capaz de alterar a permeabilidade de células endoteliais primárias (HUVECs) (Lee et al. 2006). Apesar de não encontrarmos diferenças significativas desta quimiocina entre os diferentes grupos de pacientes com dengue, porém, nossos dados demonstram uma tendência para um aumento nos pacientes dengue com sinais de alarme e grave. No entanto, será necessário um maior número maior de amostras para a confirmação desta tendência. O mesmo perfil parece se encaixar nas quantificações de IL-6 e VEGF, já que dados suportam que ambas estão associadas a gravidade na dengue (Suharti et al. 2003; Tseng et al. 2005; Srikiatkachorn et al. 2007)

Dados já publicados indicam que os níveis circulantes de IL-8/CXCL-8 e IFN- γ estão aumentados em plasma de pacientes com dengue com relação aos plasmas de

voluntários saudáveis, contudo sem diferenças significativas entre os plasmas de diferentes manifestações clínicas da doença (Azeredo et al. 2001; Braga et al. 2001; Mangione et al. 2014). Logo, corroboram-se com os nossos resultados onde não observamos correlação destes mediadores com a gravidade da infecção pelo vírus dengue.

De maneira interessante, nossos dados mostram que os mediadores RANTES/CCL-5 e IL-1 β , apresentaram níveis significativamente maiores em plasmas de pacientes que apresentaram dengue com sinais de alarme e grave, com relação aos plasmas de voluntários saudáveis, enfatizando dados já existentes que indicam a participação destas citocinas como possíveis marcadores na dengue grave (Chen *et al.*, 2006; Suharti *et al.*, 2003; Bozza *et al.*, 2008).

Para o RANTES/CCL-5 pouco se sabe sobre a relação desta quimiocina na gravidade da dengue. A mesma está principalmente relacionada com o recrutamento de várias células do sistema imunológico para o sítio da infecção (Lin et al. 2000) e já foi demonstrado que pacientes com dengue possuem níveis elevados de RANTES, mas sem relação com a gravidade na dengue (Lin et al. 2000; Appanna et al. 2012). Sabemos que RANTES/CCL-5 é uma das principais citocinas liberadas por α -grânulos plaquetários ativados. De fato, dados do nosso grupo já demonstraram que plaquetas ativadas pelo vírus DENV *in vitro* foram capazes de liberar quantidade significativas desta quimiocina (Hottz et al. 2013a), contudo permanecerá sob investigação o papel desta quimiocina na regulação da permeabilidade endotelial na dengue.

De maneira interessante, com relação ao MIF, nossos dados demonstram níveis elevados desta citocina em plasmas de pacientes com dengue SA/grave quando comparados tanto aos plasmas de pacientes dengue branda, quanto aos plasmas de voluntários saudáveis. Estes dados sugerem que o MIF pode ser uma citocina marcadora de gravidade na dengue. O MIF é uma citocina pleiotrópica envolvida em diversos aspectos inflamatórios e de respostas imunes, participando da patogênese de doenças autoimunes, alérgicas e infecciosas (Lue et al. 2002; Cvetkovic and Stosic-Grujicic 2006; Han et al. 2010; Asare et al. 2013). Em doenças infecciosas que também estão associadas com um intenso aumento de permeabilidade endotelial, tal como sepsis, o MIF apresentou níveis elevados com diferenças significantes entre os que evoluíram a melhora clínica e ao óbito (Bozza et al. 2004). Na dengue, níveis elevados de MIF já

foram identificados em pacientes dengue grave, com níveis ainda maiores em pacientes que evoluíram para o óbito (Chen et al. 2006; Antonio et al. 2015). Dados do nosso grupo demonstraram que em modelos experimentais deficientes para o MIF (*MIF*^{-/-}) infectados com o vírus DENV adaptado, ocorreu uma diminuição e/ou retardo na letalidade induzida pela infecção, assim como diminuição da viremia e replicação viral, evidenciando a importância do MIF na patogênese da dengue (Assunção-Miranda et al. 2010).

Nós observamos ainda que a indução de permeabilidade endotelial *in vitro* induzida por plasmas de pacientes com dengue foi consideravelmente dependente da citocina MIF, já que observamos uma reversão significativa desta permeabilidade quando na presença do inibidor do MIF, ISO-1. Em estudos de Chuang e colaboradores, foi demonstrado que o sobrenadante de células de linhagem de hepatocarcinoma humano 7 (HUH-7) infectadas pelo vírus DENV, ricas em MIF, eram capazes de induzir um aumento de permeabilidade de células endoteliais HMEC-1 (mesma linhagem de células endoteliais apresentadas neste estudo), assim como quando as mesmas células foram tratadas com o MIF recombinante humano (rMIF). Além disso, foi observado que o rMIF seria capaz de desarranjar moléculas de adesão do tipo ZO-1 (zônulas de oclusão-1) *in vitro* e *in vivo*, o que poderia contribuir para o aumento de permeabilidade associada ao MIF. Por fim, este desarranjo foi revertido pela presença do inibidor ISO-1 que bloqueia a atividade tautomerase do MIF e consequente pró-inflamatória e que tal ativação parece ser dependente das vias PI3K/MEK–ERK/JNK (Chuang *et al.*, 2001). Outros trabalhos demonstram que o MIF é capaz de interferir na expressão de ZO-1 e da VE-caderina (Chen et al. 2015). Estes trabalhos corroboram fortemente nossos dados da importante participação do MIF na ativação/disfunção endotelial que contribui para o aumento de permeabilidade endotelial associada à dengue.

De maneira complementar, nós observamos que plasmas de pacientes com dengue grave são capazes de ativar a via de MAP quinases através do aumento da fosforilação de ERK, e isto parece ser dependente do MIF. A ativação da via de ERK MAPK pode levar a fosforilação e ativação e inúmeras proteínas citosólicas que podem culminar na regulação da produção de mediadores inflamatórios, expressão de moléculas e fatores transcricionais, mediando importantes respostas inflamatórias (Seger and Krebs 1995). Estudos suportam a evidência de que o MIF é capaz de ativar a via de ERK MAPK de maneira sustentada (Mitchell et al. 1999) e transiente (Lue et al.

