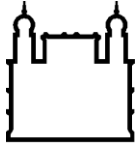


INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**Caracterização da Interação entre Vírus da Dengue e
Plaquetas Humanas: Ativação Plaquetária, Função
Mitocondrial e Secreção de Citocinas**

Eugenio Damaceno Hottz

**Rio de Janeiro
Agosto de 2010**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical

Eugenio Damaceno Hottz

**Caracterização da Interação entre Vírus da Dengue e Plaquetas
Humanas: Ativação Plaquetária, Função Mitocondrial e
Secreção de Citocinas**

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Torres Bozza

**Rio de Janeiro
2010**

H834

Hottz, Eugenio Damaceno

Caracterização da Interação entre Vírus da Dengue e Plaquetas Humanas: ativação plaquetária, função mitocondrial e secreção de citocinas / Eugenio Damaceno Hottz. – Rio de Janeiro, 2010.

xvi, 72 f. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Medicina Tropical, 2010.

Bibliografia: f. 55-69

1. Dengue. 2. Plaquetopenia. 3. Ativação plaquetária. 4. Função mitocondrial I. Título.

CDD 616.91852

Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical

**Caracterização da Interação entre Vírus da Dengue e Plaquetas Humanas:
Ativação Plaquetária, Função Mitocondrial e Secreção de Citocinas**

Por: Eugenio Damaceno Hottz

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Claire Fernandes Kubelka
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz (Presidente da banca)

Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Profa. Dra. Andréa Thompson Da Poian
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

SUPLENTE:

Prof. Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Rio de Janeiro, 09 de Agosto de 2010

ÍNDICE

	pag
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Agente Etiológico.....	1
1.2.2 Ciclo de Replicação.....	3
1.2 Epidemiologia e Controle da Dengue.....	6
1.1.1 Dengue nas Américas.....	7
1.1.2 Dengue no Brasil.....	8
1.1.3 Estratégias de Prevenção e Controle.....	9
1.3 Manifestações Clínicas e Diagnóstico.....	10
1.3.1 Diagnóstico Clínico.....	11
1.3.2 Diagnóstico Laboratorial.....	13
1.4 Patogênese da FHD/SCD.....	14
1.5. Plaquetopenia.....	17
1.5.1 Megacariócitopoese e Plaquetopoese.....	17
1.5.2 Mecanismos Fisiopatológicos de Plaquetopenia.....	19
1.5.3 Plaquetopenia associada ao DENV.....	20
1.6 Função Mitocondrial na Fisiologia Plaquetária e na Infecção pelo DENV.....	22
2 JUSTIFICATIVAS.....	24
3 OBJETIVOS.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Coleta de Material Biológico.....	26
4.2 Isolamento de Plaquetas.....	26
4.3 Manutenção das Plaquetas em Cultura.....	27
4.4 Produção e Armazenamento do DENV-2.....	27
4.5 Interação Plaqueta-DENV.....	28
4.6 Avaliação da Ativação Plaquetária por Microscopia de Fluorescência.....	28
4.7 Citometria de Fluxo.....	28
4.7.1 Avaliação da Ativação Plaquetária por Citometria de Fluxo.....	28
4.7.2 Medida do Potencial de Membrana Mitocondrial.....	28
	29

4.7.3 Avaliação da Exposição da Fosfatidilserina.....	
4.8 Medida do Consumo de Oxigênio.....	29
4.9 Dosagem de Citocinas.....	30
4.8.1 ELISA.....	30
4.8.2 Ensaio Multiplex.....	30
4.10 Análise Estatística.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Plaquetas Encontram-se Ativadas Após Interação com do DENV-2.....	31
5.2 Estímulo com o DENV-2 Induz a Secreção de Citocinas em Plaquetas Humanas.....	34
5.3 Análise da Função Mitocondrial da Plaqueta Quiescente e Ativada.....	36
5.3.1 A ATP-Sintase Plaquetária Pode Reverter sua Atividade e Manter o $\Delta\Psi_m$ Diante da Interrupção da CTE.....	36
5.3.2 A Ativação Plaquetária por Trombina Promove a Dissipação do $\Delta\Psi_m$ e Aumento no Consumo de O ₂ de Maneira Dependente da Dose.....	38
5.4 Plaquetas Expostas ao DENV-2 Apresentam Diminuição do $\Delta\Psi_m$ e Indícios de Morte Celular.....	41
6 DISCUSSÃO.....	44
6.1 Ativação e Degranulação de Plaquetas Expostas ao DENV.....	44
6.2 Análise da Função Mitocondrial plaquetária.....	47
6.3 Disfunção Mitocondrial e Morte em Plaquetas Expostas ao DENV-2.....	50
6.4 Considerações Finais.....	52
7 CONCLUSÕES.....	53
8 PERSPECTIVAS.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	70

Lista de abreviaturas e símbolos:

- ACD – Ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose
- ADE – Amplificação dependente de anticorpos (*antibody-dependent enhancement*)
- ADP - adenosina 5'-difosfato
- ANT – Trocador de nucleotídeos adenínicos
- ATP - adenosina 5'-trifosfato
- BHK – *Baby hamster kidney cell*
- BSA – *Bovine serum albumine*
- C – Proteína capsídica
- CaCl₂ – Cloreto de cálcio
- CCR – Receptor de quimiocinas da família CC
- CD – grupo de diferenciação (*cluster of differentiation*)
- CE – Ceará
- CL – Corpúsculos lipídicos
- CLEC – *C type lectin domain*
- c-MPL – Receptor da trombopoetina
- CR2 – *complement receptor type 2*
- CsA – Ciclosporina-A
- CTE – Cadeia transportadora de elétrons
- CXCL – Ligante de CXCR
- CXCR – Receptor de quimiocinas da família CXC
- Cyp-D – Ciclofilina D
- DCC – Dengue com complicações
- DC-SIGN – *Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*
- DENV – Vírus da dengue
- DENV-2 AM – DENV-2 genótipo Americano
- DENV-2 AS – DENV-2 genótipo Sudeste Asiático
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- E – Proteína do envelope
- EBSS – *Earle's balanced salt solution*
- ECP – Efeito citopático
- ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- FCCP - Carbonil cianeto p-(trifluorometoxi)fenilhidrazona

FC γ – Região FC de Imunoglobulina G

FC γ R – Receptor para FC gama

FD – Febre do dengue

FHD – Febre hemorrágica do dengue

FITC – fluoresceína isotiocianato

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GP – Glicoproteína

H₂O – Molécula de água

HCV – Vírus da Hepatite C (*hepatitis C virus*)

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil) 1-piperazinaetanosulfônico

Hep G2 – Hepatocellular liver carcinoma cell line G2

HI – Inibição da hemaglutinação (*Haemagglutination inhibition*)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA – antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*)

ICAM – Molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)

Ig – Imunoglobulina

IL – interleucina

IMF – Intensidade média de fluorescência

INF – Interferon

IPEC – Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas

IP – *Interferon-inducible protein*

IRES – Sítio interno de entrada no ribossomo (*internal ribosome entry site*)

JAK – cinase da família *Janus* (*Janus kinase*)

Kb – Kilobases

KCl – Cloreto de potássio

kDa – Kilodáltons

LPS - Lipopolissacarídeo

M – Proteína de membrana

MAPK – Mitogen-activated protein kinase

MCP – proteína quimiotática para monócito (*monocyte chemoattractant protein*)

MgCl – Cloreto de magnésio

MgCl₂·6H₂O – Cloreto de magnésio hexahidratado

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex*)
MIP – proteína inflamatória de macrófago (*macrophage inflammatory protein*)
mmHg – milímetros de mercúrio MS – Ministério da Saúde
m.o.i – *multiplicity of infection*
MPTP – poro de transição de permeabilidade mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore*)
NaCl – Cloreto de sódio
NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
Na₂HPO₄ – monohidrogenofosfato de sódio
NF – fator nuclear (*nuclear factor*)
NO – Óxido nítrico
NOD – *non-obese diabetic*
NS – Proteína não estrutural
O₂ – Oxigênio molecular
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORF – Fase aberta de leitura (*Open reading frame*)
PAF – Fator ativador de plaquetas (*platelet activating factor*)
PAHO – Organização Panamericana de Saúde (*Panamerican Health Organization*)
PAIg – Imunoglobulinas associadas a plaquetas
PBMC – Células mononucleares circulantes (*peripheral blood mononuclear cells*)
PBS – Solução salina fosfatada tamponada (*Phosphate buffer solution*)
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)
PDGF – *Platelet-derived growth factor*
PD-L – *programmed death ligand*
PEAa – Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*
PFU – Unidades formadoras de placa (*plaque-forming units*)
PG – Prostaglandina
PIACD – Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue
PNCD – Programa Nacional de Controle da Dengue
PP – Pressão de pulso
prM – Precursor da proteína de membrana
PRP – Plasma rico em plaquetas
PS – Pressão sanguínea
PSG – *PIPES, saline and glucose*

PTI – Púrpura trombocitopênica idiopática
RANTES – *Regulates upon activation normal T cell expressed and presumably secreted*
RC – Complexo de replicação
RE – Retículo endoplasmático
RER – Retículo endoplasmático rugoso
RJ – Rio de Janeiro
RNA – Ácido ribonucléico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
rpm – Rotações por minuto
SCD – Síndrome do choque por dengue
SCID – *Severe Combined Immunodeficient*
STAT – proteínas sinalizadoras e ativadoras de transcrição (*signal transducers and activators of transcription*)
SVS – Serviço de Vigilância em Saúde
TA – Temperatura ambiente
TF – Fator tecidual (*tissue factor*)
TGF – *Transforming growth factor*
TLR – *Toll like receptor*
TMRE – Tetrametilrodamina etil éster
TNF – Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)
TO – Tocantins
TXA₂ – Tromboxano A₂
UV – Ultravioleta
VCAM - *Vascular adhesion molecule*
VDAC - Canal de ânion dependente de voltagem (*voltage-dependent anion channel*)
WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)
 $\Delta\Psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial

Lista de Figuras e Tabelas:

	Pag
Figura 1.1: Estrutura da partícula viral.....	1
Figura 1.2: Organização do Genoma dos <i>Flavivirus</i>	2
Figura 1.3: Topologia proposta para a poliproteína na membrana do RER.....	4
Figura 1.4: Ciclo de replicação do DENV.....	5
Figura 1.5: População sob risco de transmissão de dengue.....	7
Tabela 1.1: Resumo dos critérios da OMS para distinção de FD e FHD graus I a IV...	11
Tabela 1.2: Sinais e sintomas para caracterização do caso suspeito de dengue e da evolução para FHD e SCD segundo o MS.....	12
Figura 1.6: Morfologia da plaqueta quiescente e ativada.....	18
Tabela 1.3: Trombocitopenia em pacientes com FD, FHD e SCD segundo estudos hospitalares.....	21
Figura 1.7: Esquema representativo da fosforilação oxidativa.....	23
Figura 4.1: Análise do nível de pureza das plaquetas isoladas.....	27
Figura 5.1: Fotomicrografias de plaquetas infectadas com DENV-2 e controles.....	32
Figura 5.2: Expressão de P-selectina (CD62-P) em plaquetas infectadas com o DENV-2 e controles.....	33
Figura 5.3: Níveis de citocinas no sobrenadante de plaquetas incubadas com o DENV-2 ou controles.....	35
Figura 5.4: Resposta da atividade mitocondrial plaquetária à drogas inibidoras dos complexos enzimáticos mitocondriais e desacopladoras.....	37
Figura 5.5: Função mitocondrial em plaquetas ativadas por trombina.....	38
Figura 5.6: Efeitos da Ciclosporina- A e da Oligomicina sobre a função mitocondrial de plaquetas ativadas por trombina.....	40
Figura 5.7: Potencial de membrana em plaquetas expostas ao DENV-2 e controles....	41
Figura 5.8: Exposição de fosfatidilserina em plaquetas expostas ao DENV-2 e controles.....	42
Figura 5.9: Correlação entre $\Delta\Psi_m$ e exposição de fosfatidilserina.....	43
Tabela 6.1: Comparação entre a respiração mitocôndrial de plaquetas e de outros tipos celulares.....	48

Aos meus amigos.

Amigos familiares, amigos de cerveja,

Amigos de trabalho, amiga namorada...

Amigos de ombro amigo.

Distantes ou próximos, novos ou antigos...

Mas o mais importante: Amigos.

“*As* descobertas de hoje serão as ferramentas de amanhã.”

Sheldon Glashow

Agradecimentos

A pouco mais de um ano bati à porta do Laboratório de Imunofarmacologia em busca da orientação da Dra. Patrícia Torres Bozza para o desenvolvimento da minha dissertação de mestrado. Tamanha foi minha surpresa ao ser acolhido por tão grande família que muito me ajudou e a qual tenho tanto a agradecer.

Primeiramente agradeço aos meus orientadores Patrícia Torres Bozza e Fernando Augusto Bozza pelo entusiasmo ao lidar com as questões relacionadas às perguntas e respostas desse estudo, pela incrível capacidade de gestão do projeto em bons ou maus momentos do andamento da pesquisa, bem como pela confiança depositada.

Agradeço a nossa amiga Rose Branco, conhecedora de todos os processos envolvidos na rotina administrativa do laboratório e que muito nos ajuda ao compartilhar conosco esse conhecimento, facilitando assim processos indispensáveis ao nosso trabalho.

Devo especial agradecimento a Adriana Broxado, cuja prontidão em ajudar impressiona aqueles que cruzam o seu caminho. Muito obrigado não só pelas aulas e protocolos de citometria, mas pela amizade e pelas longas conversas que muito me ajudaram a superar os desafios que enfrentei no último ano.

Aos demais membros do Laboratório de Imunofarmacologia que muito contribuíram para a realização desse trabalho como Clarissa Monteiro, Narayana Fazolini, Roberta Navarro, Andréa Surrage, Diogo Dibo, Renan, Rachel Novaes, Alessandra, Nathália Costa, Lívia, Adriana Valochi, André, Glauce Moreno, Kethelin Lagni e principalmente: Edson Assis pelo incentivo e ajuda nas dosagens de citocinas; Nathália Roque pela amizade e preocupação constante, bem como pela ajuda em microscopia de fluorescência; e à Giselle Barbosa pelas dicas que continham pequenos, mas essenciais, detalhes sobre experimentação com células, e também pela grande amizade.

Devo especial agradecimento também a Marcus Fernandes de Oliveira, meu terceiro orientador e grande entusiasta no estudo de bioquímica; a Luiz Felipe Garcia que participou ativamente desse estudo principalmente no que diz respeito à função mitocondrial plaquetária; bem como à Ana Paula Santiago que nos ensinou técnicas desde o isolamento de plaquetas humanas à análise dessas interessantíssimas células.

Agradeço aos amigos da Universidade de Utah, Salt Lake, Guy Zimmerman, Andrew Weyrich, Neal Toley, Hansjorj Schwertz e Matthew Smith, pelos protocolos de trabalho com plaquetas e por se prontificarem à realização do curso teórico prático de interação plaquetas-leucócitos aplicadas a doenças infecciosas e parasitárias.

Agradeço ainda à professora Andréa Thompson DaPoian, Irania Assunção-Miranda e equipe do Laboratório de Bioquímica de Vírus, e ao professor Antônio Galina e equipe do Laboratório de Bioenergética Aplicada, ambos do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, e ambos de suma importância para a realização deste trabalho.

Agradeço aos coordenadores da Pós-graduação em Medicina Tropical Marcio Neves Bóia, Alda Maria da Cruz e Felipe Aníbal, que muito além de coordenadores se tornaram grandes amigos e incentivadores. Aos demais amigos da Medicina Tropical Adriano Gomes da Silva, Viviane Fernandes Menezes, Patrícia Pais Martins, Joana Gardeal Valverde, Josélio Galvão e Michael. Lembranças de nossa inesquecível viagem para Ilha Grande na qual nos divertimos *moderadamente*.

Agradeço enfim aos meus pais, Paulo Henrique Hottz e Iara Lúcia Damaceno Hottz pelo constante incentivo e liberdade de escolha desde a adolescência, apesar de todas as limitações tenho certeza que sempre fizemos o melhor que podíamos; e a minha namorada, Mariana Pais Martins pelo apoio e pela paciência durante todo o período de pós-graduação.

Agradeço ao CNPq e à FAPERJ pelo suporte financeiro.

Resumo

A Dengue é considerada, hoje, a principal arbovirose humana no mundo, infectando milhões de pessoas e causando milhares de mortes anualmente. A infecção pode ser assintomática ou pode causar doença com quadro cínico variado, que inclui desde quadros febris sem maiores complicações até quadros graves de sangramentos e choque, nos quais plaquetopenia e aumento da permeabilidade vascular estão frequentemente presentes. A interação direta do vírus da dengue (DENV) com plaquetas parece ser um importante mecanismo implicado na plaquetopenia de pacientes com dengue, portanto a identificação e compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo serão de grande valia para a determinação de marcadores de gravidade e para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos visando prevenção e/ou resolução da febre hemorrágica do dengue/ síndrome do choque por dengue (FHD/SCD). Nesse trabalho, buscamos caracterizar os efeitos diretos do DENV-2 sobre a ativação e o metabolismo energético de plaquetas humanas a partir de um modelo de interação plaqueta-DENV *in vitro*. Nossos resultados mostraram que plaquetas expostas ao DENV-2 apresentaram alterações morfológicas inerentes à ativação plaquetária como espalhamento, filopodia e agregação, bem como aumento da expressão de P-selectina. Além disso, a exposição ao DENV-2 induziu a secreção de IL-4, IL-13, GM-CSF, MCP-1 e TNF- α . Importammentemente, a exposição de plaquetas ao DENV-2 inativado não levou a ativação plaquetária. Para melhor compreender o papel da atividade mitocondrial durante a ativação de plaquetas expostas ao DENV-2 nós inicialmente investigamos o papel funcional da mitocôndria em plaquetas quiescentes e ativadas por trombina (controle positivo de ativação plaquetária nesse estudo). Observamos que plaquetas apesar de consumir O₂ para gerar $\Delta\Psi_m$ podem também mantê-lo através da hidrólise de ATP, um processo associado com a prevenção da apoptose em outros tipos celulares. Observamos também que a ativação plaquetária por trombina promove diminuição ou aumento do $\Delta\Psi_m$ de acordo com a dose administrada, alterando consequentemente o fluxo de O₂ através de mecanismos que envolvem transição de permeabilidade e reversão da ATP-sintase. Demonstramos que plaquetas expostas ao DENV-2 apresentam marcante despolarização do $\Delta\Psi_m$ e aumentada exposição de fosfatidilserina, sugerindo que o DENV pode diretamente induzir morte celular em plaquetas. Os mecanismos envolvidos na ativação e morte de plaquetas expostas ao DENV ainda devem ser elucidados, mas nossos resultados mostram que a ativação plaquetária induzida diretamente pelo DENV pode ter um papel importante na origem da plaquetopenia associada à FD/FHD, bem como na produção dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogenia da doença.

Abstract

Dengue is, nowadays, the most important human arbovirus disease in the world, infecting millions of people and causing thousands of deaths every year. Infection can be asymptomatic or may lead to sickness whose intensity may vary, featuring from undifferentiated fever up to severe cases with bleeding and shock, in which thrombocytopenia and increased vascular permeability are frequently observed. Dengue virus (DENV) directly interacting with platelets may be an important peripheral mechanism of thrombocytopenia in dengue; therefore, identification and comprehension of mechanisms involved in this process will play a major role in determining markers of severity or in developing new therapeutic targets leading up to prevention or resolution of dengue hemorrhagic fever/ dengue shock syndrome (DHF/DSS). This work aimed to characterize the DENV-2 direct effects on platelet activation and energetic metabolism through an *in vitro* platelet-DENV interaction model. Our results showed typical activation-related morphological changes in DENV-2 exposed platelets, such as spreading, filopodia and aggregation, as well as increase in P-selectin expression. Furthermore, DENV-2 exposure induced release of IL-4, IL-13, GM-CSF, MCP-1 and TNF- α . Importantly, platelet exposure to inactivated DENV-2 failed to increase P-selectin expression. Aiming at a better understanding of the role of mitochondrial activity during DENV-induced platelet activation we investigated the functional role of this organelle on resting and thrombin activated platelets (positive control of platelet activation in this study). Although platelets consume O₂ to generate $\Delta\Psi_m$, these cells can also keep the $\Delta\Psi_m$ from hydrolysis of ATP, a process associated with apoptosis cell death prevention in other cell types. We also found that platelet activation by thrombin leads to decrease or increase in $\Delta\Psi_m$ in a dose-dependent way, consequently altering O₂ consumption through a mechanism involving permeability transition and ATP-sintase reversion. We show that DENV-2 exposed platelets present $\Delta\Psi_m$ depolarization and elevated phosphatidylserine exposition, suggesting a DENV-induced cell death in platelets. The mechanisms involved in DENV-exposed platelet activation and cell death remain elusive, but our results show that directly DENV-induced platelet activation may have an important role in origin of DF/DHF thrombocytopenia, as well as in inflammatory mediators production in dengue pathogenesis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agente Etiológico

O Vírus da Dengue (DENV) é um membro do gênero *Flavivirus* e da família Flaviviridae classificado em um complexo antigênico que compreende quatro sorotipos (DENV-1 a 4) (Guzman e Kouri, 2002). É um vírus pequeno, de aproximadamente 50 nm, composto por um envelope lipídico que contém em sua superfície as glicoproteínas E (envelope) e M (membrana), envolvendo um nucleocapsídeo composto pelo genoma RNA em conjunto com múltiplas cópias da proteína C (capsídeo) (Lindenbach *et al*, 2007) (Figura 1.1).

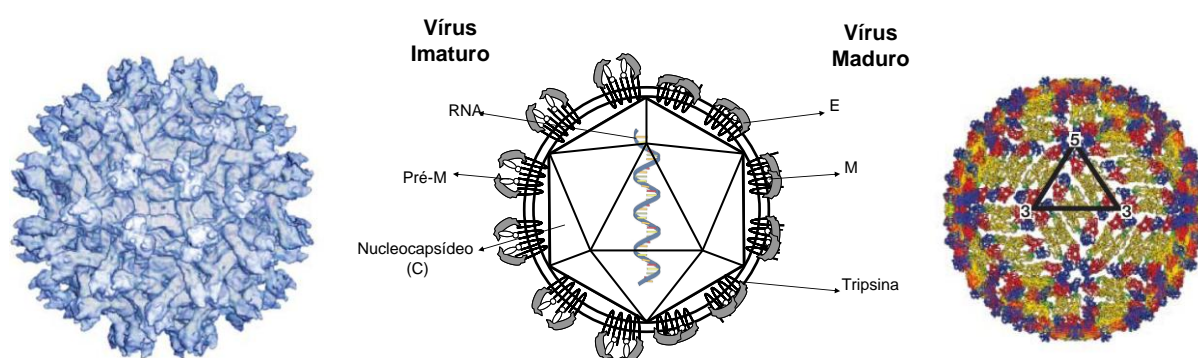


Figura 1.1: Estrutura da partícula viral. Ao centro esquema da organização das proteínas no vírus maduro e imaturo segundo Heinz e Allison (2001). À direita vírus imaturo com projeções. À esquerda vírus maduro liso, (Kuhn *et al*, 2002; Mukhopadhyay *et al*, 2005).

O vírus é rapidamente inativado a 50°C, com um decréscimo de 50% na infectividade a cada 10 minutos nessa temperatura. A infectividade também é sensível à inativação por luz ultravioleta (UV), solventes lipídicos, detergentes iônicos e não iônicos, e digestão por tripsina, papaína e lipase pancreática (Russel *et al*, 1980; Brinton, 1986).

O genoma dos *Flavivirus* consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11 kb, este RNA é infeccioso. Flanqueada pelas regiões não-codificantes 5' e 3' o genoma apresenta uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica para uma poliproteína que é posteriormente clivada por uma combinação de proteases viral e do hospedeiro em proteínas estruturais (C-prM-E) e não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Chambers *et al*, 1990) (Figura 1.2).

O tamanho limitado do genoma viral necessita uma maximização da capacidade de codificação dos genes, para tanto, muitas das proteínas estruturais e não-estruturais apresentam múltiplas funções no ciclo de replicação do DENV (Clyde *et al*, 2006).

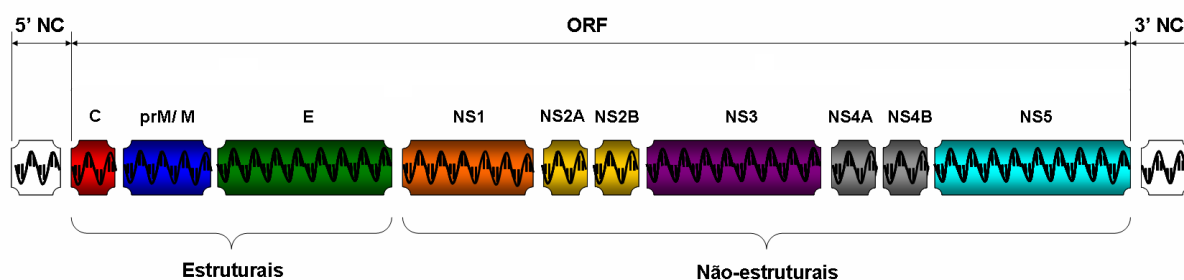


Figura 1.2: Organização do Genoma dos *Flavivirus*. Uma longa fase aberta de leitura (ORF) entre as regiões 3' e 5' não codificantes (5' NC e 3' NC) (adaptado de Chambers *et al*, 1990).

A proteína C é uma proteína de ~11 kDa com alto teor de aminoácidos básicos. Apresenta-se em solução como homodímeros e formações oligoméricas de maior complexidade não ocorrem na ausência de ácido nucléico (Kiermayr *et al*, 2004).

A glicoproteína pré-membrana (prM), de 18,1 a 19 kDa, é clivada por furina durante a maturação viral, e tem como função proteger a proteína E de exercer atividade fusogênica durante a exocitose do vírus (Chambers *et al*, 1990; Stadler *et al*, 1997, Zhang *et al*, 2003).

A proteína M (8,2-8,5 kDa) é o produto da clivagem de prM, e participa, junto com a proteína E, da montagem da estrutura icosaédrica da partícula viral (Chambers *et al*, 1990; Heinz e Allison, 2001).

A glicoproteína E é a maior das proteínas estruturais com 53,3 a 54,3 kDa, está envolvida com a montagem da partícula viral, ligação a receptores de membrana, fusão de membranas, além de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes (Chambers *et al*, 1990).

A proteína NS1 (39,2-40 kDa), é uma subunidade do complexo de replicação, juntamente com NS2A, NS3, NS4A, NS4B e NS5, porém o seu papel preciso na montagem e/ou função do complexo de replicação ainda é desconhecido (Chambers *et al*, 1990; Lindenbach e Rice, 1997; Muylaert *et al*, 1997). A proteína NS1 é secretada para o meio extracelular com uma forte indução de produção de anticorpos (Clyde *et al*, 2006).

A proteína NS2A (23,7-25,4 kDa) é a primeira das quatro pequenas proteínas hidrofóbicas do genoma viral, restando ainda NS2B (13,8-14,5 kDa), NS4A (16-16,4 kDa) e NS4B (26,5-27,9 kDa) (Chambers *et al*, 1990). Uma combinação das proteínas NS2A, NS4A e NS4B é capaz de bloquear a via do interferon (IFN) (Munhoz-Jordán *et al*, 2003; Munhoz-Jordán *et al*, 2005). As proteínas NS2A e NS4A estão possivelmente envolvidas na localização e ancoragem do RNA viral e do complexo de replicação na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) (Khromykh *et al*, 1999). A proteína NS2B é o co-fator necessário para a atividade serina protease da proteína NS3 (Falgout *et al*, 1999).

A proteína NS3 (68,5-69,5 kDa) é uma proteína bifuncional apresentando funções de serina protease e de helicase. A formação do complexo NS2B-NS3 é necessária para correta

localização celular (associação com membrana) e para a máxima atividade proteolítica desse complexo (co-fator) (Chambers *et al*, 1990; Falgout *et al*, 1999).

A proteína NS5 é a maior (103-104 kDa) e mais conservada proteína entre os flavivirus, é um constituinte do complexo de replicação e apresenta atividade de RNA polimerase dependente de RNA (Chambers *et al*, 1990; Khromykh *et al*, 1999).

1.2.2 Ciclo de Replicação

O DENV pode infectar diversos tipos celulares em diferentes tecidos e órgãos. Em estudos realizados com autópsias e biópsias de pacientes com dengue demonstrou-se a presença de RNA viral em monócitos e linfócitos circulantes, em células linfóides e macrófagos no baço (Jessie *et al*, 2004), bem como no fígado, pulmão, baço, cérebro, rim, medula óssea e coração (Araújo *et al*, 2009a). A replicação do DENV tem sido demonstrada também em células dendríticas dérmicas e circulatórias (Wu *et al*, 2000).

A interação do vírus com a célula inicia-se com a ligação a certos receptores de superfície celular. A infecção de células dendríticas envolve a expressão de DC-SIGN na célula alvo (Navarro-Sanchez *et al*, 2003), porém a internalização mediada por DC-SIGN é dispensável para a infectividade do DENV e propõe-se que o DC-SIGN atue como um facilitador da interação com outro receptor que possa levar a endocitose do vírus (Lozach *et al*, 2005). Além de DC-SIGN, GRP78 (BiP), moléculas relacionadas com CD41, e integrina $\alpha_v\beta_{III}$ têm sido sugeridas como receptores primários para DENV (Mukhopadhyay *et al*, 2005).

Os DENV são internalizados predominantemente através de endocitose mediada pela rede de clatrin (80%), ou ainda por macropinocitose (20%) (Suksanpaisan *et al*, 2009). O ambiente acidificado do endossoma induz uma mudança conformacional na proteína E, convertendo-a para o estado fusogênico (estrutura homotrimérica de E), o que resulta na fusão entre as membranas viral e do hospedeiro, culminando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (Allison *et al*, 1995; Schalich *et al*, 1996; Lindenbach *et al*, 2007).

Uma vez no citoplasma inicia-se a tradução do RNA viral. A tradução do genoma pode ser *cap* dependente ou pode ocorrer após a inibição da tradução dependente de *cap* a partir de um mecanismo não dependente de IRES ainda desconhecido (Edgil *et al*, 2006). A importação da poliproteína para o RER começa antes da cadeia polipeptídica estar completamente sintetizada, a sequência sinal hidrofóbica da poliproteína direciona o polirribossomo para a membrana do RER e, à medida que é sintetizada, a poliproteína é ali ancorada (Alberts *et al*, 2002; Mukhopadhyay *et al*, 2005).

A tradução da longa ORF produz uma poliproteína que é co e pós-traducionalmente clivada por proteases viral e do hospedeiro nas proteínas estruturais e não-estruturais (Lindenbach *et al*, 2007). A Figura 1.3 apresenta a topologia, os sítios de clivagem, e as proteases responsáveis pela clivagem da poliproteína.

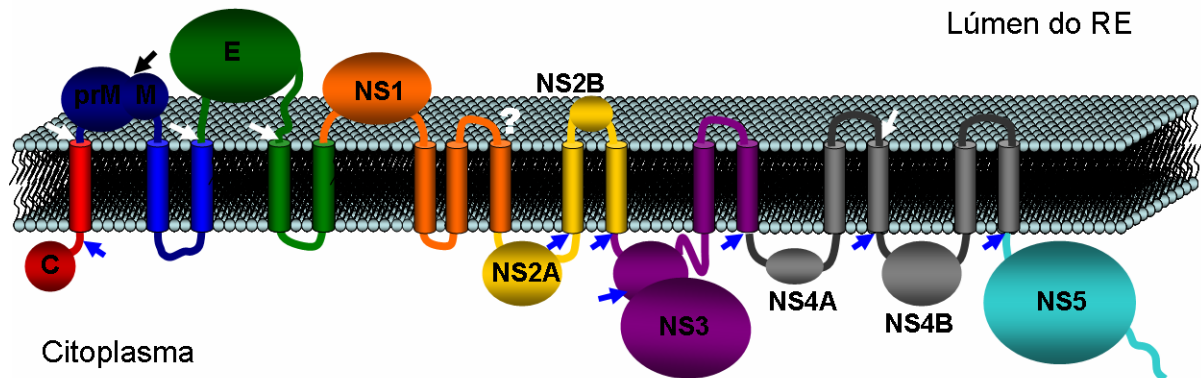


Figura 1.3: Topologia proposta para a poliproteína na membrana do retículo endoplasmático. Proteínas estão dispostas na ordem em que aparecem na poliproteína (da esquerda para a direita), áreas são aproximadamente proporcionais ao tamanho de cada proteína, hélices transmembrana são representadas por cilindros, e as setas indicam os sítios de clivagem pós-traducional (setas azuis = serina-protease viral, setas brancas = sinalase do hospedeiro, seta preta = furina, e ponto de interrogação = protease desconhecida). Adaptado de Mukhopadhyay *et al* (2005) e Lindenbach *et al* (2007).

A figura 1.4 representa esquematicamente o ciclo de replicação do DENV.

Após a tradução do genoma as proteínas não-estruturais dão origem a um complexo de replicação (RC) e iniciam a replicação do genoma. A replicação do genoma envolve a produção de um RNA viral polaridade negativa, um intermediário usado para posterior produção de múltiplas cópias de RNA viral de polaridade positiva (Clyde *et al*, 2006).

Devido a aminoácidos básicos específicos da proteína C esta proteína se associa com corpúsculos lipídicos (CL) no citoplasma da célula para posterior interação com o RNA genômico no processo de formação do nucleocapsídeo. Resta saber se a encapsidação ocorre no RE após deslocamento de C para esta organela, ou nos próprios corpúsculos lipídicos com posterior transferência dos nucleocapsídeos neoformados para o RE (Samsa *et al*, 2009).

A montagem do vírus ocorre no lúmen do RER através da condensação do nucleocapsídeo com os domínios transmembrana de E e prM. Os vírions são transportados individualmente para o complexo de Golgi e emergem em vesículas endossomais onde o ambiente acidificado promove a clivagem de prM para M e consequente maturação seguida da exocitose das partículas virais (Mackenzie *et al*, 2001; Beeck *et al*, 2003).

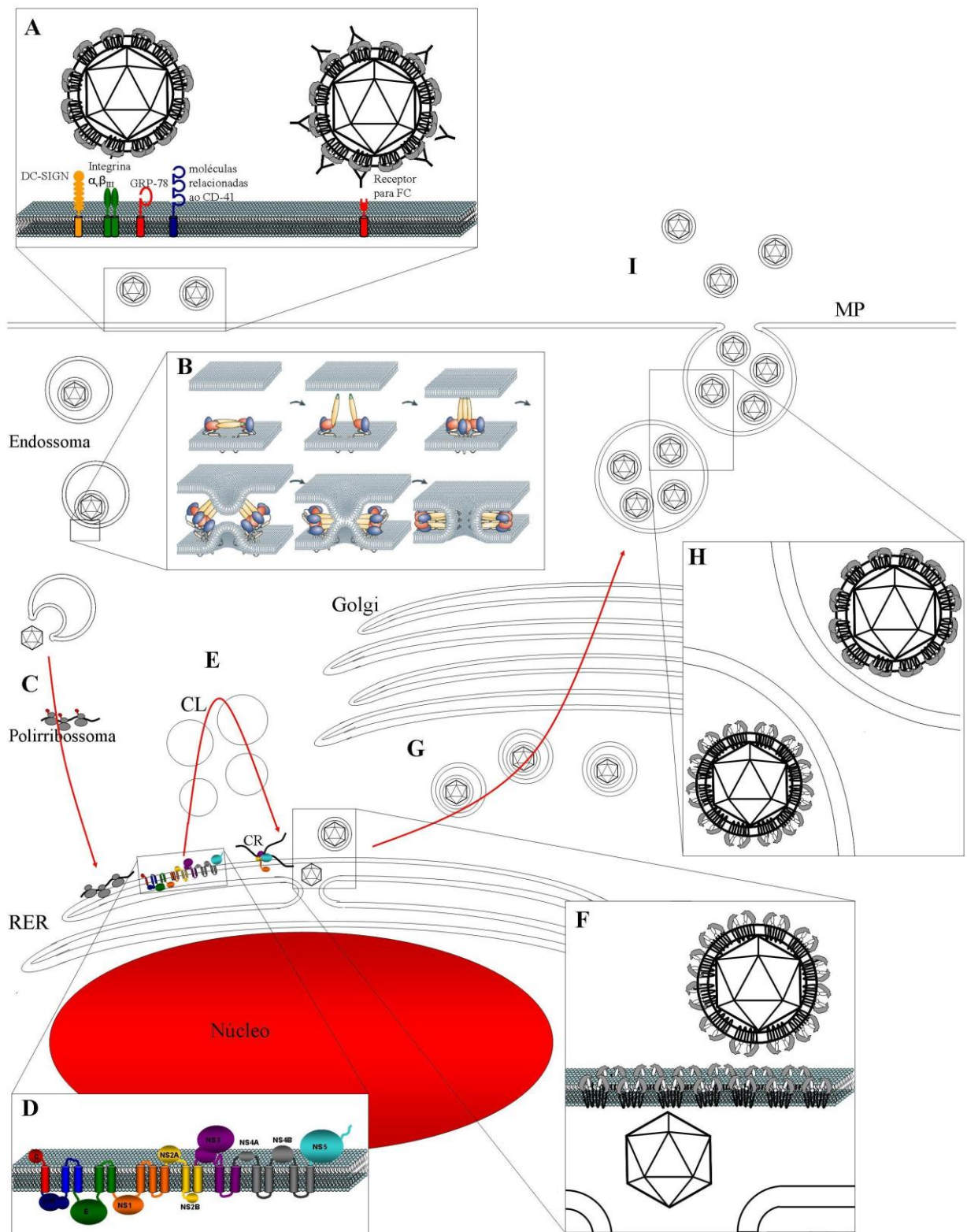


Figura 1.4: Ciclo de replicação do DENV. A: Endocitose do vírus mediada por interação com DC-SIGN, Integrina $\alpha\beta_{III}$, GRP-78 ou moléculas relacionadas com CD-41; endocitose do vírus opsonizado mediada por receptor para FC. B: Fusão da membrana viral com o endossoma a partir de mudanças conformacionais na proteína E. C: O início da tradução do RNA viral no citoplasma gera um pepitídeo sinal que a direciona para o RER; D: topologia da poliproteína na membrana do RER. E: Após a clivagem da poliproteína as proteínas E e prM permanecem inseridas na membrana do RER, a proteína C acumula-se nos CL para posterior formação do nucleocapsídeo, e as proteínas não estruturais dão origem ao CR. F: montagem do DENV através da condensação do nucleocapsídeo com prM e E na membrana do RER; G: Os vírus imaturos são transportados em vesículas individuais através do complexo de Golgi e acumulados em vesículas endossomais; H: maturação da partícula viral. I: Exocitose da partícula viral madura (Mackenzie *et al*, 2001; Alberts *et al*, 2002; Beeck *et al*, 2003; Mukhopadhyay *et al*, 2005; Clyde *et al*, 2006; Lindenbach *et al*, 2007; Samsa *et al*, 2009).

1.2 Epidemiologia e Controle da Dengue

A possibilidade de estarmos em meio a uma explosão silenciosa de dengue vem sendo levantada desde o final do último século (Halstead, 1999). As alterações ecológicas decorrentes do pós-guerra com o rápido crescimento populacional e deterioração do ambiente urbano contribuíram significativamente para a disseminação do *Aedes aegypti* e dispersão dos diferentes sorotipos do DENV, resultando em uma pandemia global com dezenas de milhões de infecções por ano incluindo centenas de milhares de internações por Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e Síndrome do Choque por Dengue (SCD) (Halstead, 1988; Gubler, 1998).