2006). Contudo, de que maneira o MIF, através da ativação da via ERK MAPK, consegue regular a permeabilidade de células endoteliais durante a infecção pelo vírus ainda permanece por ser esclarecido. Neste sentido, Chen e colaboradores (2015) demonstrou que o MIF foi capaz de regular a indução de extravasamento vascular via autofagia (Chen et al. 2015). Além disso, Yeh e colaboradores (2013), observaram que MIF recombinante é capaz aumentar a expressão de trombosmodulina (TM) e moléculas de adesão (ICAM-1) em monócitos e células endoteliais primárias e de linhagem (HMEC-1 e HUVEC) através da ativação da via ERK MAPK, o que poderia contribuir para o dano endotelial observado na dengue (Yeh et al. 2013). Estes dados ajudam-nos a especular os possíveis meios pelos quais os altos níveis de MIF observamos plasmas de pacientes dengue grave deste estudo, pode agir no aumento da permeabilidade de células endoteliais observado.

Além disso, dados suportam que a ativação da via de ERK MAPK desencadeada pelo MIF depende necessariamente da ligação aos seu principal receptor CD74 (Leng et al. 2003; Yu et al. 2007), como também da ativação do co-receptor CD44 (Veillat et al. 2010; Shi et al. 2013). O CD74 (cadeia invariante, li) é uma glicoproteína transmembranar não-polimórfica que pode existir em diferentes isoformas e possui a função de regular o tráfego de proteínas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) em células apresentadoras de antígenos (Leng et al. 2003; Le Hiress et al. 2015). Entretanto, em condições inflamatórias, assim como em diversas linhagens tumorais, o aumento da expressão de CD74 aparece, mesmo na ausência do MHC II e tem sido reconhecido como um receptor de alta afinidade do MIF (Leng et al. 2003; Asare et al. 2013; Le Hiress et al. 2015). Nossos resultados demonstram que a infecção de células endoteliais pelo vírus dengue *in vitro* foi capaz de aumentar a expressão da molécula de CD74, mesmo na ausência de alteração direta de permeabilidade indo de acordo com dados já descritos que célula endoteliais são capazes de expressar o CD74 sob condições inflamatórias (Le Hiress et al. 2015). Nossos resultados sugerem que mesmo o vírus não induzindo diretamente a permeabilidade endotelial, o mesmo pode potencializar a ação do MIF pelo aumento da expressão de CD74 nas células endoteliais, contribuindo de maneira significativa para o aumento da permeabilidade vascular observada na dengue grave. Ainda assim, estudos são necessários para avaliar se células endoteliais infectadas de fato tem sua permeabilidade alterada frente a estimulação por plasmas de pacientes com dengue. Pretendemos ainda verificar a

ativação do co-receptor CD44 em células endoteliais infectadas a fim de confirmar a ativação da via ERK MAPK nestas células.

Altos níveis circulantes de IL-1 β circulantes tem sido identificado em pacientes com infecções bacterianas agudas (Puhmann et al. 2005). Na dengue, elevados níveis de IL-1 β em plasmas de pacientes infectados são encontrados, indo de acordo com os dados apresentados neste estudo (Bozza et al. 2008; Hottz et al. 2013a). A IL-1 β também parece desempenhar um papel importante também na indução de permeabilidade endotelial *in vitro*, visto que nossos resultados demonstram uma reversão da mesma quando utilizamos o antagonista do receptor IL1-Ra. Puhmann e colaboradores demonstraram que a IL-1 β é capaz de induzir o aumento de permeabilidade em células endoteliais *in vitro*, corroborando nossos dados. A IL-1 β , é uma citocina pró- inflamatória que está envolvida em diferentes condições inflamatórias crônicas e agudas (Puhmann et al. 2005; Schett et al. 2015). A mesma pertence a família de 11 membros de citocinas IL-1 incluindo a IL-1 α , IL-1 β e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) podendo ser secretada por vários tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos e fibroblastos (Schett et al. 2015). A mesma se liga ao receptor de IL-1 (IL-1R1) nas células alvos e é capaz de induzir a ativação celular e estimulando vias de sinalização intracelular (Schett et al. 2015). London e colaboradores (2010) demonstraram que a IL-1 β é capaz de desestabilizar a barreira vascular pela diminuição da expressão de VE-caderina (London et al. 2010). Além disso, o mesmo grupo demonstrou que essa disruptura do endotélio é dependente da ativação da via MYD88-ARNO-ARF6 (Zhu et al. 2013), mas trabalhos recentes já relacionaram a ativação da via de ERK/MAPK induzida por IL-1 β (Xue et al. 2015; Chang et al. 2016). Apesar da participação da IL-1 β , não podemos descartar o efeito de outros membros da família de IL-1 na permeabilidade endotelial induzida pelos plasmas de pacientes com dengue, já que a inibição com IL1-Ra não é específica para IL-1 β . De fato, já foi observado que a IL-1 α pode levar ao aumento de permeabilidade endotelial (Royall et al. 1989).

Um aspecto importante pouco compreendido até o momento é a interação das plaquetas com o endotélio no curso da infecção pelo dengue. A ativação plaquetária pode ocorrer em resposta aos vários estímulos. Sabemos que plaquetas são capazes de expressar, estocar, e/ou sintetizar e rapidamente liberar vários fatores, incluindo citocinas, que regulam a interação com o endotélio podendo alterar suas funções em

condições patológicas. Já foi observado por Krishnamurti e colaboradores (2002) que células endoteliais infectadas pelo vírus DENV 2 são capazes de aumentar a adesão de plaquetas em sua superfície o que poderia contribuir com a trombocitopenia associada à dengue (Krishnamurti et al. 2002). Além disso, a ativação plaquetária com disfunção de suas funções são maiores em pacientes dengue grave, podendo estar associado com uma disfunção endotelial e consequente extravasamento de plasma (Michels *et al.*, 2014; Hottz *et al.*, 2013).

Neste trabalho nós demonstramos que as plaquetas estimuladas com o vírus dengue *in vitro* são capazes de secretar MIF e o mesmo é capaz de aumentar a permeabilidade endotelial *in vitro*. Estudos já demonstraram que plaquetas são capazes de secretar MIF e que o mesmo parece contribuir para o aumento da adesão de monócitos à células endoteliais (Strüßmann et al. 2013; Wirtz et al. 2015). Ainda permanece por ser elucidado como o MIF provenientes das plaquetas pode contribuir para o aumento da permeabilidade endotelial na dengue, visto o importante papel desempenhado por esta citocina na vasculopatia associada à dengue.

A ativação pode levar à alterações na forma das plaquetas através de uma remodelação do citoesqueleto, e promover a ruptura da membrana plaquetária em fragmentos ativos, tais fragmentos de membrana podem dar origem as micropartículas, que variam de 100 a 1000 nm de diâmetro (Shai et al. 2012). As micropartículas derivadas de plaquetas constituem a maior parte das micropartículas (MPs) que circulam no sangue de indivíduos saudáveis (Diamant et al. 2004). Os níveis de MPs podem aumentar dramaticamente em condições patológicas tais como a trombose, inflamação, câncer e dengue (Matzdorff et al. 2000; Tseng et al. 2013; Punyadee et al. 2015).