O DENV é transmitido principalmente pelo *Aedes aegypti*, mas outras espécies do gênero *Aedes* como *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis* também podem transmitir a doença mesmo que menos eficientemente. Estes vetores estão envolvidos em diferentes ciclos de transmissão: o ciclo florestal enzoótico envolvendo *Aedes spp.* e primatas não humanos; o ciclo rural epidêmico envolvendo *Aedes spp.* e pequenas populações humanas; e o ciclo urbano endêmico/epidêmico envolvendo o *Ae. aegypti* e populações dos grandes centros urbanos tropicais (Gubler, 1998).

A primeira epidemia de dengue da qual se tem notícia ocorreu em 1779-1780 na Ásia, África e América do Norte; a ocorrência simultânea de surtos indica que vírus e vetores têm apresentado uma distribuição cosmopolita por mais de duzentos anos. Até então a dengue era considerada uma doença benigna de viajantes, os intervalos entre as grandes epidemias eram longos, de 10 a 40 anos, principalmente porque a única forma de transporte de vetores e vírus entre os centros populacionais era através das embarcações a vela (Gubler e Clark, 1995).

As epidemias se tornaram mais frequentes no Sudeste Asiático após a década de 50 em parte devido a Segunda Grande Guerra que possibilitou a expansão da distribuição geográfica do DENV, mas principalmente devido à urbanização inadequada no pós-guerra que forneceu as condições ideais para a propagação do vírus. Essas epidemias continuaram até os dias atuais, aumentando em magnitude uma após a outra. Infelizmente, apesar da expansão populacional e dos centros urbanos, a infraestrutura em saúde pública não foi capaz de acompanhar tal crescimento, agravando muito a situação. (Ooi e Gubler, 2008).

Logo, a expansão da área e aumento da frequência das epidemias levando a emergência global da dengue ocorreram devido a fatores relacionados ao crescimento populacional e urbanização desordenada, que propiciaram um maior contato com o vetor; à maior facilidade em viajar ao redor do mundo, que facilitou o transporte do vírus entre os países; e à ineficiência da maioria dos países em controlar o vetor e em desenvolver

programas para prevenir a transmissão epidêmica (Monath, 1994; Gubler e Clark, 1995; Gubler, 2002; Mackenzie *et al*, 2004).

Como consequência, a dengue é considerada hoje a principal arbovirose humana no mundo, com uma estimativa de 2,5 bilhões de pessoas vivendo em mais de 100 países e áreas onde há risco de transmissão da doença (Figura 1.5), e mais de 50 milhões de infecções ocorrendo anualmente com 500.000 casos de FHD e 22.000 mortes principalmente em crianças (WHO, 2009).

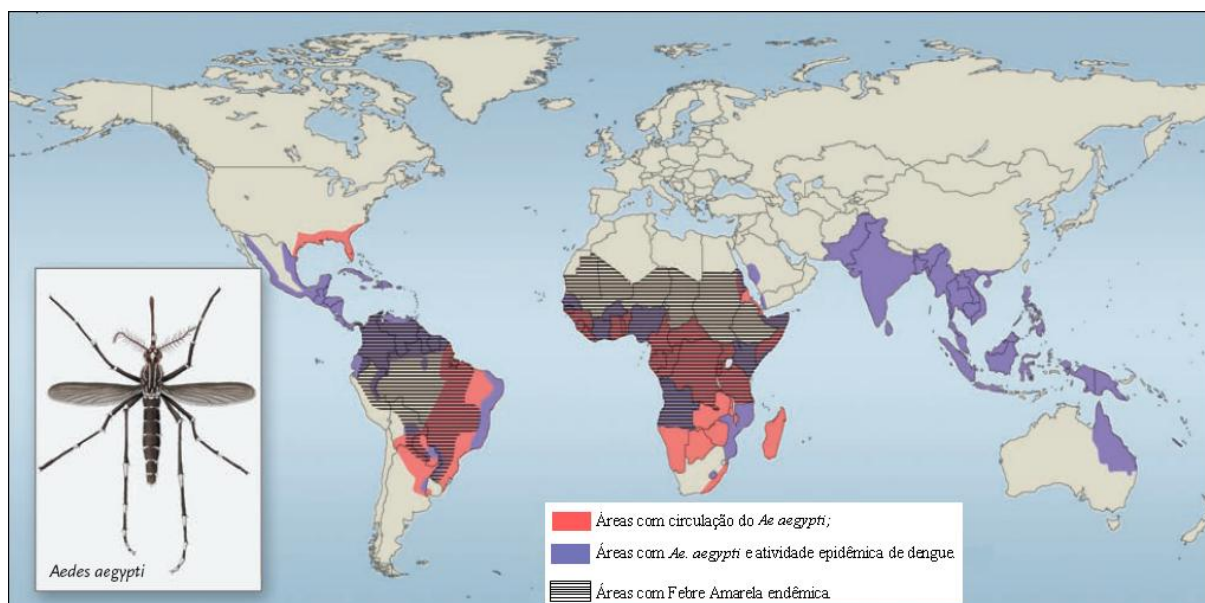


Figura 1.5: População sob risco de transmissão de dengue: Áreas com circulação do *Ae. Aegypti* e áreas com atividade epidêmica de dengue (Monath, 2007).

1.2.1 Dengue nas Américas

Diferente do que ocorreu no Sudeste Asiático, onde a Segunda Grande Guerra amplificou a população do *Ae. aegypti* e a distribuição do DENV, nas Américas o programa de controle da Febre Amarela organizado pela Organização Panamericana de Saúde (PAHO) nas décadas de 50 e 60 levou a erradicação do *Ae. Aegypti* da maioria dos países da América Central e do Sul. Porém, o programa de erradicação do *Ae. Aegypti* foi oficialmente descontinuado pelos Estados Unidos em 1970, levando a reinfestação dos países de onde o mosquito já havia sido erradicado (Gubler e Clark, 1995; Halstead, 2006).

De 1963 a 1977, alguns surtos associados aos DENV-2 e 3 foram confirmados no Caribe, Haiti, Republica Dominicana, Porto Rico e norte da América do Sul. Em 1977, a introdução do DENV-1 na Jamaica culminou em uma pandemia que se expandiu por países da América Central e do Sul, e posteriormente para México e Estados Unidos. Cerca de

702.000 casos de dengue foram notificados de 1977 a 1980, período no qual o DENV-1 foi praticamente o único sorotipo circulante (PAHO, 1989).

Em 1981 houve a introdução do DENV-2 causando uma epidemia com um elevado número de casos de FHD/SSD. Nesse mesmo ano o DENV-4 foi pela primeira vez reportado nas Américas, espalhando-se rapidamente pela região (Carrington *et al*, 2005).

A década de 80 foi marcada pela co-circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-4, e países como Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador e Peru, que até então não haviam experimentado uma epidemia de dengue ou estiveram livres da doença nas décadas anteriores, foram acometidos por grandes epidemias (PAHO, 1997).

Em 1994 o DENV-3 foi reintroduzido nas Américas após 16 anos de ausência. Esse sorotipo foi inicialmente detectado no Panamá, Nicarágua e posteriormente em outros países da América Central e México, causando numerosas epidemias. No México, a introdução do DENV-3 em 1995 foi associada com a gravidade da doença e foram registrados 385 casos de FHD com uma razão de fatalidade de 7,8% (Briseño-Garcia *et al*, 1996; PAHO, 1997).

1.2.2 Dengue no Brasil

Desde a reintrodução do DENV no país na década de 80, mais de 60% dos casos de dengue reportados nas Américas foram casos ocorridos no Brasil (Nogueira *et al*, 2007).

O primeiro surto ocorreu em 1981-1982 em Boa Vista (RR), com a notificação de 7.000 casos causados pelos sorotipos 1 e 4 (Osanai *et al*, 1983). Cinco anos após ter sido controlado esse primeiro surto, o DENV-1 foi isolado de uma epidemia no município de Nova Iguaçu (RJ) (Schatzmayr *et al*, 1986). A partir daí o vírus rapidamente se espalhou por outras cidades, e a dificuldade em implantar programas efetivos de combate ao vetor resultou na dispersão do DENV-1 por outros estados brasileiros (Nogueira *et al*, 2007).

A situação se agravou com a entrada do DENV-2 em Niterói (RJ) no ano de 1990, ano no qual foram registrados os primeiros casos de FHD no país (Nogueira *et al*, 1991).

Durante a década de 90 o DENV-2 se espalhou por diversos estados brasileiros, causando epidemias: em Araguaiana (TO) onde um estudo soroepidemiológico demonstrou uma positividade de 27,75% (Vasconcelos *et al*, 1993); em Fortaleza (CE) com uma soroprevalência de 24,4% (da Cunha *et al*, 1998); em cidades do sul da Bahia com 1.516 casos notificados em 1994 (Nogueira *et al*, 1995); entre outras.

Schatzmayr e colaboradores declararam em meados de 2000: “Até o momento apenas os sorotipos 1 e 2 circulam no Brasil, mas é grande o risco de introdução de um dos outros sorotipos, visto que estão presentes na América Central, Caribe e norte da América do Sul”.

De fato não tardou muito, pois em dezembro desse mesmo ano o DENV-3 foi isolado no município de Nova Iguaçu (RJ), sendo responsável pela maior e mais grave epidemia de dengue no Brasil até aquele momento (Nogueira *et al*, 2001).

Na epidemia de dengue ocorrida no estado do Rio de Janeiro em 2002 foram notificados 288.245 casos de dengue, sendo 1.831 casos de FHD com 91 evoluções para óbitos. Esses números superaram os 1.621 casos de FHD e 76 óbitos ocorridos em todo o país desde a reintrodução do DENV em 1986 (Nogueira *et al*, 2005).

De 2002 a 2008 ocorreram cerca de 2,5 milhões de casos de dengue no Brasil, sendo os maiores números de casos notificados nos anos de 2002 e 2008, com 697.998 e 585.769 casos respectivamente. Foram registrados cerca de 2.600 casos de FHD em 2002 com 150 óbitos, e cerca de 4.232 casos de FHD em 2008 com 491 óbitos (MS/SVS, 2009).

No ano de 2009 foram notificados 393.593 casos de dengue no Brasil, sendo 7.180 casos de dengue grave com 219 óbitos. No ano de 2010 foram confirmados 482.284 casos da doença até a semana epidemiológica 26, nesse período ocorreram 9.688 casos de dengue grave com 367 óbitos.

1.2.3 Estratégias e Programas de Controle

Enquanto vacinas contra outros flavivírus como febre amarela e vírus da encefalite japonesa já foram desenvolvidas, as vacinas contra dengue ainda encontram algumas dificuldades. A necessidade de uma vacina tetravalente que forneça imunidade duradoura, e a dificuldade em distinguir o desenvolvimento de anticorpos tipo-específico daqueles de reatividade cruzada são os principais desafios para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue atualmente; e apesar dos esforços para a produção de uma vacina tetravalente que apresente segurança e imunogenicidade a aprovação de uma vacina contra dengue só será viável nos próximos cinco a sete anos. Dessa forma, a única estratégia de controle da transmissão da dengue atualmente disponível é a redução da população de seu principal vetor, o *Ae. aegypti* (Whitehead *et al*, 2007; Monath, 2007; Ooi e Gubler, 2008, WHO, 2009).

De 1996 a 2002 o controle da dengue no Brasil foi feito de acordo com o Programa de Erradicação do *Ae. Aegypti* (PEAa). As ações de prevenção eram centradas quase que exclusivamente no combate ao vetor com o uso de inseticidas, estratégia que se mostrou incapaz de responder à complexidade da epidemiologia da dengue (MS/FUNASA, 2002).

No ano de 2001, diante de um cenário em que a incidência de dengue aumentava anualmente e a introdução do DENV-3 prenunciava um elevado risco de epidemias de dengue e de aumento nos casos de FHD, um seminário internacional foi organizado pelo MS em

parceria com a PAHO para avaliar as diversas experiências e elaborar um Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) (MS/FUNASA, 2002).

Em 2002 o MS instituiu o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Este programa procurou incorporar lições das experiências nacionais e internacionais no controle da dengue, enfatizando a necessidade de mudança nos modelos anteriores fundamentalmente em aspectos como a elaboração de um programa permanente, mobilização social e participação comunitária, fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica, e ênfase na implantação da estratégia de controle nos grandes centros urbanos.

1.3 Manifestações Clínicas e Diagnóstico

Após a infecção pelo DENV o período de incubação varia de 4 a 7 dias. A intensidade do quadro clínico pode variar desde infecção assintomática até quadros de febre indiferenciada que caracterizam a Febre do Dengue (FD), ou quadros graves de sangramentos e/ou choque que caracterizam a FHD e SCD. Cada um dos quatro sorotipos pode produzir qualquer um dos quadros clínicos (WHO, 1997; Torres, 2008).

A FD é geralmente auto-limitada e raramente fatal. A fase aguda dura de 3 a 7 dias, já a fase de convalescência pode se prolongar por semanas e pode estar associada com fraqueza e depressão principalmente em adultos, mas não são conhecidas sequelas permanentes (Gubler, 1998). As características clínicas podem envolver febre branda a alta, cefaléia, dor retroorbitária, mialgia, artralgia, náuseas, vômito, exantema e petéquias. Leucopenia e plaquetopenia são comumente observadas (WHO, 1997).

Sangramentos podem ser observados tanto na FD quanto na FHD, sendo esta última caracterizada por hepatomegalia, falência circulatória, plaquetopenia ($<100.000/\text{mm}^3$) com hemoconcentração e extravasamento de plasma com hipoproteinemia. A SCD por sua vez é caracterizada por sinais de falência circulatória como pele fria, cianose, pulso rápido e fraco (pressão de pulso $<20\text{mmHg}$), letargia e choque. O choque é de rápida instalação e pode levar ao óbito em 12 a 24 horas caso não seja realizada reposição volêmica (WHO, 1997).

Até 2008 a Organização mundial de Saúde (OMS) (1997) classificava FHD em quatro graus de gravidade (grau I – IV), sendo a FHD graus I e II diferenciada de FD por plaquetopenia com hemoconcentração, enquanto os quadros de evolução para o choque caracterizavam os graus III e IV de FHD. A Tabela 1.1 apresenta um resumo dos critérios para distinção de FD e os quatro graus de FHD.

No entanto, a descrição original da dengue e suas manifestações que levou aos presentes critérios foi baseada em casos pediátricos do Sudeste Asiático. Com a entrada da

dengue em novas regiões geográficas como a América Latina, e a ocorrência de casos de dengue em adultos, as manifestações clínicas parecem estar mudando, de forma que a aplicação estrita dos critérios da OMS falha em detectar um número significativo de pacientes com manifestações graves de dengue (Balmaseda *et al*, 2005; Bandyopadhyay *et al*, 2006).

Tabela 1.1: Resumo dos critérios da OMS para distinção de FD e FHD graus I a IV.

	Manifestações hemorrágicas	Permeabilidade vascular	Insuficiência circulatória	Plaquetopenia
FD	Variável	Normal	Ausente	Variável
FHD grau I	Prova do laço positiva	Aumentada	Ausente	<100.000/mm ³
FHD grau II	Sangramento espontâneo	Extravasamento de plasma*	Ausente	<100.000/mm ³
FHD grau III	Possíveis	Hipovolemia	PP**<20mmHg	<100.000/mm ³
FHD grau IV	Sangramento grave possível	Choque	PP e PS*** não detectáveis	<100.000/mm ³

* Aumento do hematócrito acima de 20% e hipoproteïnemia.

** Pressão de pulso.

*** Pressão sanguínea.

Atualmente a OMS considera a classificação em dengue clássica ou grave. Durante a fase crítica, caracterizada pela defervescência, pode ocorrer aumento da permeabilidade vascular acompanhado de progressiva leucopenia, plaquetopenia e aumento do hematócrito; a partir desse ponto a ausência de aumento significativo da permeabilidade vascular caracteriza a dengue clássica, enquanto aumento do extravasamento de plasma que leve ao choque, efusão pleural ou ascite, sangramentos importantes, ou disfunções orgânicas como hepatite, encefalite ou miocardite caracterizam a dengue grave (WHO, 2009).

Se tratando de manifestações não usuais, têm sido descritas manifestações neurológicas, dentre elas convulsão, encefalite, meningoencefalite, cefaléia persistente, mielite transversa, síndrome de Guillian-Barré, polineuropatia, neurite óptica, paralisia facial periférica e encefalopatia hemorrágica (Ferreira *et al*, 2005; de Souza *et al*, 2005); bem como envolvimento hepático com alterações nos níveis de aminotransferases e falência hepática (Uehara *et al*, 2006; de Souza *et al*, 2007).

1.3.1 Diagnóstico Clínico

A abordagem do paciente com suspeita de dengue deve seguir uma rotina de anamnese e exame físico, com obtenção de informações necessárias tanto para o estadiamento quanto para o planejamento terapêutico adequados (MS/SVS, 2007). Deve-se lembrar que o

diagnóstico clínico diferencial da dengue não é fácil, os achados clínicos nos pacientes frequentemente dependem da idade, e trombocitopenia e hematócrito elevados são comumente observados (WHO, 1997).

É considerado caso suspeito de dengue todo paciente que apresente doença febril aguda com duração de até sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos sintomas listados na Tabela 1.2 com ou sem a presença de sangramentos, além de ter estado em área endêmica nos últimos 15 dias. A possibilidade de gravidade do quadro clínico é indicada pela presença dos sinais de alerta ou sinais de choque, também listados na Tabela 1.2 (MS/SVS, 2007).

Tabela 1.2: Sinais e sintomas para caracterização do caso suspeito de dengue e da evolução para dengue grave segundo o Ministério da Saúde (2007)

Sintomas	Sinais de Alerta	Sinais de choque
- Cefaléia;	- Dor abdominal intensa e contínua;	- Hipotensão arterial;
- Dor retroorbitária;	- Vômitos persistentes;	- Pressão arterial convergente**;
- Mialgias;	- Hipotensão postural e/ou lipotímia;	- Extremidades frias;
- Artralgias;	- Hepatomegalia dolorosa;	- Cianose;
- Prostração; e	- Hemorragias importantes*;	- Pulso rápido e fino; e
- Exantema.	- Sonolência e/ou irritabilidade;	- Enchimento capilar lento***.
	- Diminuição da diurese;	
	- Diminuição repentina da temperatura corpórea ou hipotermia;	
	- Aumento repentino do hematócrito;	
	- Queda abrupta de plaquetas; e	
	- Desconforto respiratório.	

* Hematêmese e/ou melena;

** PA diferencial < 20mmHg;

*** > 2 segundos.

Considerando-se o amplo espectro clínico da dengue as principais doenças que fazem diagnóstico diferencial são: influenza, enterovirose, doenças exantemáticas (sarampo, rubéola, mononucleose infecciosa, citomegalovirose, entre outras), hepatites virais, abscesso hepático, abdome agudo, hantavirose, outras arboviroses (febre amarela, Mayaro, Oropouche entre outras), escarlatina, pneumonia, sepse, infecção urinária, meningococcemia, leptospirose, malária, salmonelose, riquetsioses, doença de Henoch-Schonlein, doença de Kawasaki, púrpura auto-imune, farmacodermias, alergias cutâneas, e outros agravos conforme a situação epidemiológica da região (MS/SVS, 2007).

O espectro de sintomas na infecção pelo DENV é um muito amplo e inespecífico, e um diagnóstico baseado somente em sintomas clínicos não é confiável. A confirmação laboratorial precoce do diagnóstico pode ser valiosa, pois em alguns pacientes a progressão para as formas graves e às vezes para o óbito pode ocorrer durante um período muito curto, nesse caso, intervenção precoce pode ser decisiva para a sobrevivência do paciente (WHO, 2009).

1.3.2 Diagnóstico Laboratorial

A confirmação do diagnóstico de dengue pode ser feita por meio do cultivo e isolamento viral; técnicas de biologia molecular para a detecção do genoma viral; técnicas de diagnóstico sorológico para determinação das imunoglobulinas (Ig) G e M; e as técnicas de identificação de antígenos virais, mais recentemente desenvolvidas (Torres, 2008).

O diagnóstico virológico é um método definitivo na identificação do patógeno. Para realização dessa técnica a coleta deve ser realizada no período febril, que geralmente não passa do quinto dia do início dos sintomas (MS/SVS, 2007). O sistema para isolamento mais utilizado consiste na inoculação de espécimes em cultura de célula *Aedes albopictus* clone C6/36 (Igarashi, 1978). O isolamento viral pode ser observado pela presença de efeito citopático (ECP) ou pela detecção de antígenos através do teste de imunofluorescência, sendo a tipagem realizada por meio de anticorpos monoclonais (Gubler *et al*, 1984).

As técnicas moleculares detectam e caracterizam o sorotipo infectante e podem confirmar o diagnóstico quando não é possível realizar o isolamento viral. Para tanto se utiliza transcrição reversa seguida da PCR com *primers* específicos para os quatro sorotipos do DENV (PCR *nested*), permitindo rápida detecção e tipagem (Morita *et al*, 1991; Lanciotti *et al*, 1992). O RT-PCR em tempo real também pode ser utilizado, lançando mão dos sistemas SYBER *Green* ou TaqMan, que permitem detectar e quantificar o RNA viral de forma sensível e específica (Holland *et al*, 1991; Heid *et al*, 1996; Laue *et al*, 1999).

O diagnóstico sorológico baseia-se na pesquisa de anticorpos específicos anti-dengue, detectáveis a partir do sexto dia do início dos sintomas (MS/SVS, 2007). As técnicas recomendadas são: inibição da hemaglutinação (HI) (Clarke e Casais, 1958); teste imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA) (Kuno *et al*, 1987); e o teste imunoenzimático para detecção de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA) (Miagostovich *et al*, 1999). Um aumento de quatro vezes ou mais nos níveis de anticorpos detectáveis por IgG ou HI em soros pareados indica infecção aguda ou recente, enquanto a ausência ou baixos níveis detectáveis de IgM indica infecção secundária. Atualmente, a razão de anticorpos IgM/IgG é mais comumente usada para distinguir infecções primárias e secundárias do que a HI (WHO, 2009).

Testes comerciais para pesquisa do antígeno NS1 por ELISA têm sido disponibilizados, possibilitando a confirmação laboratorial precoce da infecção pelo DENV ainda na fase aguda mesmo em laboratórios que não são equipados para o diagnóstico virológico e/ou molecular (Kumarasamy *et al*, 2007).

1.4 Patogênese

A inexistência de bons modelos animais que reproduzam sinais clínicos da dengue dificulta grandes avanços nos estudos em patogênese da doença. Primatas são hospedeiros naturais do DENV, mas os primatas não humanos como macacos rhesus e *Aotus* geralmente não mostram sinais da doença e desenvolvem viremia em títulos menores comparado ao ser humano (Gubler, 1998). Recentemente, modelos murinos humanizados (camundongos NOD/SCID reconstituídos com células hematopoiéticas humanas CD43+) desenvolveram sinais clínicos de FD como febre, plaquetopenia e eritema (Bente e Rico-Hesse, 2006); bem como camundongos BALB/c infectados com o DENV-2 cepa P23085, que foi adaptado ao animal adulto através de passagens intracerebrais em camundongos de diferentes idades (Souza *et al*, 2009; Assunção-Miranda *et al*, 2010). Esses modelos representam um importante avanço para as pesquisas em patogênese da dengue.

Apesar da patogênese dos quadros graves ainda não ter sido completamente esclarecida, diversas hipóteses têm sido propostas para explicá-la. A primeira delas é a da amplificação dependente de anticorpos (ADE – *antibody-dependent enhancement*) na qual a opsonização do vírus infectante por anticorpos IgG subneutralizantes, provenientes de uma infecção anterior por outro sorotipo de DENV, facilitaria a entrada do vírus em monócitos e macrófagos por meio da ligação aos receptores para Fc dessas células. Esta hipótese baseia-se na premissa de que quanto maior o número de células mononucleares infectadas, maiores serão os títulos de viremia durante a fase aguda, e mais severa será a doença no indivíduo (Halstead, 1988; Kliks *et al*, 1989; Vaughn, 2000).

As epidemias ocorridas nas últimas décadas em Cuba forneceram dados importantes para a hipótese da ADE. A dengue não era transmitida em Cuba desde 1945 até que em 1977-1978 houve uma epidemia de DENV-1 causando uma doença predominantemente branda. Com a introdução DENV-2 em 1981 ocorreu uma nova epidemia, dessa vez com quadros mais graves, e testes realizados em pacientes que desenvolveram FHD/SCD mostraram haver uma resposta sorológica secundária. Crianças menores de dois anos, nascidas depois da epidemia de 1977-1978, não desenvolveram as formas graves, e crianças menores de um ano que evoluíram para FHD/SCD eram nascidas de mães imunes e apresentavam anticorpos maternos circulantes (Halstead SB, 1988; Kouri *et al*, 1989). Análise dos dados da epidemia causada por DENV-2 ocorrida em 1997 mais uma vez confirma essa hipótese, e leva a crer que a ADE ocorre mesmo 18 anos após a infecção primária (Guzmán *et al*, 2002).

Experimentos *in vitro* têm demonstrado que amplificação da infecção de monócitos por anticorpos heterólogos leva a secreção de fatores capazes de ativar células endoteliais,

com aumento da expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina sendo o TNF- α um intermediário chave desse processo (Anderson *et al*, 1997). Em outro estudo a infecção de células THP-1 na presença de anticorpos subneutralizantes promoveu não apenas o aumento da replicação viral, mas também um aumento na expressão de IL-6 e IL-10, enquanto a expressão de IL-12, INF- γ e NO foram suprimidas. Esses estudos demonstram que não apenas os títulos de viremia como também o fenótipo das células infectadas é alterado pela ADE, contribuindo de forma importante para a patogênese da doença (Chareonsirisuthigul, 2007).

Anticorpos contra a proteína prM parecem ser um componente importante na ADE da infecção pelo DENV. A proteína prM é clivada durante a maturação e geralmente está pouco presente na superfície da partícula viral. Anticorpos anti-prM pouco contribuem para a neutralização do DENV mas são potentes amplificadores da infecção, podendo inclusive recuperar a infectividade de vírus imaturos ou de vírus com níveis relativamente altos de prM (Dejnirattisai *et al*, 2010).

Outra hipótese que contribui para a maior gravidade observada na infecção secundária é a do “Pecado Antigênico Original” (Mongkolsapaya *et al*, 2003). Durante a infecção secundária ocorre ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória da infecção prévia por outro sorotipo. A expansão dessas células T de baixa afinidade poderia superar a das células T de maior avidéz para o sorotipo infectante alterando a resposta por células T na infecção secundária, levando a secreção de citocinas próinflamatórias como INF- γ e TNF- α que poderiam atuar diretamente sobre o endotélio vascular resultando em extravasamento de plasma (Mangada *et al*, 2002; Pang *et al*, 2007; Mathew e Rothman, 2008).

Apesar de epidemiologicamente a maior gravidade da infecção sequencial se mostrar válida, as formas graves da doença podem ser observadas também nas infecções primárias. Araújo *et al* (2009b) encontraram 52,2% de infecções primárias entre os casos fatais de uma população de 42 pacientes infectados pelo DENV-3, de forma que apenas a ADE não poderia explicar todos os casos de doença grave na população estudada. De fato, dados recentes de epidemiologia molecular têm fornecido evidências de que diferenças entre as cepas virais são importantes em determinar a incidência de FHD na população sob transmissão do DENV (Rico-Hesse *et al*, 1997). Além disso, enquanto o DENV-2 genótipo Sudeste Asiático (DENV-2 SA) tem sido associado à doença grave, o DENV-2 genótipo Americano (DENV-2 AM) é comumente associado à doença branda (Leitmeyer *et al*, 1999, Cologna *et al*, 2005).

Diferenças nas seqüências da proteína E e nas regiões não codificantes 5' e 3' do genoma têm sido relacionadas com as diferenças da virulência entre DENV-2 SA e AM (Leitmeyer *et al*, 1999; Pryor *et al*, 2001). Já Halstead (2009), propõe que a menor incidência de casos graves observada nas infecções pelo DENV-2 AM pode ser compreendida pelo fato

desse genótipo não apresentar ADE após infecção primária por DENV-1, tendo em vista ambos os vírus apresentarem epítomos similares e os anticorpos heterólogos dirigirem-se a uma única estrutura antigênica expressa no DENV-2 AM, neutralizando assim o vírus.

Além da imunidade de células B e T, outros fatores do hospedeiro como alelos para antígenos leucocitários humanos (HLA – *human leukocyte antigen*), idade, e estado nutricional também estariam relacionados com a susceptibilidade a doença grave (Mathew e Rothman, 2008). O alelo HLA-DQ1, por exemplo, foi recentemente correlacionado à doença pelo DENV-1 em epidemias ocorridas no Paraná, sul do Brasil, encontrou-se um *odds ratio* de 2,4, indicando que a presença desse alelo favorece a suscetibilidade a doença (Polizel *et al*, 2004). Em outro estudo observou-se um aumento significativo do alelo TNF-308A em pacientes com dengue, bem como aumentados níveis de TNF- α , possivelmente relacionados às alterações endoteliais (Fernandez-Mestre *et al*, 2004).

Outra hipótese para patogenia da dengue é a do mimetismo molecular, que propõe uma reação auto-imune como mecanismo imunopatogênico na FHD. Um estudo de Lin *et al* (2005) demonstrou a reatividade cruzada de anticorpos anti-NS1 com células endoteliais, levando a ativação dessas células com produção de IL-6, IL-8 e MCP-1, e aumento na expressão de ICAM-1 e na capacidade dessas células de aderirem aos PBMC. Os níveis de autoanticorpos anti-plaqueta e anti-célula endotelial são mais elevados em soros de pacientes com FHD/SCD do que em soros de pacientes com FD e, além disso, tem sido demonstrado que esses autoanticorpos podem promover lise mediada por complemento em plaquetas. Dessa forma, os autoanticorpos parecem desempenhar um papel importante na patogênese da dengue com efeitos tanto sobre plaquetas quanto sobre o endotélio (Lin *et al*, 2006). O papel do mimetismo molecular na plaquetopenia associada ao DENV será abordado no tópico 1.3.3.

As células dendríticas também parecem ser cruciais para o desencadeamento da imunopatogênese da dengue. As células dendríticas são alvos primários da infecção pelo DENV, que induz maturação e ativação dessas células levando a secreção de citocinas e quimiocinas como RANTES, MIP-1 β , MCP-1, IP-10, TNF- α , IL-6, IL-1, IL-7, IL-3, IFN- α , CXCL9, CXCL10 e CXCL11. Essas citocinas, principalmente TNF- α e IFN- α , atuam ativando células dendríticas não infectadas, células T de memória e células endoteliais. O envolvimento das células dendríticas ativadas no recrutamento e na ativação das células T pode ter implicações importantes para a patogenia da doença ao dar início a resposta imune adaptativa durante a infecção (Libraty *et al*, 2001; Ho *et al*, 2001; Nightingale *et al*, 2008; Dejnirattisai *et al*, 2008).

Boonnak *et al* (2008) demonstraram que a infecção de células dendríticas pelo DENV pode ser amplificada na presença de anticorpos heterólogos. A ADE parece ocorrer apenas

nas células dendríticas maduras e parece ser mediada por FC γ RIIa. Nesse estudo a infecção mediada por anticorpos levou a um aumento tanto da replicação viral quanto da produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6.

Enfim, diante das diversas hipóteses propostas para explicar a patogenia da FHD/SCD parece óbvio que nenhuma delas opera sozinha. Kouri *et al* (1987) propuseram uma hipótese integral na qual uma combinação de fatores de risco individuais, epidemiológicos e virais determinaria as condições para o aparecimento das formas graves da doença. Esta hipótese nos parece razoável visto que muitas das hipóteses propostas consideram mecanismos imunes com uma tempestade de citocinas que atuam diretamente no endotélio levando ao aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de fluido e conseqüentemente hemoconcentração e hipotensão (Pang *et al*, 2007).

Um estudo foi realizado por nosso grupo no intuito de avaliar o papel das citocinas plasmáticas nas formas grave e branda de dengue. Níveis elevados de IL-1 β , INF- γ , IL-6, IL-13, IL-7 e GM-CSF foram associados com dengue grave, sendo o INF- γ independentemente associado com gravidade e o MIP-1 β com bom prognóstico. Um mecanismo proposto para o papel protetor do MIP-1 β seria o seu efeito quimioatrativo e ativador de células NK, que são bastante eficientes no controle do vírus, e para o efeito deletério do INF- γ seria o seu papel na ativação de monócitos, células dendríticas e células T, que poderiam produzir fatores como TNF- α , IL-1 β e MCP-1 capazes de atuar diretamente sobre o endotélio levando a extravasamento de plasma e hemoconcentração (Bozza *et al*, 2008).

1.5 Plaquetopenia

1.5.1 Megacariocitopoese e Plaquetopoese

Os megacariócitos são células grandes (>60 μ m), de linhagem mielóide, com um núcleo altamente poliplóide e que, diferente de outras células, permanecem na medula quando maduras (Alberts *et al*, 2002). A poliploidia é gerada após diversos ciclos de replicação do DNA sem divisão celular, logo em seguida ocorre um processo de maturação do citoplasma em que se desenvolvem proteínas, organelas e sistemas de membranas específicos, incluindo o desenvolvimento do sistema de demarcação de membranas, montagem do sistema tubular denso e formação dos grânulos (Italiano e Hartwig, 2007). Normalmente, os megacariócitos maduros se situam próximos aos sinusóides e estendem extensões citoplasmáticas, denominadas próplaquetas, através dos canais; as plaquetas brotam dessas extensões e são levadas pela corrente sanguínea (Alberts *et al*, 2002).

O processo de formação de plaquetas a partir dos megacariócitos exibe certas características relacionadas a apoptose como reorganização do citoesqueleto, condensação e enrugamento da membrana (Italiano e Hartwig, 2007). De Botton *et al* (2002) demonstraram ativação de caspases 3 e 9 nos megacariócitos maduros, bem como o bloqueio da formação de próplaquetas diante da inibição dessas caspases. A exposição de fosfatidilserina é detectável apenas na membrana ao redor do núcleo e não nas pró-plaquetas, sendo a apoptose responsável pela destruição apenas dos megacariócitos senescentes após a plaquetogênese.

As plaquetas são as menores células circulantes no sangue, em média apresentam de 2 a 5 μm e diâmetro. Estas células possuem uma meia-vida de 7 a 10 dias, mas durante a hemostasia o processo de morte celular pode ser iniciado antecipadamente (White, 2007).

Ao microscópio eletrônico a superfície da plaqueta quiescente apresenta-se rugosa (figura 1.6 A) e com pequenas aberturas conectadas ao sistema canalicular aberto. Essas pequenas dobras de membranas são importantes durante a ativação plaquetária, permitindo o aumento da superfície e mudança de forma da célula (White, 2007). O citoesqueleto é formado por microtúbulos dinâmicos responsáveis pela capacidade das plaquetas de alterar sua forma durante processos fisiológicos, como a formação de um arranjo radial e de filopodia durante o processo de ativação (Figura 6 B e C) (Patel-Hett, 2008).

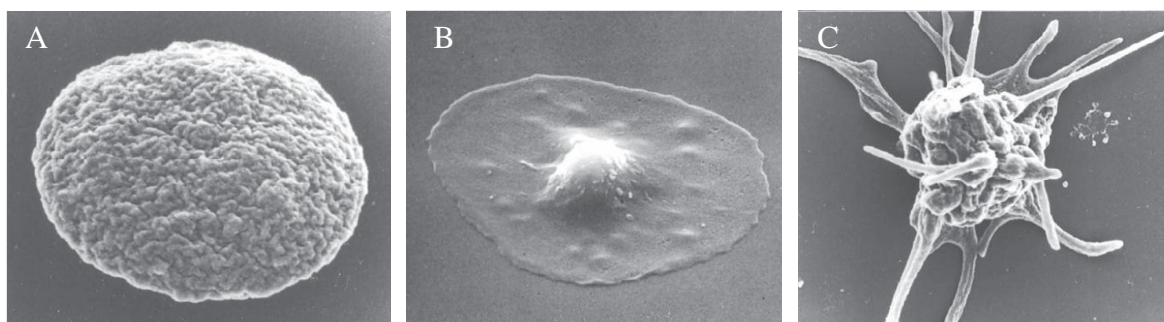


Figura 1.6: Morfologia da plaqueta quiescente e ativada. A: plaqueta quiescente com formato discóide, observa-se a superfície com aparência rugosa (aumento x 30.000); B: plaqueta ativada exibindo aspecto espalhado lamelar (aumento x 9.000); C: Plaqueta ativada em um estágio mais avançado exibindo filopodia (aumento x 13.000) (White, 2007).

Entre os diversos fatores de crescimento hematopoiético com atividade plaquetopoiética identificados (GM-CSF, IL-3, IL-6, e IL-11) o mais importante é a trombopoetina (ligante de c-Mpl). A trombopoetina consiste de uma glicoproteína sintetizada primariamente no fígado, seus níveis aumentam em resposta à redução da quantidade de plaquetas e permanecem elevados durante plaquetopenia persistente (Kurte e Begley, 2002). A ligação da trombopoetina ao c-Mpl pode modular duas vias de sinalização intracelular, MAPK e Jak/STAT, resultando em estímulo ao crescimento/sobrevivência e indução da proliferação dos megacariócitos, respectivamente (Ritchie *et al*, 1999). Contudo, apesar da c-

Mpl estar presente em megacariócitos imaturos e plaquetas, este receptor é progressivamente reduzido com a maturação dos megacariócitos, sendo assim a trombopoetina apresenta um efeito muito discreto sobre a liberação de plaquetas a partir de megacariócitos maduros (Kuter e Begley, 2002).

1.5.2 Mecanismos Fisiopatológicos de Plaquetopenia

A plaquetopenia pode surgir em decorrência de deficiência genética (desordens congênitas da função plaquetária), ação de agentes infecciosos, ou indução farmacológica; podendo ocorrer como resultado da inibição da proliferação dos megacariócitos e conseqüentemente da produção de plaquetas, ou pela destruição plaquetária na circulação periférica. As plaquetopenias congênitas são resultados de deficiências em receptores de membrana plaquetários ou na via de transdução de sinal, com comprometimento de receptores, proteínas G e efetores intracelulares. Já a plaquetopenia induzida farmacologicamente resulta da inibição farmacológica desses receptores, vias ou seus agonistas (George e Colman, 2006).

A destruição plaquetária periférica pode ocorrer por mecanismos imunomediados nos quais anticorpos ligados a superfície das plaquetas resultariam no aumento da depuração de plaquetas por células fagocíticas do sistema reticuloendotelial. O aumento da depuração de plaquetas mediada por associação de imunoglobulinas (PAIgM e PAIgG) é denominado púrpura trombocitopênica imune, que pode ser induzida farmacologicamente (plaquetopenia imunomediada induzida por droga), quando a ligação de uma droga a glicoproteínas plaquetárias induz a formação de neoantígenos; ou idiopática (púrpura trombocitopênica idiopática – PTI) quando esse aumento na depuração de plaquetas é mediado por autoanticorpos, geralmente provenientes de desordem autoimune, infecção viral ou doença linfoproliferativa (Chong e Kwok, 2006; Mintzer *et al*, 2009).

Aproximadamente dois terços das crianças com púrpura trombocitopênica idiopática apresenta um histórico de doença infecciosa pouco antes do início da plaquetopenia, dentre as quais Varicela Zoster, Epstein-Barr, influenza, rubeola e HIV têm sido relatadas. O mimetismo molecular entre antígenos virais e glicoproteínas plaquetárias tem sido sugerido como um mecanismo para púrpura trombocitopenica idiopática associada a infecções virais (Rand e Wright, 1998; Tanaka *et al*, 2003).