Micropartículas derivadas de plaquetas tem sido descrita modulando respostas de células endoteliais, pela liberação de citocinas armazenadas. Em dados publicados pelo nosso grupo, foi observado que tanto plaquetas de pacientes com dengue, quanto plaquetas expostas ao vírus DENV *in vitro* são capazes de secretar IL-1 β (Hottz et al. 2013a). Nós observamos que as micropartículas recuperadas de plaquetas expostas ao vírus DENV são capazes de aumentar a permeabilidade de células endoteliais de maneira dependente de IL-1 β , dados publicados pelo nosso grupo (Hottz et al. 2013a). Brown e McIntyre já demonstraram que a citocina IL-1 β está associada com

micropartículas derivadas de plaquetas estimuladas com LPS e que tais micropartículas induzem a expressão de molécula-I de adesão em células endoteliais de maneira dependentes do receptor de IL-1R (Brown and McIntyre 2011). Micropartículas derivadas de monócitos contendo IL-1 β também tem sido mostrada ativando células endoteliais humanas de modo dependente de seu receptor (Wang et al. 2012). Acreditamos que as plaquetas possuem uma função importante da ativação do endotélio na dengue, contudo os mecanismos de interação plaqueta/endotélio ainda permanecerão por serem investigados pelo nosso grupo.

De acordo com os resultados obtidos, evidenciamos que a regulação de permeabilidade na dengue grave é um evento dependente de múltiplos fatores. Nós observamos que as citocinas/quimiocinas desempenham um papel importante nesta regulação, principalmente no que se refere ao MIF e a IL-1 β . Contudo, como essas moléculas agem de maneira a regular a permeabilidade permanecem por serem esclarecidos, mas sugerimos que a via ERK MAPK pode estar envolvida neste processo. Além disso, acreditamos que a participação do vírus na indução de permeabilidade ocorre de maneira indireta através do aumento da expressão de receptores tais como CD74. Por fim, acreditamos que as plaquetas ativadas pelo vírus dengue contribuem para o aumento da permeabilidade in vitro pela produção de MIF e IL-1 β . Este estudo então pretende contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia vascular na dengue.

7. Conclusões

- ✓ Células endoteliais (HMEC-1) são permissivas à infecção pelo vírus DENV 2 (cepa 16881) *in vitro* e capazes de produzir partículas virais infecciosas;
- ✓ O vírus DENV 2 (cepa 16881) parece não induzir diretamente o aumento de permeabilidade de células endoteliais (HMEC-1) *in vitro*, mas é capaz de induzir a produção de mediadores inflamatórios como IL-6 e IL-8;
- ✓ Plasmas de pacientes com dengue apresentando diferentes manifestações clínicas da doença são capazes de induzir precocemente aumento de permeabilidade endotelial *in vitro*;
- ✓ A adição de plasmas de pacientes que apresentaram dengue grave na fase de defervescência levou a uma maior permeabilidade de células endoteliais *in vitro*, indicando que mediadores presentes na circulação destes pacientes poderiam contribuir ao dano e/ou permeabilidade endotelial observada durante a infecção pelo DENV;
- ✓ Níveis circulantes elevados de TNF- α , IL-8/CXCL-8, MCP-1/CCL-2, INF- γ , IL-6, VEGF, RANTES/CCL-5, IL-1 β , e MIF foram observados nos grupos de pacientes infectados pelo DENV em relação aos indivíduos saudáveis confirmando o envolvimento destas proteínas durante a infecção;
- ✓ Os níveis circulantes de MIF foram relacionados a gravidade sendo, portanto, indicado como um possível marcador de prognóstico na dengue. Além disso, o aumento de permeabilidade das células endoteliais *in vitro* parecer ser dependente de MIF e IL-1 β ;

- ✓ Células endoteliais estimuladas com plasmas de pacientes dengue grave apresentam uma maior fosforilação de ERK 42/44, e a mesma parece ser dependente de MIF;
- ✓ O vírus DENV 2 (cepa 16881) é capaz de aumentar a expressão do receptor do MIF (CD74) em células endoteliais infectadas;
- ✓ Sobrenadantes de plaquetas infectadas pelo vírus dengue *in vitro* são capazes de secretar MIF e IL-1 β e induzir aumento de permeabilidade de células endoteliais *in vitro* de maneira dependente destes fatores.