Mas outros mecanismos além da destruição imunológica de plaquetas são propostos para contribuir com a plaquetopenia em infecções virais, dentre eles: sequestro de plaquetas pelo baço aumentado; ativação plaquetária inapropriada; prejuízos na produção de

trombopoetina e na megacariocitopoiese; e efeitos diretos de vírus sobre as plaquetas. Esse último mecanismo é cada vez mais evidente e diversos receptores para interação com vírus têm sido descritos em plaquetas, entre eles integrina α_{IIb}/β_1 para rotavírus, integrina α_{IIb}/β_{III} ou α_V/β_{III} para adenovírus e hantavírus, CR2 para Epstein-Barr, GPVI para HCV, além de DC-SIGN, CCR1, CCR3, CCR4, CXCR4 e CLEC2 para HIV (Flaujac *et al*, 2010).

De fato, plaquetas têm sido relatadas como um sítio extrahepático do Vírus da Hepatite C (HCV), que também é um membro da família flaviviridae. A infecção plaquetária pelo HCV não apenas é considerada um dos mecanismos patológicos da plaquetopenia associada à hepatite C, como também está relacionada com o aumento do risco de falha após o tratamento (de Almeida *et al*, 2009).

A infecção de megacariócitos pelo HIV também tem sido sugerida como um mecanismo para trombocitopenia em pacientes HIV positivos. A expressão de CD4 foi demonstrada em megacariócitos, sendo esta molécula capaz de promover a ligação do HIV e levar a infecção dessas células (Louache *et al*, 1991; Kouri *et al*, 1993).

Fica evidente, portanto, que a interação entre vírus e plaquetas é um importante fenômeno fisiopatológico de plaquetopenia, e apesar de múltiplos mecanismos estarem envolvidos, alguns mecanismos possivelmente responsáveis por plaquetopenia ainda não são totalmente compreendidos, principalmente se tratando de interações diretas entre partículas virais e plaquetas/megacariócitos (Flaujac *et al*, 2010).

1.5.3 Plaquetopenia Associada ao DENV

Plaquetopenia acentuada e aumento da permeabilidade vascular definem as formas graves da infecção pelo DENV, sendo as maiores prevalências de plaquetopenia e as contagens mais baixas de plaquetas encontradas nas formas mais graves da doença (Tabela 1.3). Os níveis de plaquetas se correlacionam tanto com as alterações da permeabilidade vascular quanto com a recuperação clínica dos indivíduos; mas os mecanismos responsáveis pela trombocitopenia associada a dengue, bem como o papel das plaquetas na patogenese da doença, permanecem incompletamente esclarecidos (Mourão *et al*, 2007).

A supressão medular seria o primeiro mecanismo de plaquetopenia associada ao DENV, com início entre 2 a 4 dias da infecção. A infecção de células estromais na medula óssea pelo DENV pode causar a supressão da hematopoiese em diversas linhagens celulares, inclusive da megacariocitopoese (La Russa e Innis, 1995; Rothwell *et al*, 1996). A infecção de megacariócitos também foi demonstrada *in vitro*, levando a inibição da maturação dessas células e, conseqüentemente, da plaquetopoiese (Basu *et al*, 2008). Apesar disso, um

mecanismo periférico de plaquetopenia parece acompanhar o surgimento da resposta adaptativa durante a fase aguda da doença (La Russa e Innis, 1995; Rothwell *et al*, 1996).

Tabela 1.3: Plaquetopenia em pacientes com FD, FHD e SCD segundo estudos hospitalares.

Autores	Local	FD	FHD	SCD
Percentual de pacientes plaquetopênicos				
Kalayanarooj <i>et al</i> (1997)	Children's Hospital, Bangkok	16%	82%	–
Kalayanarooj <i>et al</i> (2002)	Children's Hospital, Bangkok	50,2%	93,8%	92,1%
Chairulfatah <i>et al</i> (2003)	Hospitais de Bandung, Indonésia	–	47%	74%
Mourão <i>et al</i> (2007)	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil	21,1%*	45,5%*	–
Bozza <i>et al</i> (2008)**	Hospitais de Niterói (RJ), Brasil	63%		72%
Média da contagem de plaquetas (células/mm ³)				
Kalayanarooj <i>et al</i> (2002)	Children's Hospital, Bangkok	123.599	63.855	53.452
Libraty <i>et al</i> (2002)	Hospitais da Tailândia	129.000	48.000	–
Valero <i>et al</i> (2002)	Hospitais de Zulia, Venezuela	168.200	63.570	–

*Pacientes com plaquetopenia grave (< 50.000/mm³);

**Pacientes classificados em dengue clássica ou dengue grave.

Anticorpos anti-E de reatividade cruzada com o plasminogênio e integrinas plaquetárias poderiam estar relacionados com hemorragia em dengue (Rothman, 2004), e imunocomplexos associados com ativação do complemento podem ser detectados em pacientes com FHD apesar de antígenos virais não serem encontrados nesses complexos (Theofilopoulos *et al*, 1976). Um mecanismo de coagulopatia induzido por anticorpos anti-NS1, no qual anticorpos ligados a plaquetas poderiam acelerar a depuração plaquetária levando ao desenvolvimento de plaquetopenia tem sido proposto (Sun *et al*, 2007).

Anticorpos contra a proteína NS1 do DENV-2 apresentaram reatividade cruzada com fibrinogênio e integrinas da superfície de plaquetas e de células endoteliais *in vitro*. Anticorpos que responderam fortemente para NS1 apresentaram respostas similares para fibrinogênio e para plaquetas, enquanto os anticorpos que responderam moderadamente e/ou fracamente para NS1 apresentaram respostas superiores para fibrinogênio e plaquetas. Supõe-se que esses autoanticorpos possam formar imunocomplexos circulantes com proteínas de coagulação sanguínea e causar os efeitos patológicos em plaquetas e células endoteliais, o que poderia explicar a plaquetopenia e o extravasamento de plasma observados durante a FHD/SCD (Falconar, 1996; Falconar, 2007).

Em um estudo clínico realizado por Saito *et al* (2004), níveis elevados de imunoglobulinas associadas a plaquetas (PAIgM e PAIgG) haviam sido correlacionados com

plaquetopenia durante a fase aguda de infecções secundárias pelo DENV. Em outro estudo, o mesmo grupo demonstrou um aumento significativo da fagocitose de plaquetas por macrófagos *in vitro* durante a fase aguda de infecções secundárias pelo DENV, estando este aumento na fagocitose inversamente correlacionado com a contagem de plaquetas dos doadores. Porém diante de resultados prévios em que o tratamento com altas doses de imunoglobulina intravenosa falhou em recuperar a contagem de plaquetas dos pacientes com FD/FHD, o grupo conclui que a depuração plaquetária por macrófagos através dos receptores para Fc γ não é um mecanismo primário de plaquetopenia associada ao DENV (Dimaano *et al*, 2007; Honda *et al*, 2009).

Ensaio *in vitro* de infecção de células endoteliais pelo DENV-2 demonstraram haver um aumento da expressão de E-selectina nas células infectadas, bem como da aderência de plaquetas a essas células. As plaquetas, por sua vez, mostraram-se ativadas após interagirem com as células endoteliais infectadas pelo DENV. Esse fenômeno de interação entre plaquetas e células endoteliais poderia contribuir para a plaquetopenia associada ao DENV (Krishnamurti *et al*, 2002).

Estudos recentes sugerem que a interação direta entre o DENV e plaquetas possa induzir alterações morfológicas associadas à ativação plaquetária como mudanças na estrutura da membrana, dilatação do sistema canalicular aberto, degranulação e filopodia; bem como um aumento na expressão de P-selectina e na capacidade de ligação ao fibrinogênio (Ghosh *et al*, 2008). Outro estudo detectou o RNA viral dos quatro sorotipos de DENV e demonstrou, por microscopia eletrônica, a presença de partículas *dengue-like* em plaquetas isoladas de pacientes com FD e FHD, enquanto ensaios *in vitro* permitiram a detecção de produtos virais (proteínas NS1 e E) associados a plaquetas (Noisakran *et al*, 2009a e 2009b).

Considerando que a interação direta entre DENV e plaquetas, ou até mesmo a infecção plaquetária pelo DENV, possa contribuir para a plaquetopenia associada ao DENV, novos estudos são necessários para determinar as vias metabólicas envolvidas na ativação plaquetária pelo DENV e o quanto a infecção ou interação plaqueta-vírus são requeridas para iniciar esse processo de ativação celular.

1.6 Função Mitocondrial na Fisiologia Plaquetária e na Infecção pelo DENV

Uma importante função da mitocôndria na maioria das células eucarióticas é a fosforilação oxidativa, por meio da qual a cadeia transportadora de elétrons (CTE) produz um gradiente eletroquímico que é, posteriormente, direcionado para a síntese de ATP pela ATP-

sinetase. A cadeia transportadora de elétrons tem como receptor final de elétrons o O_2 , que é então convertido em H_2O (Figura 1.7).

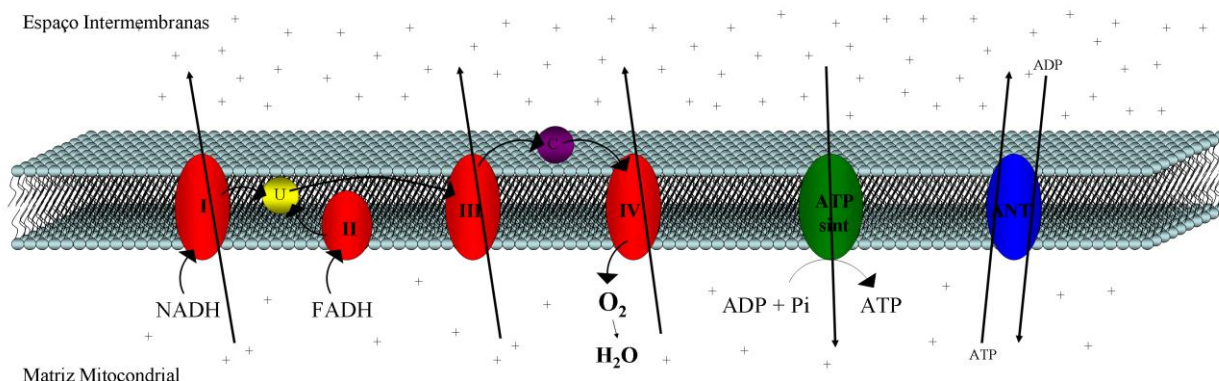


Figura 1.7: Esquema representativo da fosforilação oxidativa. Em vermelho os complexos enzimáticos da CTE (complexo I – NADH desidrogenase, II – succinato desidrogenase, III – citocromo C redutase, IV – citocromo C oxidase); em verde a ATP-sintase (complexo V); e em azul o trocador de nucleotídeos adenínicos (ANT). U = ubiquinona, C = citocromo C. Os elétrons entram na CTE pelos complexos I e II, a ubiquinona transporta os elétrons dos complexos I e II para o complexo III, o citocromo C do complexo III para o complexo IV, e o O_2 recebe os elétrons do complexo IV sendo então convertido em H_2O ; os complexos I, III, e IV bombeiam prótons para o espaço intermembranas durante a passagem dos elétrons pela cadeia; a ATP-sintase usa o gradiente eletroquímico gerado pela CTE para fosforilar ADP em ATP; o ANT retira o ATP e repõe e ADP da matriz mitocondrial.

É atualmente reconhecida a contribuição da mitocôndria na apoptose, um processo associado a morte celular em células nucleadas e recentemente descrito em plaquetas. Um balanço entre BCL- X_L e BAK regula a meia-vida de plaquetas na circulação periférica, com o envelhecimento plaquetário ocorre a degradação de BCL- X_L iniciando a via intrínseca da apoptose e consequente depuração plaquetária (Mason *et al*, 2007). Nesse sentido, diminuição do potencial de membrana mitocondrial é um importante parâmetro para a qualidade de plaquetas que se tornam apoptóticas durante a estocagem (Verhoeven *et al*, 2005). Além disso, redução do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), exposição de fosfatidilserina e ativação de caspases têm sido descritas na ativação plaquetária por diversos agonistas (Leytin *et al*, 2006; Lopez 2008).

Estudos recentes demonstraram que alterações na bioenergética de mitocôndrias de células hepáticas infectadas pelo DENV, incluindo despolarização do $\Delta\Psi_m$ e aumento no consumo de oxigênio, parecem ser sinais precoces da ativação da cascata de apoptose, sugerindo que desbalanço energético esteja associado à infecção (El-Bacha *et al*, 2007). Considerando o envolvimento da função mitocondrial e apoptose na fisiologia plaquetária, a disfunção mitocondrial induzida diretamente pelo DENV, como foi recentemente observado em hepatócitos, pode representar um ponto chave na interação plaqueta-DENV, merecendo, portanto, ser detalhadamente estudada.

2. JUSTIFICATIVAS

O diagnóstico clínico de FD e FHD não é fácil, o espectro de sintomas é muito amplo e em alguns casos a progressão da doença de clássica para grave, e às vezes para o óbito, pode ocorrer em um período muito curto. Porém não existe atualmente apoio laboratorial para o prognóstico de FHD/SCD e os testes laboratoriais têm sido úteis apenas para confirmar o diagnóstico (WHO 2009). Plaquetopenia e hemoconcentração definem as formas graves da doença, e os níveis de plaquetas se correlacionam tanto com a gravidade quanto com progressão para cura, mas os mecanismos responsáveis pela plaquetopenia associada ao DENV permanecem incompletamente esclarecidos (Mourão *et al*, 2007).

A interação direta do DENV com plaquetas promovendo ativação plaquetária parece ser um importante mecanismo periférico da trombocitopenia associada ao DENV (Ghosh *et al* 2008), mas o processo de ativação plaquetária diretamente induzidas pelo DENV necessita de confirmação e expansão dos aspectos funcionais, de forma que o papel da interação plaqueta-DENV na patogênese da doença e na plaquetopenia associada à dengue permanecem pouco esclarecidos. Logo, a identificação e compreensão dos mecanismos e vias metabólicas envolvidos nesse processo, bem como suas repercussões, serão fundamentais para a determinação de marcadores de gravidade e para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, visando prevenção e/ou resolução das formas graves, assim como para a redução da morbidade e mortalidade.

Dessa forma, este trabalho pretende contribuir no estabelecimento do vínculo entre a infecção viral, metabolismo energético plaquetário e ativação plaquetária, uma vez que procuramos explorar os efeitos do DENV sobre o metabolismo plaquetário e identificar possíveis mecanismos relacionados à plaquetopenia em dengue.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os efeitos diretos do DENV sobre a ativação e o metabolismo energético de plaquetas humanas a partir do modelo *in vitro* de interação plaqueta-DENV.

3.2 Objetivos Específicos

A) Avaliar a ativação plaquetária e secreção de citocinas após interação de plaquetas com o DENV-2 através de análises por citometria de fluxo, microscopia de fluorescência, ELISA e Luminex;

B) Avaliar a função mitocondrial em plaquetas quiescentes e ativadas através de oxigrafia de alta resolução e citometria de fluxo;

C) Avaliar disfunção mitocondrial e morte em plaquetas expostas ao DENV-2 através de citometria de fluxo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de Material Biológico

O sangue foi colhido com escalpe 21G em uma seringa de 60 mL contendo 7 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) até o volume final de 50 mL. A coleta do material foi realizada por meio de punção venosa em doadores saudáveis mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I) de acordo com projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC) sob o parecer consubstanciado – 016/2010 e protocolo 006.0.009.000-09. Foram incluídos no estudo 19 doadores, maiores de 18 anos, que não tenham apresentado até 15 dias antes da coleta qualquer quadro de doença febril ou outros sintomas, e que não tenham feito uso de antiinflamatórios não esteroidais. Gestantes foram excluídas da participação no estudo.

4.2 Isolamento de Plaquetas

Plaquetas foram isoladas usando o método de Hamburger e McEver (1990). O volume de 50 mL de sangue total foi centrifugado a 800 rpm (200 x g) por 20 minutos a temperatura ambiente. A camada correspondente ao plasma rico em plaquetas (PRP) foi coletada e a esta foi adicionada PGE₁ (prostaglandina E₁, Cayman Chemical 13010.1), que alcançou uma concentração final de 0,3 µM, de forma a evitar a ativação plaquetária durante o processo de centrifugação. O PRP foi então centrifugado à 1.500 (730 x g) rpm por 20 minutos a temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante e as plaquetas foram ressuspensas em 25 mL de PSG (5mM de PIPES, 145 mM de NaCl, 4mM de KCl, 50µM de Na₂HPO₄, 1mM de MgCl₂·6H₂O, 5,5mM de glicose; pH 6,8). Mais uma vez PGE₁ foi adicionada para a concentração final de 0,3 µM. Após mais uma centrifugação à 1500 rpm (730 x g) por 20 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as plaquetas foram ressuspensas em meio M199 (meio 199 com EBSS, L-Glutamina e HEPES; Lonza 12-117F) para a concentração final de 1x10⁹ células/mL, a contagem foi realizada em centrífuga para microhematócrito, cada linha do cartão de hematócrito corresponde a 1x10⁹ plaquetas humanas.

O nível de pureza das plaquetas isoladas foi avaliado por meio de citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur) utilizando um anticorpo monoclonal para CD-41a conjugado à fluoresceína isotiocianato (FITC mouse anti-human CD41a, eBioscience 11-0419). Foram

adquiridos 10.000 eventos os quais mostraram ter mais de 99% de células CD41a positivas (Figura 4.1).

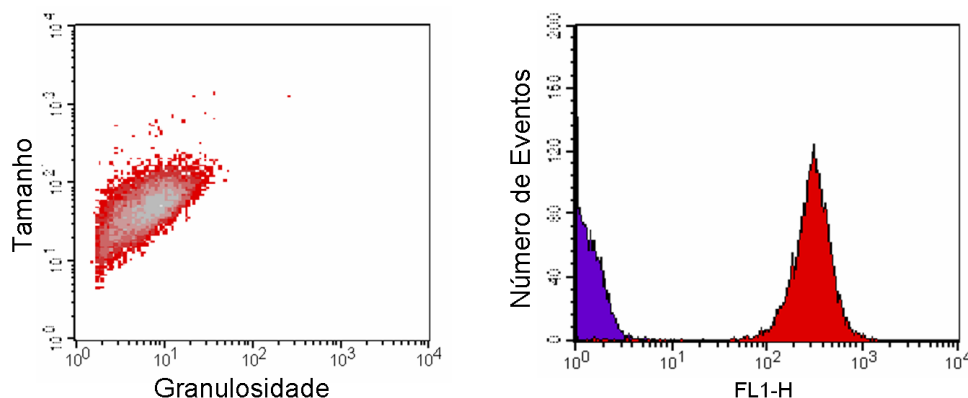


Figura 4.1: Análise do nível de pureza das plaquetas isoladas. A) População de células purificadas analisadas quanto ao tamanho e granulosidade; B) Perfil de expressão de CD41a nas células isoladas (em azul células não marcadas e em vermelho células marcadas com CD41a-FITC). Observou-se mais de 99% de positividade para CD41a nas plaquetas isoladas.

4.3 Manutenção das Plaquetas Isoladas em Cultura

As plaquetas foram mantidas em meio M199, em um tubo de polipropileno, em estufa com temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Mantidas nessas condições as células são viáveis por até 24 h.

4.4 Produção e Armazenamento do DENV-2

O DENV-2 16681 foi replicado em células de mosquito *Ae.albopictus* clone C6/36 adaptadas ao crescimento a 33° C e cultivadas em meio L-15 (Leibovitz) suplementado com triptose fosfato 0,3%, glutamina 0,02%, solução de aminoácidos não-essenciais MEM 1% e soro fetal bovino 5%. Depois de seis dias de propagação, o sobrenadante contendo o vírus foi separado por centrifugação a 1000g por 5 minutos e coletado, o título viral foi verificado por meio de ensaio de placa em células BHK, alíquotas foram armazenadas em nitrogênio líquido e descongeladas apenas no momento do uso (Assunção-Miranda *et al*, 2010). Vírus inativados foram obtidos incubando-se o DENV-2 por 1 h a 56° C (Souza *et al*, 2009). O sobrenadante de células C6/36 não infectadas cultivadas nas mesmas condições que as células nas quais o vírus replicou (Mock) foi usado como controle nos experimentos realizados. Vírus gentilmente cedido por Halstead em 1996 e produzido em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Vírus – UFRJ.

4.5 Interação Plaqueta-DENV

Plaquetas (1×10^6 ou 5×10^6 células) foram incubadas com o DENV-2 ou com DENV-2 inativado em multiplicidade de infecção (moi) de 1,0 PFU/célula e mantidas por 6 ou 24 h em estufa a 37° C e atmosfera com 5% de CO₂. Mock foi utilizado como controle no mesmo volume que a suspensão viral administrada.

4.6 Avaliação da Ativação Plaquetária por Microscopia de Fluorescência

Placa LabTek de permanox de 8 poços foi bloqueada com BSA 2% por 1 hora a 37° C. Plaquetas (5×10^6 células por poço) foram adicionadas e aderidas espontaneamente aos poços da placa, e incubadas por 24 h a 37° C com DENV-2 ou controles. As células foram então fixadas incubando-se com paraformaldeído 4% por 20 min a TA, permeabilizadas com Triton 0,1% por 5 min a TA, e bloqueadas com soro de cabra 10% por 1 hora a TA, sendo realizadas três lavagens com PBS entre uma etapa e outra. As células foram então marcadas com faloidina (1:100). A lâmina foi montada em meio de montagem Vactashield (Vector Laboratories Inc., Ca. 94010) e analisada em microscópio de fluorescência. As imagens foram adquiridas com o software Image-Pro Plus versão 7.0.

4.7 Citometria de Fluxo

4.7.1 Avaliação da Ativação Plaquetária por Citometria de Fluxo

A avaliação da expressão de P-selectina na superfície de plaquetas foi utilizada como marcador da ativação plaquetária. A análise foi feita por meio de citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur) utilizando anticorpo monoclonal para P-selectina (CD62-P) conjugado à fluoresceína isotiocianato (FITC mouse anti-human CD62-P, BD Pharminogen 555523). Plaquetas expostas ao DENV ou controles foram analisadas após incubação com o anticorpo diluído 1:50 por 30 minutos a temperatura ambiente protegidas da luz.

4.7.2 Medida do Potencial de Membrana Mitocondrial

O $\Delta\psi_m$ foi avaliado em plaquetas intactas (não permeabilizadas) utilizando a sonda fluorescente tetrametilrodamina etil éster (TMRE) (Molecular Probes, Invitrogen) através de citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur), sendo a excitação a 488nm e a emissão na faixa

do laranja/vermelho 590 nm. Plaquetas expostas ao DENV ou controles (10^6 células por tubo) foram incubadas por 10 minutos à 37°C protegidas da luz em 500µL de tampão Tyrode modificado (137 mM de NaCl, 2,68 mM de KCl, 5 mM de HEPES, 1 mM de MgCl₂, 11,9 mM de NaHCO₃, 0,42 mM de NaH₂PO₄ e 0,56 mM de glicose; pH 7,4) contendo 100 nM de TMRE e analisadas por meio de citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur).

4.7.3 Avaliação da Exposição de Fosfatidilserina

A externalização de fosfatidilserina foi avaliada através de marcação com anexina V conjugada à fluoresceína isotiocianato (TACSTM Annexin V-FITC, TA5532) de acordo com especificações do fabricante. Tubos para microcentrífuga contendo plaquetas expostas ao DENV-2 ou controles (10^6 células por tubo) foram centrifugados por 5 min a 7.000 rpm (3.000 x g). As células foram ressuspensas em 100µL de reagente de incubação com anexina V (10µL tampão de ligação 10x [100 mM de HEPES, 1,5 M de NaCl, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, e 18mM de CaCl₂], 1µL de anexina V-FITC, e 89µL de água destilada estéril), e incubadas por 15 min a TA protegidas da luz. Foram adicionados 400µL de tampão de ligação em cada tubo e aquisição foi realizada em citômetro de fluxo (BD FACScan Excalibur) até uma hora após a marcação.

4.8 Medida de Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi medido em oxígrafo de alta resolução da marca Oroboros (Oroboros oxygraph-2k). Plaquetas intactas (5×10^8 células/mL) foram incubadas em 2 mL de volume final de meio M199. O fluxo de oxigênio foi medido usando apenas os substratos respiratórios endógenos celulares em plaquetas incubadas com os inibidoras da CTE Antimicina-A e cianeto de potássio, com o inibidor da ATP-sintase oligomicina, ou com o desacoplador FCCP. O protocolo para medida do consumo de oxigênio em plaquetas foi padronizado por nosso grupo em colaboração com o Laboratório de Bioquímica Redox – UFRJ e com o Laboratório de Bioenergética Aplicada – UFRJ.

4.9 Dosagem de Citocinas

4.9.1 ELISA

Os níveis de RANTES (CCL5) nos sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV-2 ou controles por 24 h a 37° C foram determinados pelo método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) utilizando anticorpos monoclonais específicos para RANTES humano de acordo com as especificações do fabricante (R&D Systems).

4.9.2 Ensaio Multiplex

Os níveis de citocinas nos sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV-2 ou controles por 24 h a 37° C foram dosados por meio de ensaio de citocinas multiplex (Luminex[®]) através de microesferas conjugadas a anticorpos monoclonais específicos para a citocina alvo, de acordo com especificação do fabricante (Human Multi-Cytokine Flex Kit, Upstate, cat. 48-504 a 48-515) As citocinas analisadas foram interleucina 4 (IL-4), IL-13, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) e *tumour necrosis factor* α (TNF- α). As microesferas foram encubadas em 50 μ L de sobrenadante em uma placa de 96 poços com filtro por 1 h e 30 min em agitador de placa, depois lavadas e incubadas com anticorpos de detecção biotinilados também por 1 h e 30 min em agitador de placa protegidas da luz e, finalmente, foram incubadas com estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE) por 30 min em agitador de placa protegidas da luz. Citocinas humanas recombinantes (2,2 a 9.000 pg/mL para MCP-1 e 1,22 a 5.000 pg/mL para as demais citocinas) foram usadas para estabelecer uma curva padrão. A leitura foi realizada por meio do sistema Luminex[®] (Bio-Plex Workstation, Bio-Rad Laboratories; Rede de Plataformas Tecnológicas PDTIS, subunidade RPT03C/Luminex RJ) e do software Bio-Plex Manager.

4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.1 (GraphPad software, San Diego, CA), também utilizado para a construção dos gráficos. A significância estatística entre grupos foi determinada através de análise pareada em teste t de Student, sendo considerado significativo valores de $p < 0,05$. A correlação entre variáveis foi analisada através do coeficiente de Pearson para amostragem com distribuição normal.

5 RESULTADOS

5.1 Plaquetas Encontram-se Ativadas Após Interação com o DENV-2

Plaquetas foram incubadas com meio 199, com Mock, com 0,5 U/mL de trombina ou com DENV-2 (m.o.i 1,0 PFU/cel.) por 24 h a 37° C e em seguida foram observadas em microscópio de fluorescência para análise de morfologia e perfil de ativação das células. A marcação de plaquetas com faloidina, uma sonda que se liga fortemente aos filamentos de actina da célula, possibilitou observar que as plaquetas expostas ao DENV-2 apresentavam características inerentes à ativação plaquetária como espalhamento, filopodia e agregação (Figura 5.1 D). As mesmas características foram observadas em plaquetas ativadas com trombina (controle positivo) (Figura 5.1 C), mas não foram observadas em plaquetas incubadas apenas com meio 199 (controle negativo) (Figura 5.1 A). Células incubadas com mock não apresentaram características de células ativadas (Figura 5.1 B), sugerindo que a interação do DENV diretamente com plaquetas promove a ativação dessas células.

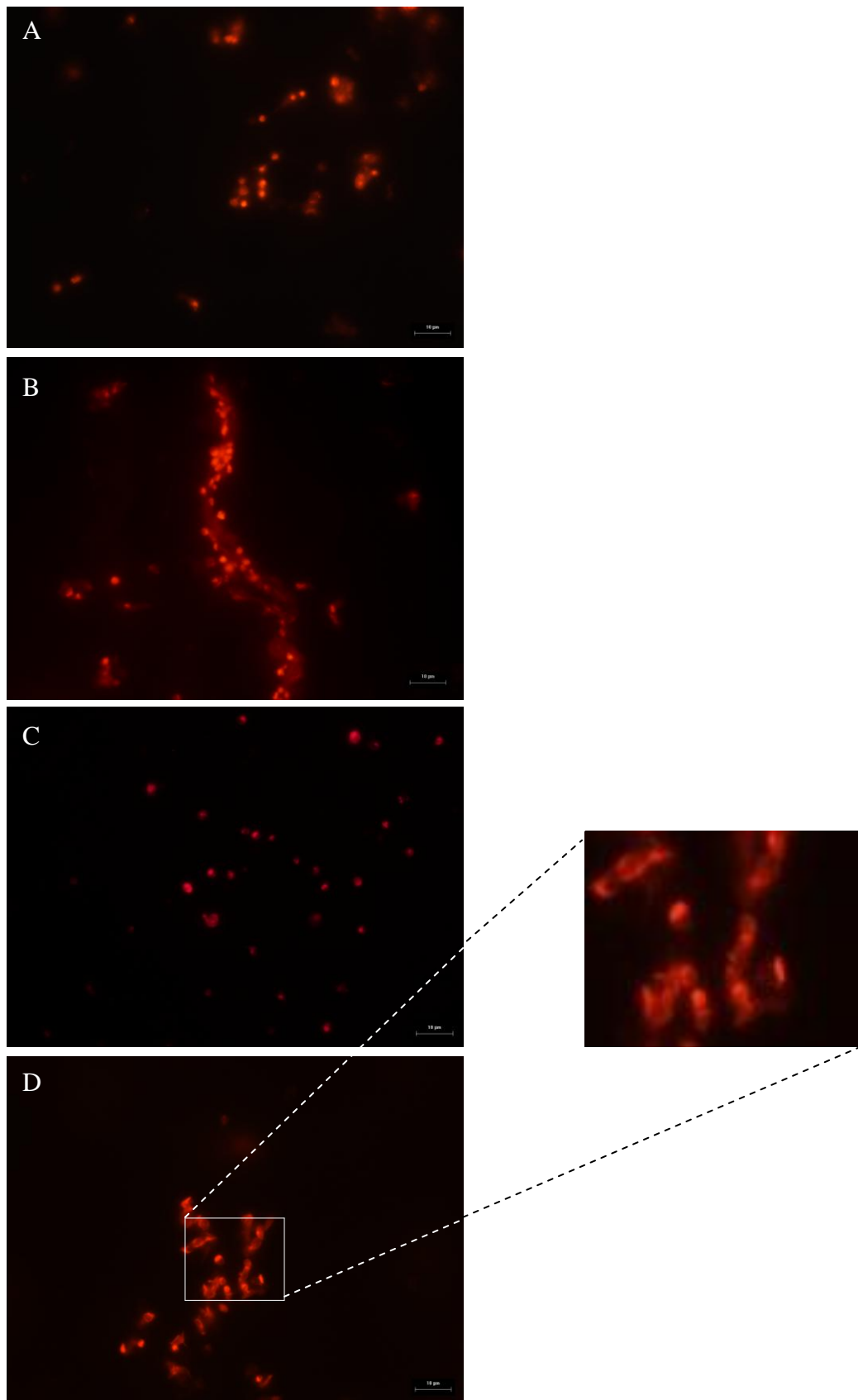


Figura 5.1: Fotomicrografias de plaquetas expostas ao DENV-2 e controles. 5×10^6 plaquetas foram incubadas por 24 h a 37°C com meio 199 (A), mock (B), 0,5 U/mL de trombina (C) ou DENV-2 (m.o.i. = 1,0 PFU/célula) (D) e marcadas com faloidina. As células incubadas com meio ou com mock apresentaram um aspecto de plaquetas quiescentes, exibindo formato discóide e não exibindo agregação; já as plaquetas incubadas com trombina e com DENV-2 apresentaram características de plaquetas ativadas, exibindo aspecto lamelar espalhado, filopodia e agregação. As fotomicrografias foram adquiridas com objetiva de 100 x; barras representam medidas de 10 μm .

A expressão de P-selectina (CD62-P) na superfície da plaqueta é um dos principais marcadores de ativação plaquetária. A presença desse marcador foi avaliada por citometria de fluxo em plaquetas incubadas por 6 h a 37° C com DENV-2 (m.o.i. de 1,0 PFU/cel), com mock ou com DENV-2 inativado por calor (m.o.i. de 1,0 PFU/cel). Plaquetas incubadas com 0,2 U/mL de trombina por 15 min a 37° C (células mantidas em meio 199 por 5 h e 45 min a 37° C antes da adição de trombina) foram usadas como controle positivo, e plaquetas quiescentes (incubadas apenas com meio 199 por 6 h a 37° C) como controle negativo.

Observou-se um aumento significativo da expressão de P-selectina nas plaquetas expostas ao DENV-2 assim como nas plaquetas ativadas por trombina, mas não nas plaquetas incubadas com mock ou com o vírus inativado (Figura 5.2), confirmando a ativação plaquetária diretamente induzida pelo DENV.

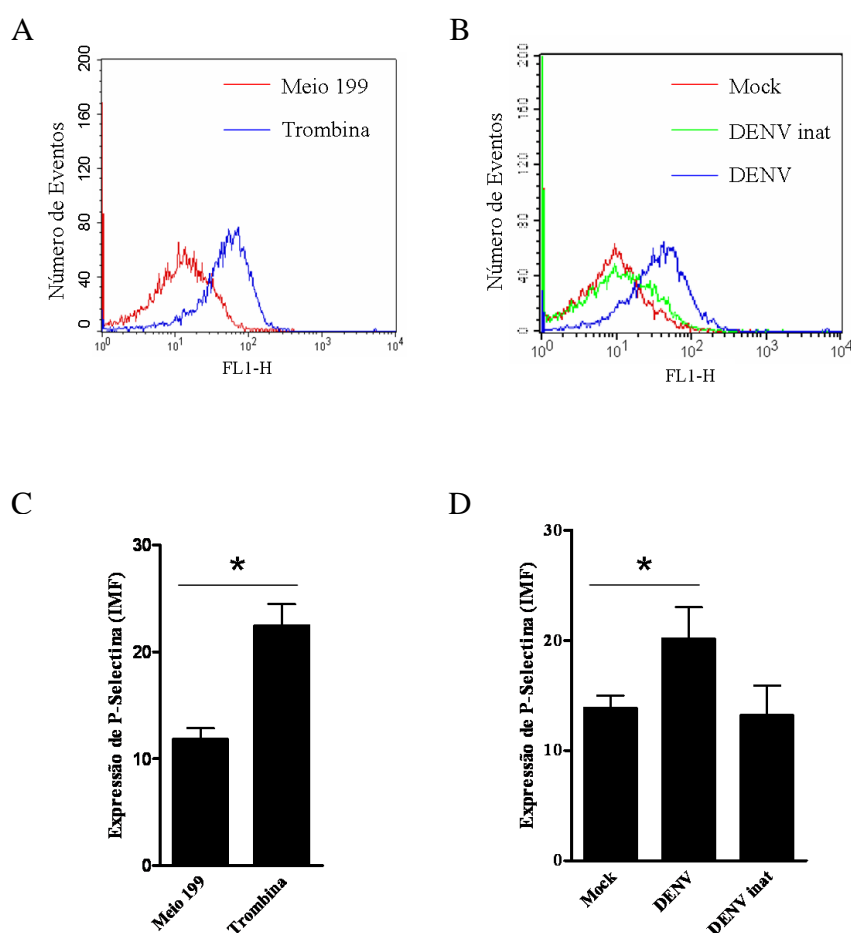


Figura 5.2: Expressão de P-selectina (CD62-P) em plaquetas expostas ao DENV-2 ou controles. Plaquetas (1×10^6) foram incubadas por 6 h a 37° C com meio 199 ou trombina (0,2 U/mL) (painéis A e C), ou com Mock, DENV-2 (moi = 1,0 PFU/célula) ou DENV-2 inativado (moi = 1,0 PFU/célula) (painéis B e D), marcadas com anti-CD62-P-FITC (1:50) e analisadas por citometria de fluxo. A e B: histogramas representativos. C e D: barras representam médias de três experimentos individuais com doadores diferentes \pm desvio padrão. Diferenças significativas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$).

5.2 Estímulo com DENV-2 Induz secreção de Citocinas em Plaquetas Humanas

Os níveis das citocinas IL-4, IL-13, GM-CSF, MCP-1, TNF- α e RANTES foram dosados no sobrenadante de plaquetas incubadas por 24 h a 37° C com DENV-2 (m.o.i = 1,0 PFU/célula) ou com mock. Os sobrenadantes de plaquetas incubadas por 24 h a 37° C com 0,5 U/mL de trombina e plaquetas incubadas apenas com meio 199 foram usados como controles positivo e negativo respectivamente. Os sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV-2 ou controles foram recolhidos e congelados a -20° C até o momento do uso.

As concentrações de GM-CSF, MCP-1, TNF- α , IL-4 e IL-13 encontraram-se significativamente elevadas nos sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV-2 quando comparadas às plaquetas incubadas com mock (Figura 5.3 D, E, F, J e K). Interessantemente, não foi observado aumento significativo nos níveis dessas citocinas nos sobrenadantes de plaquetas ativadas com trombina em relação às plaquetas incubadas apenas com meio. As células ativadas por trombina esboçaram um discreto aumento nas concentrações de GM-CSF, MCP-1 e TNF- α , mas esse aumento não foi significativo (Figura 5.3 A, B, C, G e H).

As concentrações de RANTES por sua vez apresentaram-se significativamente aumentadas nos sobrenadantes de células ativadas por trombina em relação aos de células incubadas apenas com meio, enquanto não foi observado aumento significativo nos níveis de RANTES nos sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV-2 quando comparados com os de células incubadas com mock (Figura 5.3 I e L).