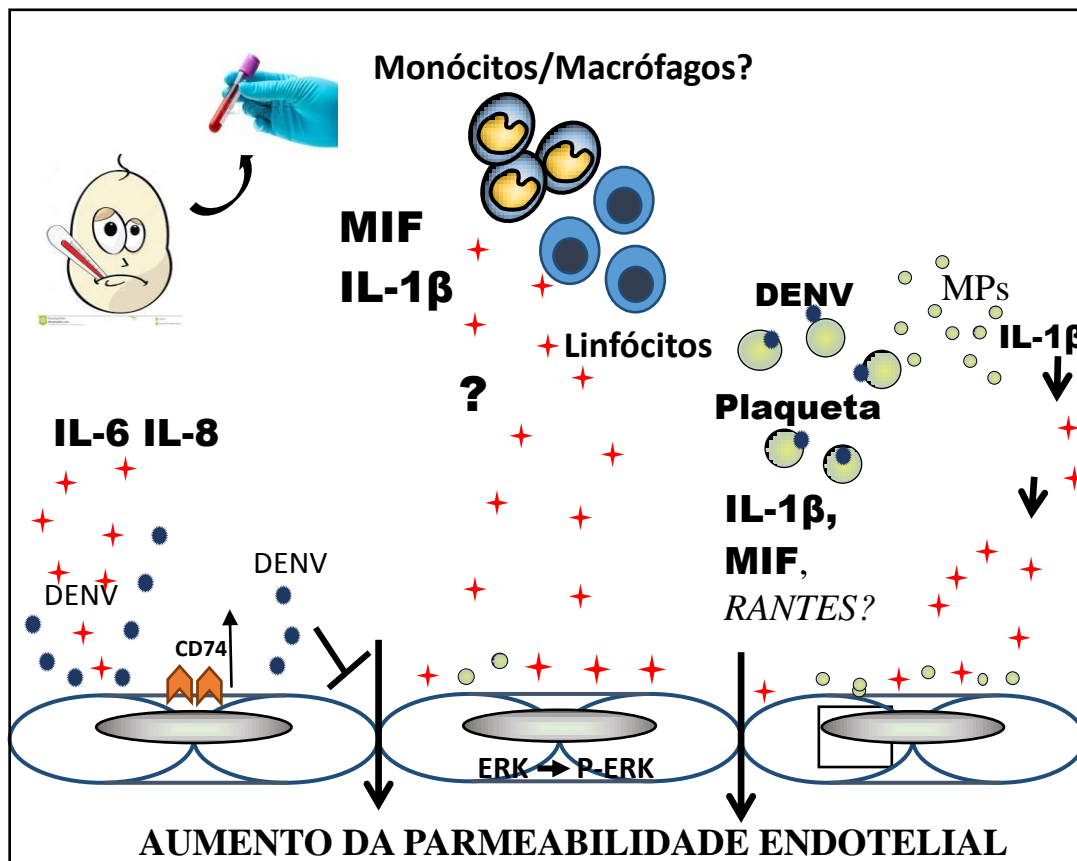


Figura 6. 1: Representação Esquemática de possíveis fatores envolvidos no aumento de permeabilidade na Dengue. Nossos dados sugerem que o vírus DENV é capaz de infectar células endoteliais, produzir mediadores inflamatórios (IL-6 e IL-8) e influenciar na permeabilidade endotelial de maneira indireta, pelo aumento da expressão de CD74 na superfície dessas células. Desta maneira, o vírus seria capaz de potencializar a ação do MIF. O mesmo, junto com a IL-1 β está presente em concentrações elevadas em plasmas de pacientes com dengue, e o aumento de permeabilidade endotelial parece ser consideravelmente dependente da ação destes mediadores. Acreditamos que o MIF e a IL-1 β possam ter suas origens em macrófagos/monócitos e Linfócitos T infectados pelo vírus, contudo parece que as plaquetas constituem uma fonte importantes destas citocinas que são capazes de aumentar a permeabilidade endotelial.

8. Bibliografia

- Achee NL, Gould F, Perkins TA, Reiner RC, Morrison AC, Ritchie S a, et al. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015;9(5):e0003655. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25951103>
- Anderson R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:229–74.
- Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz a C. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol.* 1997;71(6):4226–32.
- Antonio R, Ferreira X, Artimos S, Oliveira D, Gandini M, Ferreira C, et al. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. 2015;1–10.
- Appanna R, Wang SM, Ponnampalavanar S a., Lum LCS, Sekaran SD. Cytokine factors present in dengue patient sera induces alterations of junctional proteins in human endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(171):936–42.
- Arévalo MT, Simpson-Haidaris PJ, Kou Z, Schlesinger JJ, Jin X. Primary human endothelial cells support direct but not antibody-dependent enhancement of dengue viral infection. *J Med Virol* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 May 16];81(3):519–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19152413>
- Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E, Larreal Y, et al. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology* [Internet]. Elsevier; 2014;452-453:42–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.027>

- Asare Y, Schmitt M, Bernhagen J. The vascular biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Thromb Haemost* [Internet]. 2013;109(3):391–8. Available from: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH12-11-0831>
- Assunção-Miranda I, Amaral F a, Bozza F a, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J* [Internet]. 2010;24(1):218–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776337>
- 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;161:6338–46.
- Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis*. 2006;193(8):1078–88.
- Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog*. 2007;3(11):1798–812.
- de Azeredo EL, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM. Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015;2015:313842. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4427128&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Azeredo EL, Zagne SM, Santiago M a, Gouvea a S, Santana a a, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* [Internet]. 2001;204(4):494–507. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11776403>
- Azevedo R do S da S, Oliveira CS, Vasconcelos PF da C. Chikungunya risk for Brazil. *Rev saúde pública* [Internet]. 2015;49:58. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4617438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Azizan A, Sweat J, Espino C, Gemmer J, Stark L, Kazanis D. Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus. *J Virol Methods* [Internet]. 2006;138(1-2):211–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093406003016>
- Azzi S, Hebda JK, Gavard J. Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Front Oncol* [Internet]. 2013;3(August):211. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3744053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol*. 2013;3:1–21.
- Balmaseda A, Hammond SN, Pérez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, et al. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2005 Dec [cited

- 2016 May 14];73(6):1059–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354812>
- Bandyopadhyay S, Lum LCS, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health* [Internet]. 2006 Aug [cited 2016 May 14];11(8):1238–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903887>
- Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* 2008;3(2):155–65.
- Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat.* 2002;200:581–97.
- Beatty PR, Puerta-guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med.* 2015;7(304).
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;496(7446):504–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12060>
- Bonner SM, O’Sullivan M a. Endothelial cell monolayers as a model system to investigate dengue shock syndrome. *J Virol Methods.* 1998;71(2):159–67.
- Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu S-J, Sun P, et al. Role of Dendritic Cells in Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *J Virol* [Internet]. 2008;82(8):3939–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2292981&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke R V, et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol* [Internet]. 2002;76(11):5588–97. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/content/full/76/11/5588?view=long&pmid=11991987>
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SMO, Azeredo EL, Nogueira R, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients : MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. 2008;11:1–11.
- Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignácio 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(February):229–32.
- Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide Signaling Without a Nucleus: Kinase Cascades Stimulate Platelet Shedding of Proinflammatory IL-1 β Rich Microparticles. 2011;186(9):5489–96.
- Bunyaratvej A, Butthep P, Yoksan S, Bhamarapavati N. Dengue viruses induce cell proliferation and morphological changes of endothelial cells. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* [Internet]. 1997 Jan [cited 2016 May 3];28 Suppl 3:32–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9640597>
- Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Anne AS. Cell-derived microparticles in haemostasis

- and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 2009;101(3):439–51.
- Butthep P, Chunchakan S, Tangnararatchakit K, Yoksan S, Pattanapanyasat K, Chuansumrit A. Elevated soluble thrombomodulin in the febrile stage related to patients at risk for dengue shock syndrome. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(10):894–7.
- Butthep P, Chunchakan S, Yoksan S, Tangnararatchakit K, Chuansumrit A. Alteration of Cytokines and Chemokines during Febrile Episodes Associated with Endothelial Cell Damage and Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(12):1.
- Calvert JK, Helbig KJ, Dimasi D, Cockshell M, Beard MR, Pitson SM, et al. Dengue Virus Infection of Primary Endothelial Cells Induces Innate Immune Responses, Changes in Endothelial Cells Function and Is Restricted by Interferon-Stimulated Responses. *J Interf Cytokine Res [Internet].* 2015;35(8):654–65. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2014.0195>
- Cardier JE, Mariño E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF- α in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine [Internet].* 2005;30(6):359–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935956>
- Cardier JE, Rivas B, Romano E, Rothman AL, Perez-Perez C, Ochoa M, et al. Evidence of Vascular Damage in Dengue Disease: Demonstration of High Levels of Soluble Cell Adhesion Molecules and Circulating Endothelial Cells. *Endothelium [Internet].* 2006;13(5):335–40. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10623320600972135>
- Carr JM, Hocking H, Bunting K, Wright PJ, Davidson A, Gamble J, et al. Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. *J Med Virol [Internet].* 2003;69(4):521–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12601760>
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. *Rev Microbiol.* 1990;44:649–88.
- Chambers TM, Monath TP. *The Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution.* 2003. p. 64–5.
- Chan KWK, Watanabe S, Kavishna R, Alonso S, Vasudevan SG. Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. *Antiviral Res [Internet].* Elsevier B.V.; 2015;123:5–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.08.013>
- Chang M-C, Tsai Y-L, Chang H-H, Lee S-Y, Lee M-S, Chang C-W, et al. IL-1 β -induced MCP-1 expression and secretion of human dental pulp cells is related to TAK1, MEK/ERK, and PI3K/Akt signaling pathways. *Arch Oral Biol [Internet].* Elsevier Ltd; 2016;61:16–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000399691530056X>
- 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(2):365–75.
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2006 Jul [cited 2016 Apr 1];47(2):155–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831202>
- Chen H-C, Hofman FM, Kung JT, Lin Y-D, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol* [Internet]. 2007;81(11):5518–26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1900309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chen H-R, Chuang Y-C, Chao C-H, Yeh T-M. Macrophage migration inhibitory factor induces vascular leakage via autophagy. *Biol Open* [Internet]. 2015;4(2):244–52. Available from: <http://bio.biologists.org/content/early/2015/01/16/bio.201410322.abstract>
- Chen L-C, Lei H-Y, Liu C-C, Shiesh S-C, Chen S-H, Liu H-S, 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.
- Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol*. 1999;73(4):2650–7.
- Chuang Y, Chen H, Yeh T. Pathogenic Roles of Macrophage Migration Inhibitory Factor during Dengue Virus Infection. 2015;2015.
- Chuansumrit A, Anantasit N, Sasanakul W, Chaiyaratana W, Tangnararatchakit K, Butthep P, et al. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. *Paediatr Int Child Health* [Internet]. 2013;33:97–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23925283>
- Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 2006;80(23):11418–31.
- Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2016 Apr 1];79(2):853–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=538581&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- da Conceição TM, Rust NM, Berbel ACER, Martins NB, do Nascimento Santos CA, Da Poian AT, et al. Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. *Virology* [Internet]. 2013;435(2):281–92. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682212004904>
- Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9815–20.
- Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição T, M. S, Higa LM, Castanho MARB, et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol*

Rev. 2015;39(2):155–70.

- Cvetkovic I, Stosic-Grujicic S. Neutralization of macrophage migration inhibitory factor-novel approach for the treatment of immunoinflammatory disorders. *Int Immunopharmacol*. 2006;6:1527–34.
- Dalrymple N a, Mackow ER. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Adv Virol* [Internet]. 2012a;2012:840654. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3431041&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dalrymple NA, Mackow ER. Roles for Endothelial Cells in Dengue Virus Infection. *Adv Virol* [Internet]. 2012b;2012:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/av/2012/840654/>
- 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* (London, England) [Internet]. 2006 Jul 8 [cited 2016 Apr 8];368(9530):170–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829301>
- Dejana E, Vestweber D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control [Internet]. Vol. 116, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00006-6>
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Europe PMC Funders Group Enhancing cross-reactive anti-prM dominates the human antibody response in dengue infection. 2013;328(5979):1–12.
- Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods* [Internet]. 2004;121(2):171–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093404001879>
- Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with downregulation of vascular endothelial cadherin. *J Gen Virol* [Internet]. 2008;89(Pt 3):642–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272754>
- Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: New players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004;34(6):392–401.
- Drexler HG, Quentmeier H, Dirks WG, MacLeod RAF. Bladder carcinoma cell line ECV304 is not a model system for endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* [Internet]. 2002 Apr [cited 2016 May 16];38(4):185–6; author reply 187. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12197766>
- Ferreira RAX, de Oliveira SA, Gandini M, Ferreira L da C, Correa G, Abiraude FM, et al. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. *Acta Trop* [Internet]. 2015;149:138–47. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15001205>
- Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al.

- Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*. 2006;12(2):235–9.
- Furuya-Kanamori L, Liang S, Milinovich G, Soares Magalhaes RJ, Clements ACA, Hu W, et al. Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. *BMC Infect Dis [Internet]*. *BMC Infectious Diseases*; 2016;16(1):84. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/16/84>
- Gagnon SJ, Mori M, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. *J Med Virol*. 2002;67(1):41–6.
- Gavard J. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett [Internet]*. 2009;583(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.032>
- Giraldo L, Augusto S, Gurgel AM, Costa AM, Diderichsen F, Lacaz FA, et al. *Aedes aegypti* control in Brazil. 2016;2–3.
- Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai C-J. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(22):9422–7.
- Gould E, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 2008;371(9611):500–9.
- Gubler D, Clark G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem Dengue. *Emerg Infect Dis [Internet]*. 1995;30(4):339–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dengue/dengue+hemorrhagic+fever:+the+emergence+of+a+global+health+problem>
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998a;11(3):480–96.
- Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1998b;4(3):442–50.
- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002;10(2):100–3.
- Guzman A, Istúriz RE. Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents [Internet]*. Elsevier B.V.; 2010;36(SUPPL. 1):S40–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018>
- Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet [Internet]*. 2015;385(9966):453–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614605729>
- Guzmán MG, Kourí G. Dengue: An update. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(1):33–42.
- Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*. 2010;2(12):2649–62.
- Halstead SB. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis*. 1979;140(4):527–33.
- Halstead SB. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. 1988;239(1893).
- Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica*. 2006;20(6):407–15.

- Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370(9599):1644–52.
- Halstead SB. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectr*. 2014;2(6):1–18.
- Halstead SB. Pathogenesis of Dengue: Dawn of a New Era. *F1000Research* [Internet]. 2015;4(0):1–8. Available from: <http://f1000research.com/articles/4-1353/v1>
- Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* [Internet]. 1977;146(1):201–17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2180729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Halstead SB, Russell PK. Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;2–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16001304>
- Halstead SB, Udomsakdi S, Singharaj P, Nisalak A. Dengue chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. 3. Clinical, epidemiologic, and virologic observations on disease in non-indigenous white persons. *Am J Trop Med Hyg*. 1969;18(6):984–96.
- Han C, Lin Y, Shan G, Zhang Z, Sun X, Wang Z, et al. Plasma concentration of malaria parasite-derived macrophage migration inhibitory factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(10):1524–32.
- Harris AF, Nimmo D, McKemey AR, Kelly N, Scaife S, Donnelly C a, et al. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;29(11):1034–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2019>
- Henchal E a, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1990;3(4):376–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;137(2):266–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.10.007>
- Heukelbach J, Alencar CH, Kelvin AA, De Oliveira WK, Pamplona de Goes Cavalcanti L. Zika virus outbreak in Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(2):116–20.
- Hidari KIPJ, Suzuki T. Dengue virus receptor. *Trop Med Health*. 2011;39(4SUPPLEMENT):S37–43.
- Le Hiress M, Tu L, Ricard N, Phan C, Thuillet R, Fadel E, et al. Pro-inflammatory Signature of the Dysfunctional Endothelium in Pulmonary Hypertension: Role of MIF/CD74 Complex. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;1–54.
- 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* [Internet]. 1993 Mar

- [cited 2016 May 15];48(3):324–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8470771>
- Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* [Internet]. 2013a;122(20):3405–14. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-05-504449>
- Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, 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.* 2013b;11(5):951–62.
- 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;63:71–5.
- Iyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med J* [Internet]. 1995 Apr [cited 2016 May 15];36(2):218–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7676273>
- Jayashree K, Manasa GC, Pallavi P, Manjunath G V. Evaluation of platelets as predictive parameters in dengue fever. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2011;27(3):127–30.
- 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.
- Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol.* 2004;149(5):915–27.
- John DV, Lin Y-S, Perng GC. Biomarkers of severe dengue disease – a review. *J Biomed Sci* [Internet]. *Journal of Biomedical Science*; 2015;22(1):83. Available from: <http://www.jbiomedsci.com/content/22/1/83>
- Johnson B, Roller P. *Current Concepts Dengue.* 2015;845–53.
- Jorge Reyes-del Valle, Salvador Chavez-Salinas, Fernando Medina and RM del A. Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells. *J Virol* [Internet]. 2005;79(8):4557–67. Available from: <http://jvi.asm.org/content/79/8/4557.full.pdf+html>
- Kaplanski G, Porat R, Aiura K, Erban JK, Gelfand J a, Dinarello C a. Activated Platelets Induce Endothelial Secretion of Interleukin-8 In Vitro Via an Interleukin-1-Mediated Event. 1993;81(1):2492–5.
- Kelley JF, Kaufusi PH, Nerurkar VR. Dengue hemorrhagic fever-associated immunomediators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability. *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;422(2):326–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3273497&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Khongphatthanayothin A, Phumaphuti P, Thongchaiprasit K, Poovorawan Y. Serum levels of sICAM-1 and sE-selectin in patients with dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis*. 2006;59(3):186–8.
- Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38(2):411–9.
- Komarova Y, Malik AB. Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways [Internet]. Vol. 72, Annual Review of Physiology. 2010. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-021909-135833>
- Koraka P, Murgue B, Deparis X, Van Gorp ECM, Setiati TE, Osterhaus ADME, et al. Elevation of Soluble VCAM-1 Plasma Levels in Children with Acute Dengue Virus Infection of Varying Severity. *J Med Virol*. 2004;72(3):445–50.
- Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* [Internet]. 1989;67(4):375–80. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2491263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2002;66(4):435–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12164302
- Lee Y-R, Liu M-T, Lei H-Y, Liu C-C, Wu J-M, Tung Y-C, 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* [Internet]. 2006;87(Pt 12):3623–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098977>
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* [Internet]. 1999 Jun [cited 2016 May 15];73(6):4738–47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=112516&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* [Internet]. 2003;197(11):1467–76. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193907&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Levy A, Valero N, Espina LM, Añez 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.
- Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2015;4(3):e18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4395659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

rez&rendertype=abstract

- Liao B, Tang Y, Hu F, Zhou W, Yao X, Hong W, et al. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecules may correlate with the severity of dengue virus-1 infection in adults. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2015;4(November 2014):e24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2015.24>
- 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. 2002;2000–3.
- Liew KJL, Chow VTK. Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. *J Virol Methods*. 2006;131(1):47–57.
- Lin Y-L, Liu C-C, Chuang J-I, Lei H-Y, Yeh T-M, Lin Y-S, et al. Involvement of Oxidative Stress, NF-IL-6, and RANTES Expression in Dengue-2-Virus-Infected Human Liver Cells. *Virology* [Internet]. 2000;276(1):114–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682200905245>
- London NR, Zhu W, Bozza FA, Smith MCP, Greif DM, Sorensen LK, et al. Targeting Robo4-Dependent Slit Signaling to Survive the Cytokine Storm in Sepsis and Influenza. 2010;2(23).
- Lue H, Kapurniotu A, Thiele M, Calandra T, Bucala R, Fingerle-Rowson G, et al. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal*. 2006;18(5):688–703.
- Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* [Internet]. 2002;4(4):449–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932196>
- Luplertlop N, Missé D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez J-P, Leardkamolkarn V, et al. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep*. 2006;7(11):1176–81.
- 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.
- Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* [Internet]. 2002 Jun 15 [cited 2016 May 14];185(12):1697–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085313>
- Mangione JNA, Huy NT, Lan NTP, Mbanefo EC, Ha TTN, Bao LQ, et al. The association of cytokines with severe dengue in children. *Trop Med Health* [Internet]. 2014;42(4):137–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4253061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue virus pathogenesis: An integrated

- view. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):564–81.
- Mathew A, Townsley E, Ennis F a. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Future Microbiol* [Internet]. 2014;9(3):411–25. Available from: http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.13.171?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed&
- Matzdorff A, Kemkes-Matthes B, Pralle H. Microparticles And Reticulated Platelets In Wiskott-Aldrich Syndrome Patients. *Br J Haematol* [Internet]. 2000 Jun [cited 2016 May 3];109(3):673–673. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.2000.01996.x>
- McBride WJ., Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect.* 2000;2(9):1041–50.
- Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;12(4):544–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>
- Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;22(3):138–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X13002734>
- Michels M, Japtok L, Alisjahbana B, Wisaksana R, Sumardi U, Puspita M, et al. Decreased plasma levels of the endothelial protective sphingosine-1-phosphate are associated with dengue-induced plasma leakage. *J Infect* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;71(4):480–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.014>
- Michels M, van der Ven AJ a M, Djamiatun K, Fijnheer R, de Groot PG, Griffioen AW, et al. Imbalance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in severe dengue and relationship with thrombocytopenia, endothelial activation, and vascular stability. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2012;87(5):943–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3516273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Miller JL, deWet BJM, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek R a, Rudd PM, et al. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):11.
- Mitchell R a, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem.* 1999;274(25):18100–6.
- Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015;7(304):304ra142. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355031> \n <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aaa3863>
- Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection. *Trans*