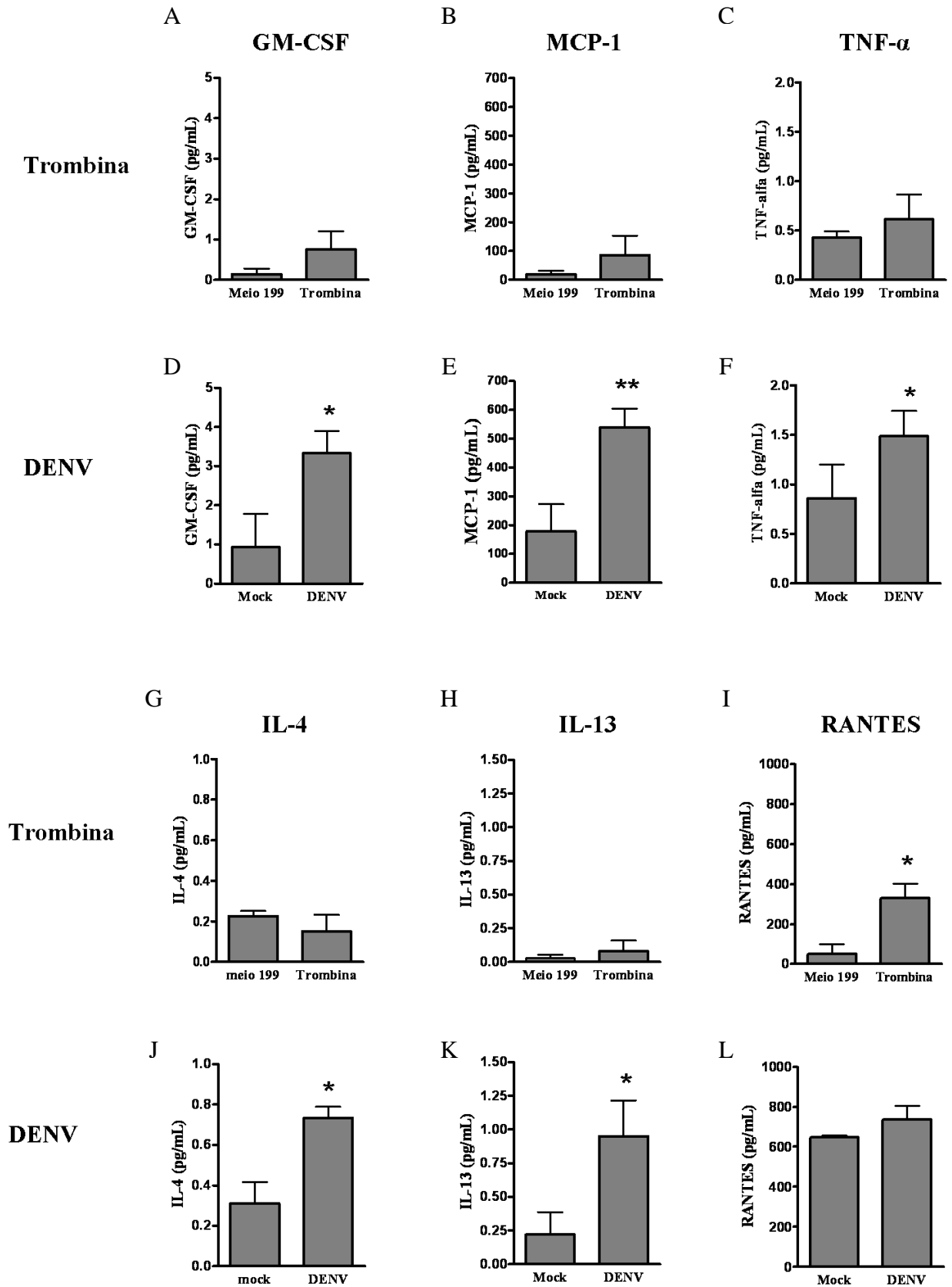


Figura 5.3: Níveis de citocinas nos sobrenadantes de plaquetas incubadas com DENV-2 ou controles. As citocinas foram dosadas em sobrenadantes de plaquetas incubadas por 24 h a 37° C com Meio 199, trombina (0,5 U/mL), mock ou DENV-2 (moi = 1,0 PFU/célula) por ensaio Luminex (IL-4, IL-13, GM-CSF, MCP-1 e TNF-α) ou por ELISA (RANTES). Barras representam médias de três experimentos individuais com doadores diferentes ± desvio padrão. Diferenças significativas estão representadas por asteriscos (* p < 0,05; ** p < 0,01).

5.3 Análise da Função Mitocondrial da Plaqueta Quiescente e Ativada

Tendo em vista determinar a função mitocondrial plaquetária, os parâmetros respiratórios celulares foram avaliados através da medida do consumo de oxigênio por oxigrafia de alta resolução, e do $\Delta\Psi_m$ por citometria de fluxo, possibilitando uma análise tanto da atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons quanto da permeabilidade das membranas mitocondriais.

5.3.1 A ATP-Sintase Plaquetária Pode Reverter Sua Atividade e Manter o $\Delta\Psi_m$ Diante da Interrupção da Cadeia Transportadora de Elétrons

O fluxo de oxigênio e o $\Delta\Psi_m$ foram medidos na presença de três drogas: o FCCP (carbonil ciano p-trifluorometoxifenilhidrazona) (1 μ M), um ionóforo de prótons, que foi utilizado nos experimentos como desacoplador (controle positivo do colapso do $\Delta\Psi_m$); a antimicina-A (3 μ g/mL), inibidor da citocromo C redutase (complexo III); e a oligomicina (1 μ g/mL), inibidor da ATP-sintase (complexo V); que foram utilizadas para determinar os perfis inibitórios de complexos enzimáticos da CTE para mitocôndrias de plaquetas intactas. O fluxo de oxigênio foi medido ainda na presença de cianeto de potássio (2 mM), um inibidor da transferência de elétrons da citocromo oxidase (complexo IV) para o oxigênio molecular.

A antimicina-A em uma dose que claramente diminui o fluxo de oxigênio (Figura 5.4 A), não apenas falhou em promover a queda do $\Delta\Psi_m$, mas provocou um aumento significativo deste (Figura 9 B e C). Propomos que esse efeito possa ser explicado por uma reversão de atividade da $F_{[0]}F_{[1]}$ ATP-sintase, o que estaria mantendo o gradiente de prótons diante da interrupção da cadeia transportadora de elétrons. Essa hipótese foi confirmada quando Antimicina-A e Oligomicina foram administradas simultaneamente, promovendo a queda do $\Delta\Psi_m$ das plaquetas também de forma significativa (Figura 5.4 B e C).

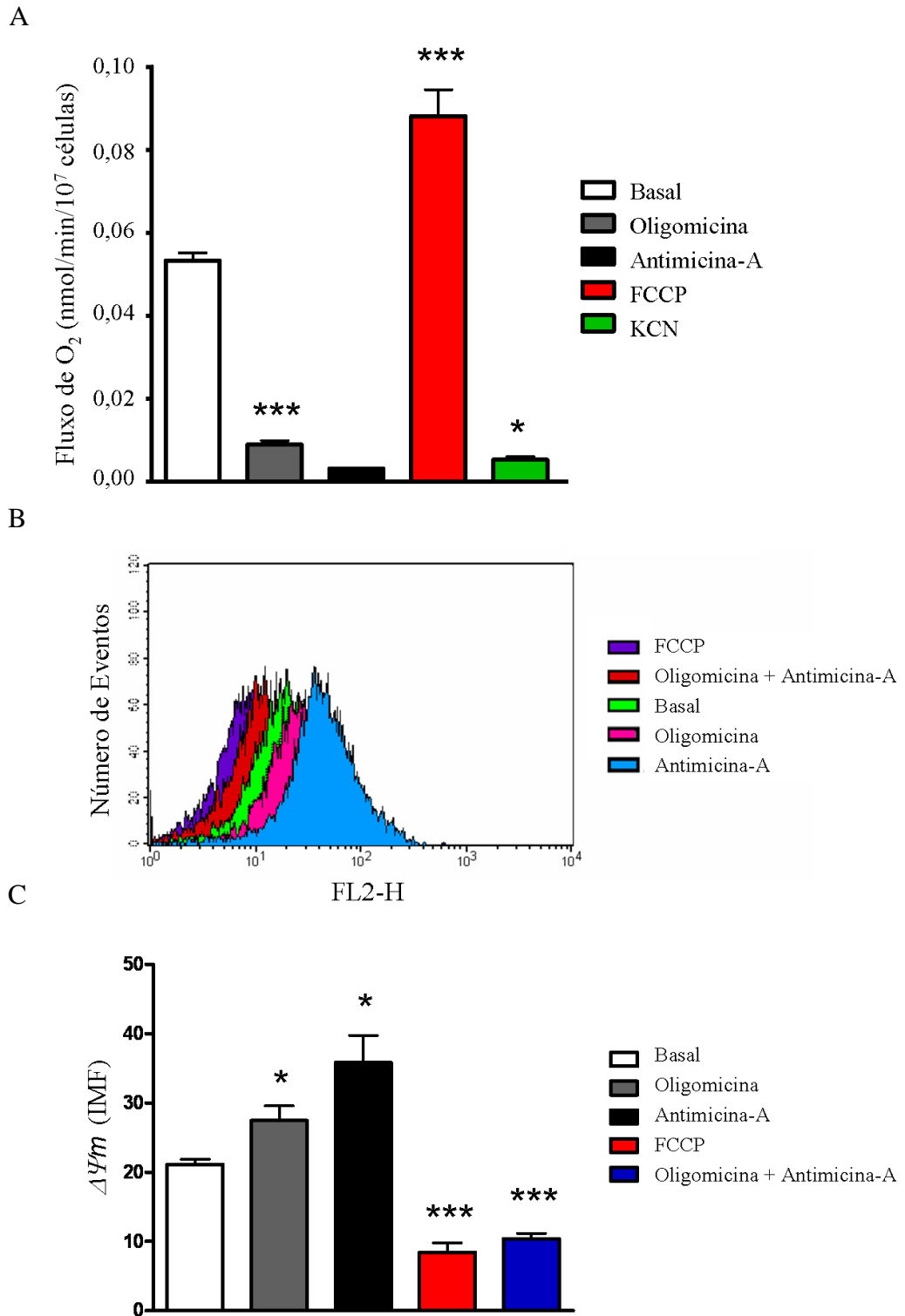


Figura 5.4: Resposta da função mitocondrial plaquetária a drogas inibidoras dos complexos enzimáticos mitocondriais e ao desacoplador FCCP. A: Efeitos da oligomicina (1 $\mu\text{g/mL}$), da antimicina-A (3 $\mu\text{g/mL}$), do FCCP (1 μM) e do cianeto de Potássio (2mM) no consumo de oxigênio de plaquetas quiescentes; as células foram mantidas a 37° C em meio contendo 5mM de glicose até o fluxo de O₂ se estabilizar (valor obtido como basal), após a adição das drogas esperou-se cerca de 10 minutos para que o fluxo de O₂ se estabilizasse novamente e obtiveram-se os valores para cada droga. B e C: Efeitos da oligomicina (1 $\mu\text{g/mL}$), da antimicina-A (3 $\mu\text{g/mL}$), e do FCCP (1 μM) sobre o $\Delta\Psi_m$ de plaquetas quiescentes; células marcadas com a sonda TMRE foram incubadas com as drogas por 10 minutos e as medidas de intensidade média de fluorescência obtidas por citometria de fluxo. Barras representam médias de três a nove experimentos individuais com doadores diferentes \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3.2 A Ativação Plaquetária por Trombina Promove Diminuição do $\Delta\Psi_m$ e Aumento no Fluxo de O_2 de Maneira Dependente da Dose

O fluxo de oxigênio e o $\Delta\Psi_m$ foram medidos em plaquetas ativadas com diferentes concentrações de trombina. Observou-se uma diminuição do $\Delta\Psi_m$ e aumento no consumo de oxigênio diante da ativação plaquetária com crescentes concentrações do agonista, até uma concentração limite a partir da qual o $\Delta\Psi_m$ começa a aumentar e o consumo de oxigênio a decrescer (Figura 5.5 A – C). A relação entre potencial de membrana mitocondrial e fluxo de oxigênio demonstrou haver uma correlação negativa ($r = -0,99$) estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Figura 5.5 D), sugerindo que estes eventos não ocorrem de forma independente. Esses resultados são compatíveis com o desacoplamento da fosforilação oxidativa.

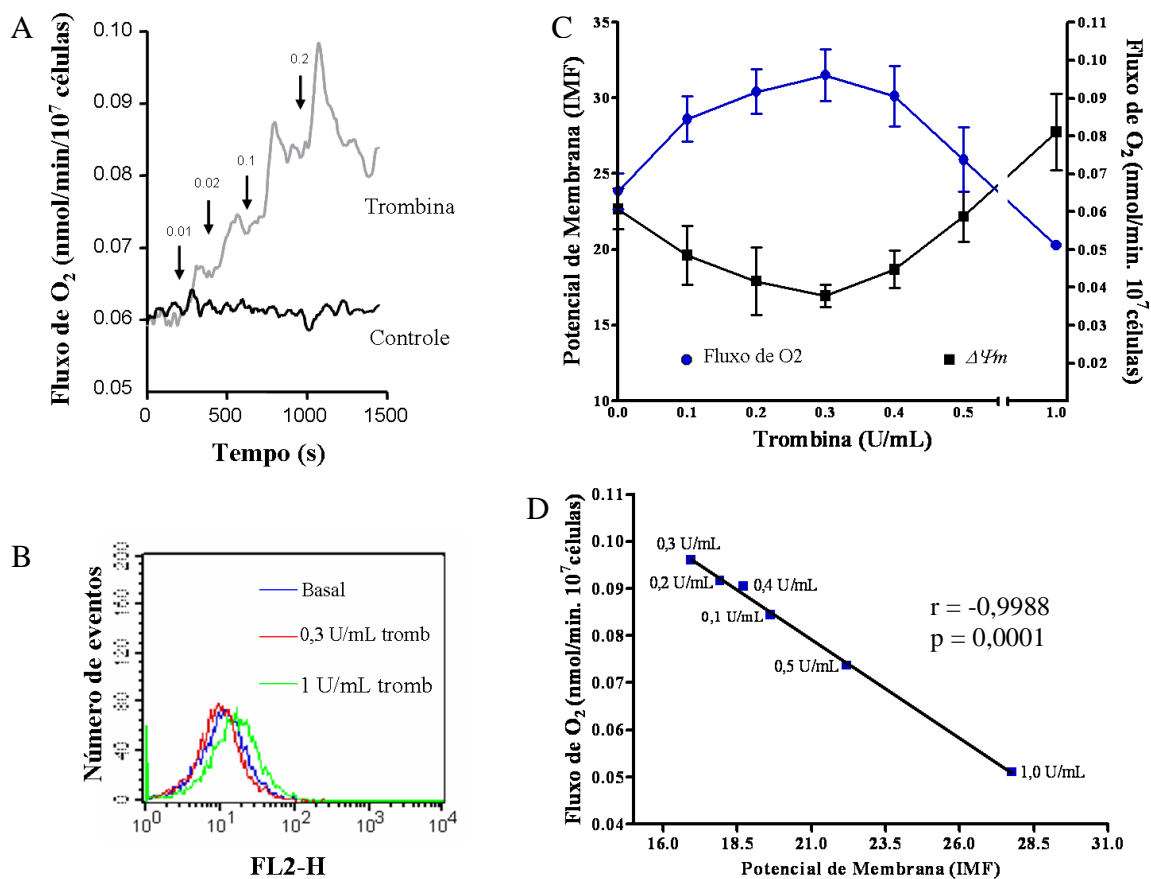


Figura 5.5: Função mitocondrial em plaquetas ativadas por trombina. A: Fluxo de O_2 de acordo com a concentração de trombina; as células foram mantidas a 37° C em um meio contendo 5mM de glicose até que se estabilizasse o fluxo de O_2 (valor obtido como basal), após a adição de crescentes concentrações (0,1 a 1,0 U/mL) de trombina esperou-se cerca de 10 minutos para que o fluxo de O_2 se estabilizasse novamente e obtiveram-se os valores para cada concentração de trombina. B: $\Delta\Psi_m$ de acordo com a concentração de trombina; plaquetas marcadas com a sonda fluorescente TMRE foram incubadas com trombina (0,1 a 1,0 U/mL) por 15 minutos e as medidas de intensidade média de fluorescência obtidas por citometria de fluxo. C: relação do fluxo de O_2 e do $\Delta\Psi_m$ com a concentração de trombina; pontos representam médias de até 9 experimentos independentes com doadores distintos \pm desvio padrão. D: relação do fluxo de O_2 com o $\Delta\Psi_m$; correlação foi obtida através do coeficiente de Pearson ($r = -0,99$; $p < 0,0001$).

Um mecanismo possível para explicar o fenômeno observado é a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP). O MPTP é formado por um complexo de transição de permeabilidade constituído pelo canal de ânion dependente de voltagem (VDAC), o trocador de nucleotídeos adenínicos (ANT) e a ciclofilina-D (Cyp-D), uma proteína da matriz mitocondrial, e resulta na dissipação do gradiente de prótons, sendo as alterações no fluxo de O₂ uma consequência dos efeitos do MPTP sobre o $\Delta\Psi_m$. A formação do MPTP em plaquetas ativadas com diferentes agonistas será abordada no tópico 6.2.

Resultados preliminares do nosso grupo confirmam essa hipótese de formação do MPTP. O fluxo de oxigênio e o $\Delta\Psi_m$ foram medidos em plaquetas ativadas com crescentes concentrações de trombina pré-tratadas ou não com ciclosporina-A (CsA) (25nM por 15 min), uma droga que se liga a Cyp-D e impede a formação do MPTP. O decréscimo do $\Delta\Psi_m$ e o aumento no fluxo de O₂ observados em plaquetas ativadas com até 0,4 U/mL de trombina não foram observadas nas células pré-tratadas com CsA (Figura 5.6 A e B), confirmando a hipótese de que a ativação plaquetária por trombina promove a formação do MPTP, que seria responsável pela dissipação do $\Delta\Psi_m$ e consequentemente pelo aumento no consumo de oxigênio. O aumento do $\Delta\Psi_m$ e a redução do fluxo de O₂ observados em plaquetas ativadas com as doses mais altas de trombina por sua vez, não foram alterados pelo pré-tratamento com CsA (Figura 5.6 A e B) sugerindo que o mecanismo responsável pelo retorno do potencial de membrana, e consequentemente do fluxo de O₂, em plaquetas ativadas com doses mais altas de trombina não envolve a formação do MPTP.

Para determinar o papel da reversão da ATP-sintase na recuperação do $\Delta\Psi_m$ de plaquetas ativadas por 0,4 a 1,0 U/mL de trombina o $\Delta\Psi_m$ foi medido em plaquetas ativadas com crescentes concentrações de trombina pré-tratadas ou não com Oligomicina (1 µg/mL por 15 min). Observa-se que o pré-tratamento com oligomicina leva ao aumento do $\Delta\Psi_m$ das plaquetas ativadas com até 0,4 U/mL do agonista (Figura 5.6 C), demonstrando que em plaquetas ativadas com essas concentrações de trombina a ATP-sintase atua como um consumidor do gradiente de prótons. Já em plaquetas ativadas com as concentrações acima de 0,4 U/mL o pré-tratamento com oligomicina levou a redução do $\Delta\Psi_m$ (Figura 5.6 C) demonstrando que em plaquetas ativadas com doses mais altas de trombina a ATP-sintase atua como um gerador do gradiente de prótons, e confirmando que a reversão da ATP-sintase é a responsável pelo retorno do $\Delta\Psi_m$ em plaquetas ativadas com doses acima de 0,4 U/mL de trombina.