- R Soc Trop Med Hyg. 2013;107(1):51–8.
- Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(7):2395–400.
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* [Internet]. 2003 Jul [cited 2016 Apr 10];9(7):921–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808447>
- del Moral-Hernández O, Martínez-Hernández NE, Mosso-Pani MA, Hernández-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.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 2009;139(7):1268–78.
- MS/SVS. Casos graves confirmados, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013. 2014;(03 mar. 2015). Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Graves-at---2013.pdf>
- MS/SVS. *Epidemiológico*. 2015;46:1–7.
- MS/SVS. *Epidemiológico*. 2016;47:1–7.
- Murgue B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. *J Med Virol* [Internet]. 2001;65(1):97–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11505450>
- Murrell S, Wu S-C, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;29(2):239–47. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975010001655>
- Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(11):1–8.
- Nascimento EJM, Hottz ED, Garcia-Bates TM, Bozza F, Marques ET a, Barratt-Boyes SM. Emerging Concepts in Dengue Pathogenesis: Interplay between Plasmablasts, Platelets, and Complement in Triggering Vasculopathy. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2014;34(3):227–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24941075>
- Nascimento EJM, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LHVG, Braga-Neto U, et al. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PLoS One*. 2009;4(8).
- 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* [Internet]. 2003;4(7):723–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783086>
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, et al. In vivo

- imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood* [Internet]. 2012 Feb 23 [cited 2016 May 3];119(8):e45–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3351094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nishioka K. Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. *Allerg Immunol (Leipz)* [Internet]. 1974 Jan [cited 2016 May 15];20-21(4):385–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4283486>
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, de Filippis AMB, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2005 Sep [cited 2016 May 14];11(9):1376–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3310608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2008;233(4):401–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367628>
- Ong SP, Lee LM, Leong YFI, Ng ML, Chu JJH. Dengue virus infection mediates HMGB1 release from monocytes involving PCAF acetylase complex and induces vascular leakage in endothelial cells. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(7):e41932. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3408393&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ooi E-E, Gubler DJ. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S115–24.
- Page A V, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence* [Internet]. 2013;4(March 2015):507–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669075>
- Palucka AK. Dengue virus and dendritic cells. *Nat Med* [Internet]. 2000 Jul [cited 2016 May 14];6(7):748–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888920>
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2007;85(1):43–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130899>
- Paranjape S, Harris E. Control of dengue virus translation and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2010;338:15–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513545>
- Park-Windhol C, D'Amore PA. Disorders of Vascular Permeability. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2016 Feb 22 [cited 2016 May 7]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907525>
- Pawitan JA. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. *Acta Med Indones* [Internet]. 2011;43(2):129–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785176>

- Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2001 Nov [cited 2016 May 15];65(5):427–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716094>
- Puhlmann M, Weinreich DM, Farma JM, Carroll NM, Turner EM, Alexander HR. Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. *J Transl Med*. 2005;3:37.
- Punyadee N, Mairiang D, Thiemmecca S, Komoltri C, Pan-ngum W, Chomanee N, et al. Microparticles Provide a Novel Biomarker To Predict Severe Clinical Outcomes of Dengue Virus Infection. *J Virol* [Internet]. 2015;89(3):1587–607. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.02207-14>
- Raekiansyah M, Espada-murao LA, Okamoto K. Dengue Virus neither Directly Mediates Hyperpermeability nor Enhances Tumor Necrosis Factor- α -Induced Permeability In Vitro. 2014;86–94.
- Ramakrishnan L, Radhakrishna Pillai M, Nair RR. Dengue Vaccine Development: Strategies and Challenges. *Viral Immunol* [Internet]. 2015;28(2):76–84. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vim.2014.0093>
- Randall R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Readings [Internet]. 1951;193(1):265–75. Available from: http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf
- Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LCS, et al. Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. *PLoS One*. 2012;7(12):1–10.
- Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med*. 2002;30(5):S302–12.
- Rice BDL and CM. Molecular Biology of Flavivirus. *Mol Biol Cell*. 2008;59:1317–542.
- Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2016 May 15];44(11):1462–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2275049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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* [Internet]. 1997 Apr 14 [cited 2016 May 15];230(2):244–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143280>
- Rigau-Pérez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2006 May [cited 2016 Mar 21];6(5):297–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631550>
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2015 Dec 31];11(8):532–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760609>
- Royall JA, Berkow RL, Beckman JS, Cunningham MK, Matalon S, Freeman BA.

- Tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha increase vascular endothelial permeability. *Am J Physiol* [Internet]. 1989 Dec [cited 2016 May 16];257(6 Pt 1):L399–410. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2610269>
- Sathupan P, Khongphattayanayothin A, Srisai J, Srikaew K, Poovorawan Y. The role of vascular endothelial growth factor leading to vascular leakage in children with dengue virus infection. *Ann Trop Paediatr* [Internet]. 2007;27(3):179–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17716445>
- Satterfield BA, Dawes BE, Milligan GN. Status of vaccine research and development of vaccines for Nipah virus. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;1–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16002966>
- Schett G, Dayer J-M, Manger B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;12(1):14–24. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrrheum.2016.166>
- Seet RCS, Chow AWL, Quek AML, Chan YH, Lim ECH. Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in adults with dengue virus infection: a case-control study. *Int J Infect Dis*. 2009;13(5):248–53.
- Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *Faseb J* [Internet]. 1995;9(9):726–35. Available from: [papers2://publication/uuid/936B2118-EE37-4D76-9EF1-20082A88669C\http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=7601337](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=7601337)
- Semple JW, Jr JEI, Freedman J. Platelets and the immune continuum. 2011;11(April).
- Shai E, Rosa I, Parguñá AF, Motahedeh S, Varon D, García Á. Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;76:287–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.02.030>
- Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, et al. CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex. 2013;25(4):595–606.
- Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol* [Internet]. 2006;80(20):10208–17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1617308&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S, Thisyakorn U, Lusher J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thromb Haemost* [Internet]. 2007 Apr [cited 2016 May 15];97(4):627–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17393026>
- Spiropoulou CF, Srikiatkachorn A. The role of endothelial activation in dengue hemorrhagic fever and hantavirus pulmonary syndrome. *Virulence* [Internet]. 2013;4(6):525–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23841977>
- Srikiatkachorn A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost* [Internet]. 2009;102(6):1042–9. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967133>

- Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanarooj S, Libraty DH, Green S, et al. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever. *J Virol* [Internet]. 2007;81(4):1592–600. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:67–82.
- Srikiatkachorn A, Kelley JF. Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever. *Antiviral Res* [Internet]. 2014;109(1):160–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.07.005>
- Srikiatkachorn A, Spiropoulou CF. Vascular events in viral hemorrhagic fevers: a comparative study of dengue and hantaviruses. *Cell Tissue Res*. 2014;1–13.
- Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2000;279(3):L419–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956614>
- Strüßmann T, Tillmann S, Wirtz T, Bucala R, von Hundelshausen P, Bernhagen J. Platelets are a previously unrecognised source of MIF. *Thromb Haemost* [Internet]. 2013 Nov [cited 2016 Apr 13];110(5):1004–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23846621>
- Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost*. 2002;87(1):42–6.
- Suharti C, Van Gorp ECM, Dolmans WM V, Setiati TE, Hack CE, Djokomoeljanto RJ, et al. Cytokine patterns during dengue shock syndrome. *Eur Cytokine Netw*. 2003;14(3):172–7.
- Sukriti S, Tauseef M, Yazbeck P, Mehta D. Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulm Vasc Reseach Inst*. 2015;4(4):535–51.
- Sumpio BE, Timothy Riley J, Dardik A. Cells in focus: Endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(12):1508–12.
- Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2016 May 16];85(Pt 7):1801–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218164>
- Tamir A, Sorrentino S, Motahedeh S, Shai E, Dubrovsky A, Dahan I, et al. The macromolecular architecture of platelet-derived microparticles. *J Struct Biol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;193(3):181–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047847715301192>
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* [Internet]. 2003;197(7):823–9. Available from:

<http://jem.rupress.org/content/197/7/823.long>

- Teixeira MG, Costa M da CN, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad saúde pública* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 May 15];25 Suppl 1:S7–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287868>
- Teixeira MG, et al. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(10):1663.
- Teixeira MG, Siqueira JB, Ferreira GLC, Bricks L, Joint G. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000-2010): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(12).
- Thakur P, Chakravarti A, Aggarwal S, Uppal B, Bhalla P. Elevated levels of vascular endothelial growth factor in adults with severe dengue infection. *VirusDisease* [Internet]. Springer India; 2016;27(1):48–54. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13337-015-0296-2>
- Tseng C-C, Wang C-C, Chang H-C, Tsai T-H, Chang L-T, Huang K-T, et al. Levels of circulating microparticles in lung cancer patients and possible prognostic value. *Dis Markers* [Internet]. 2013;35(5):301–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3787568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tseng C-S, Lo H-W, Teng H-C, Lo W-C, Ker C-G. Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;43:99–102.
- Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of Endothelial Junctional Permeability. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2008;1123(1):134–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1420.016>
- Vasconcelos PFC, Calisher CH. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000–2016. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2016;00(00):vbz.2016.1952. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2016.1952>
- 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.
- Veillat V, Carli C, Metz CN, Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A. Macrophage migration inhibitory factor elicits an angiogenic phenotype in human ectopic endometrial cells and triggers the production of major angiogenic factors via CD44, CD74, and MAPK signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(12):403–12.
- Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: Versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):5–30.
- Wakimoto M, Camacho L, Guaraldo L, Damasceno L, Brasil P. Dengue in children: a systematic review of clinical and laboratory factors associated with severity. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2015;7210(November):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26536064>

- Walker T, Johnson PH, Moreira L a, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, et al. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;476(7361):450–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10355>
- Wang J, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting P, et al. dependent manner Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 α – dependent manner. 2012;118(8):2366–74.
- van de Weg C a M, Pannuti CS, van den Ham HJ, de Araújo ES a, Boas LS V, Felix AC, et al. Serum angiopoietin-2 and soluble VEGF receptor 2 are surrogate markers for plasma leakage in patients with acute dengue virus infection. *J Clin Virol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;60(4):328–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.05.001>
- Weyrich AS, Lindeaaann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003;1(9):1897–905.
- Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;29(42):7221–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.022>
- Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. *Med Clin North Am*. 2008;92(6):1377–90.
- Wirtz TH, Tillmann S, Strüßmann T, Kraemer S, Heemskerk JWM, Grottko O, et al. Platelet-derived MIF: A novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;239(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.039>
- Wise de Valdez MR, Nimmo D, Betz J, Gong H-F, James AA, Alphey L, et al. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011;108(12):4772–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3064365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. 1997;84. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41988/1/9241545003_eng.pdf
- World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis* [Internet]. 2009;x, 147. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
- World Health Organization. Handbook for clinical management of dengue [Internet]. Geneva: WHO. 2012. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Handbook+for+CliniCal+ManageMent+of+dengue#1>
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Handbook+for+clinical+management+of+dengue#1>
- 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* [Internet]. 2000 Jul [cited 2016 May 14];6(7):816–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888933>
- Wu-Hsieh BA, Yen YT, Chen HC. Dengue hemorrhage in a mouse model. *Ann N Y*

Acad Sci. 2009;1171(SUPPL. 1):42–7.

- Xue F, Liu L, Fan J, He S, Li R, Peng ZW, et al. Interleukin-1 beta promotes the neurogenesis of carotid bodies by stimulating the activation of ERK1/2. *Respir Physiol Neurobiol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;219:78–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2015.08.008>
- Yeh T-M, Liu S-H, Lin K-C, Kuo C, Kuo S-Y, Huang T-Y, et al. Dengue virus enhances thrombomodulin and ICAM-1 expression through the macrophage migration inhibitory factor induction of the MAPK and PI3K signaling pathways. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(1):e55018. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3557271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yu X, Lin S-G, Huang XR, Bacher M, Leng L, Bucala R, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway. *J Interferon Cytokine Res* [Internet]. 2007;27(2):103–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316137>
- Zhu W, London NR, Gibson CC, Davis CT, Tong Z, Sorensen LK, et al. Interleukin receptor activates a MYD88-ARNO-ARF6 cascade to disrupt vascular stability *Weiquan*. 2013;492(7428):252–5.

9. Anexos

- 9.1 Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation.** Hottz ED¹, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza Blood. 2013 Nov 14;122(20):3405-14. doi: 10.1182/blood-2013-05-504449. Epub 2013 Sep

**9.2 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – IPEC/
FIOCRUZ.**