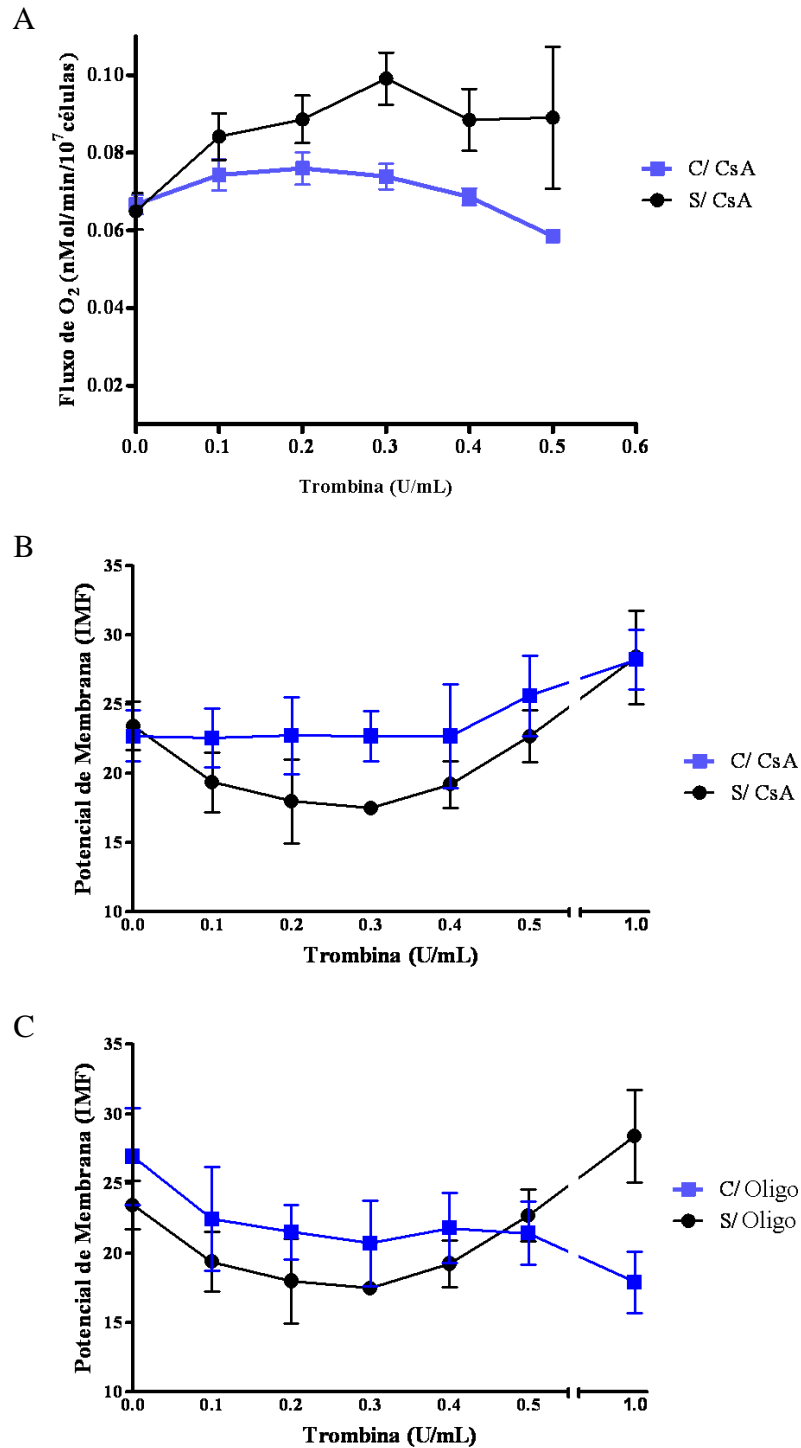


Figura 5.6: Efeitos da Ciclosporina-A e da oligomicina sobre a função mitocondrial de plaquetas ativadas por trombina. A: Fluxo de O₂ em plaquetas ativadas com crescentes concentrações de trombina pré-tratadas ou não com Ciclosporina-A (25 nM por 15 min); as células foram mantidas a 37° C em um meio contendo 5mM de glicose até que se estabilizasse o fluxo de O₂ (valor obtido como basal), após a adição de crescentes concentrações de trombina (0,1 a 1,0 U/mL) esperou-se cerca de 10 minutos para que o fluxo de O₂ se estabilizasse novamente e obtiveram-se os valores para cada concentração do agonista. B: $\Delta\Psi_m$ de plaquetas ativadas com crescentes concentrações de trombina pré-tratadas ou não com oCiclosporina-A (25 nM por 15 min); plaquetas foram incubadas com trombina por 15 min a 37°, marcadas com a sonda TMRE, e as medidas de intensidade média de fluorescência obtidas por citometria de fluxo. B: $\Delta\Psi_m$ de plaquetas ativadas com crescentes concentrações de trombina pré-tratadas ou não com oligomicina (1 μ g/mL por 15 min); plaquetas foram incubadas com trombina por 15 min a 37°, marcadas com a sonda TMRE, e as medidas de intensidade média de fluorescência obtidas por citometria de fluxo. Pontos representam médias de seis experimentos individuais com doadores diferentes \pm desvio padrão.

5.4 Plaquetas Expostas ao DENV-2 Apresentam Diminuição do $\Delta\Psi_m$ e Aumento na Exposição de Fosfatidilserina

No intuito de avaliar os efeitos da exposição ao DENV-2 sobre o $\Delta\Psi_m$ de plaquetas, estas células foram incubadas por 6 h a 37° C com mock, DENV-2 ou DENV-2 inativado, marcadas com TMRE e analisadas por citometria de fluxo. Células quiescentes (incubadas apenas com meio 199) e células ativadas com trombina (0,2 U/mL de trombina por 15 min a 37° C após 5 h e 45 min de incubação com meio 199 a 37° C) foram usadas como controle negativo e positivo respectivamente (Figura 5.7 A e C). Uma diferença significativa na IMF para TMRE de plaquetas infectadas com DENV-2 e incubadas com Mock sugerem que a exposição de plaquetas ao DENV-2 promove a dissipação do $\Delta\Psi_m$ (Figura 5.7 B e D).

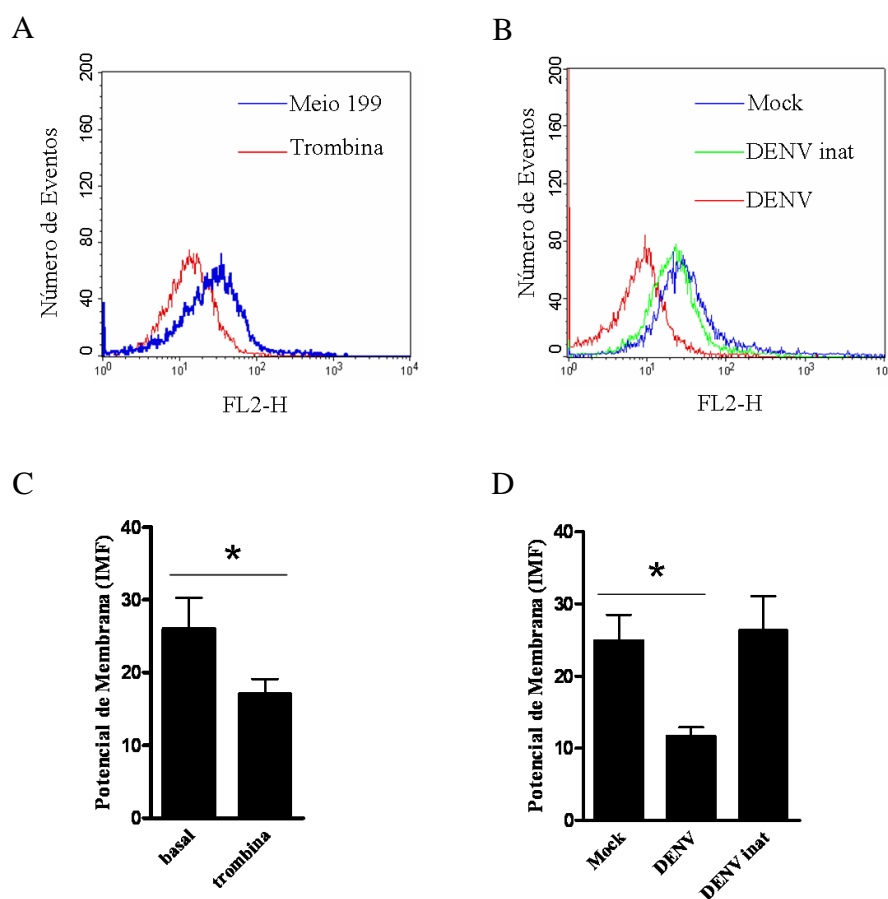


Figura 5.7: Potencial de membrana mitocondrial em plaquetas expostas ao DENV-2 e controles. Plaquetas (1×10^6) foram incubadas por 6 h a 37° C com meio 199 ou trombina (0,2 U/mL) (painéis A e C), ou com Mock, DENV-2 (moi = 1,0 PFU/célula) ou DENV-2 inativado (moi = 1,0 PFU/célula) (painéis B e D), marcadas com TMRE e analisadas por citometria de fluxo. A e B: histogramas representativos. C e D: barras representam médias de três experimentos individuais com doadores diferentes \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$).

Adicionalmente, plaquetas expostas ao DENV-2 e controles foram marcadas com anexina V-FITC no intuito de associar a disfunção mitocondrial de plaquetas expostas ao DENV-2 com morte celular. Como mostra a figura 5.8, a exposição de fosfatidilserina apresentou-se marcadamente aumentada em plaquetas ativadas por trombina (0,2 U/mL) ou por exposição ao DENV-2 (m.o.i 1,0 PFU/cel). Observa-se aumento tanto na intensidade média de fluorescência (Figura 5.8 A-D) quanto no número de células positivas para anexina-V (Figura 5.8 E-G). Junto com a diminuição do $\Delta\Psi_m$, esses dados sugerem morte celular após a exposição de plaquetas ao DENV-2, bem como, após a ativação plaquetária por trombina.

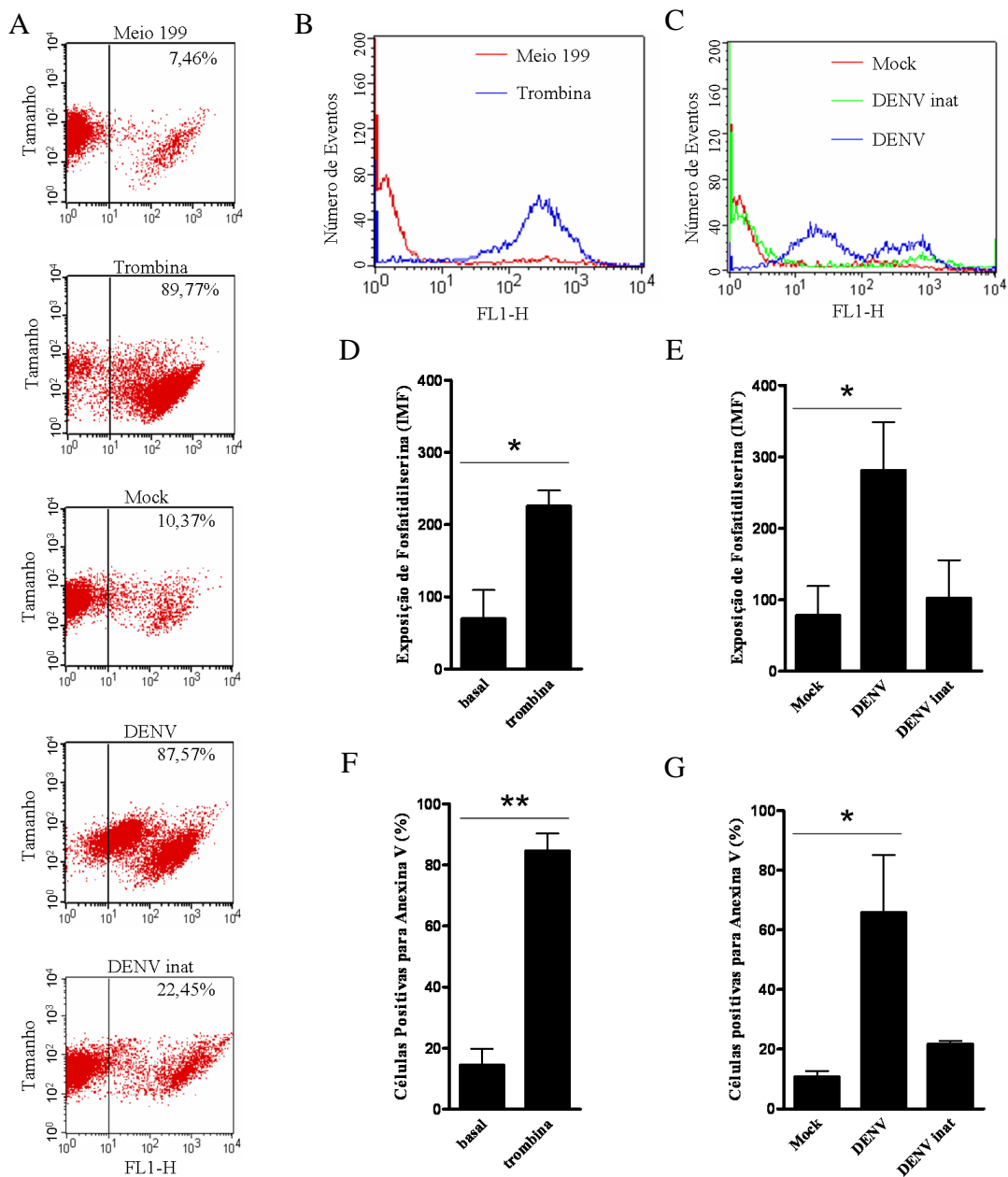


Figura 5.8: Exposição de fosfatidilserina em plaquetas expostas ao DENV-2 e controles. Plaquetas (1×10^6) foram incubadas por 6 h a 37°C com meio 199 ou trombina (0,2 U/mL) (painéis A, B, D e F), ou com Mock, DENV-2 (m.o.i = 1,0 PFU/célula) ou DENV-2 inativado (m.o.i = 1,0 PFU/célula) (painéis A C, E e G), marcadas com anexina V-FITC e analisadas por citometria de fluxo. A – C: *dot plots* e histogramas representativos; D – G: barras representam médias de três experimentos individuais com doadores diferentes \pm desvio padrão. Diferenças significativas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Dupla marcação com anexina V-FITC e TMRE demonstrou estar a externalização da fosfatidilserina positivamente correlacionada com a diminuição do $\Delta\Psi_m$ observada em células ativadas por trombina e expostas ao DENV-2 (Figura 5.9 B), estando positivas para anexina V-FITC justamente as células cujo $\Delta\Psi_m$ mostrou-se reduzido (Figura 5.9 A).

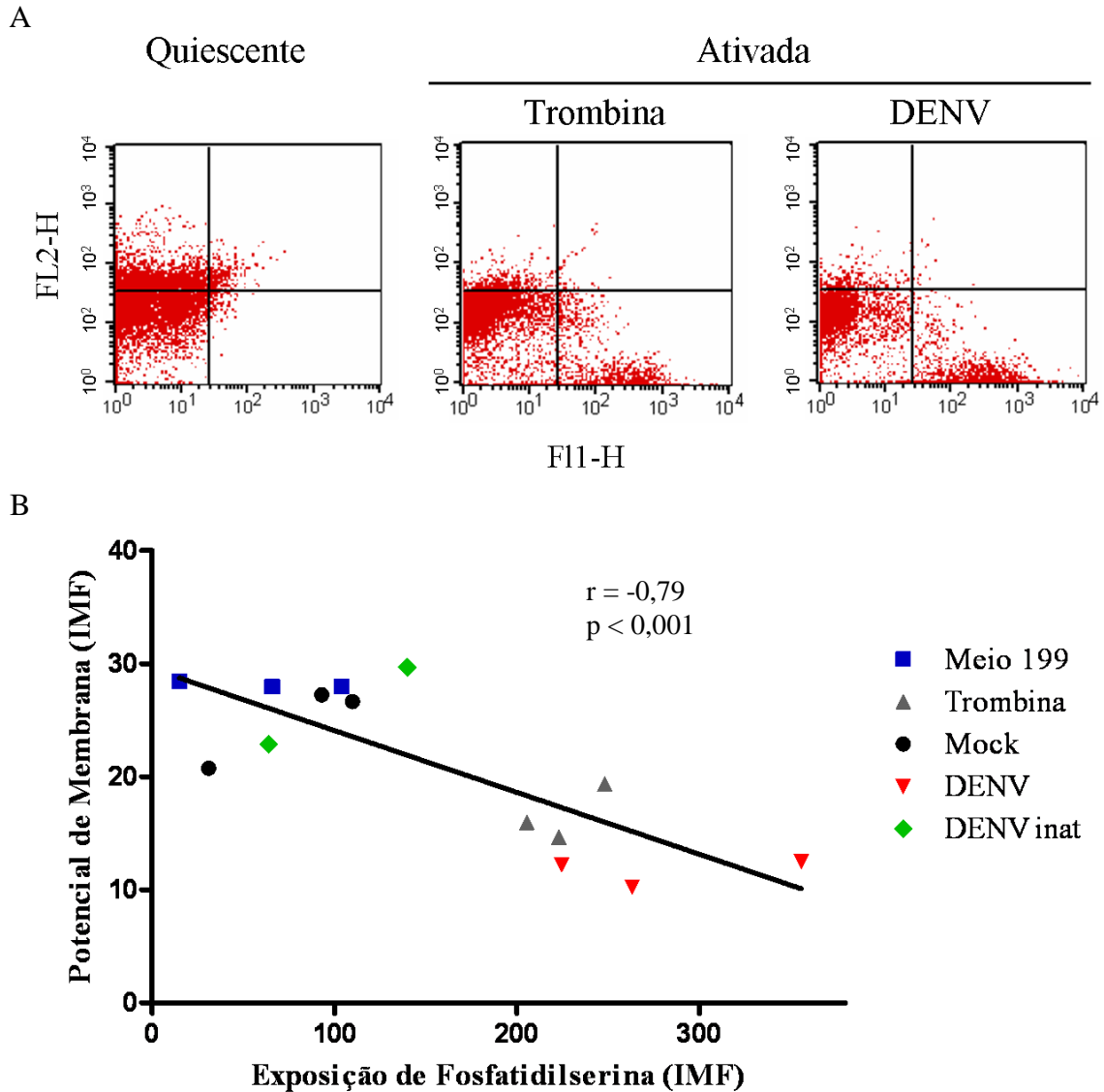


Figura 5.9: Correlação entre $\Delta\Psi_m$ e exposição de fosfatidilserina. Plaquetas foram incubadas com meio 199, trombina (0,2 U/mL), Mock, DENV-2 (moi = 1,0 PFU/célula) ou DENV-2 inativado (moi = 1,0 PFU/célula), marcadas com TMRE e com anexina V-FITC, e analisadas por citometria de fluxo. A: *dot plots* representativos das plaquetas quiescentes e ativadas por trombina ou por exposição ao DENV-2; B: relação entre $\Delta\Psi_m$ e exposição de fosfatidilserina; correlação foi obtida através do coeficiente de Pearson ($r = -0,79$; $p < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Ativação e Degranulação de Plaquetas Expostas ao DENV

Plaquetopenia acentuada com contagem de plaquetas menor de $100.000/\text{mm}^3$ e aumento na permeabilidade vascular caracterizada por aumento do hematócrito acima de 20% e hipoproteïnemia são achados clínicos comuns principalmente na forma grave da infecção pelo DENV, podendo ocasionalmente ocorrer na dengue branda. Seus níveis estão positivamente correlacionados com a gravidade do quadro clínico e negativamente correlacionados com a recuperação clínica dos pacientes (WHO, 1997; Mourão *et al*, 2007).

Nossos resultados mostram a partir de um modelo *in vitro* de interação plaqueta-DENV que plaquetas expostas ao DENV-2 apresentam alterações morfológicas inerentes à ativação plaquetária como espalhamento, filopodia e agregação. Essas características morfológicas foram também observadas nas células ativadas por trombina, controle positivo de ativação plaquetária nesse estudo, mas não em plaquetas incubadas apenas com meio 199 ou com mock. Além disso, a avaliação da expressão de P-selectina por citometria de fluxo confirmou a ativação plaquetária induzida diretamente pela exposição ao DENV, uma vez que um aumento significativo da expressão de P-selectina foi observado na superfície das células incubadas com o vírus, mas não de células incubadas com mock.

Esses resultados corroboram com os achados de Ghosh *et al* (2008) que demonstraram alterações morfológicas associadas à ativação plaquetária e aumento na expressão de P-selectina em plaquetas expostas ao DENV-2. No entanto a ausência de um controle demonstrando os efeitos da exposição de plaquetas ao tipo celular no qual o vírus foi produzido torna difícil atribuir à exposição ao DENV as alterações morfológicas observadas no estudo citado. Logo, nosso estudo complementa as observações de Ghosh *et al* ao demonstrar a ativação apenas de plaquetas expostas ao DENV-2, mas não de plaquetas expostas ao mock.

A ativação de plaquetas por meio da interação direta com o DENV tem sido proposta como um mecanismo que contribui para a plaquetopenia observada em dengue, uma vez que a ativação plaquetária aumentaria a morte dessas células na circulação periférica (Ghosh *et al*, 2008), mas vale lembrar que a ativação e degranulação plaquetária promovem a ativação de outras células como células endoteliais, linfócitos e monócitos (Zimmerman, 2001; Weyrich *et al*, 2002), também envolvidas na patogênese da dengue. Dessa forma a ativação de plaquetas decorrente da interação direta com o DENV poderia contribuir não apenas para a

plaquetopenia, mas também para as alterações do endotélio e para modular a resposta imune celular durante a infecção.

A interação entre plaquetas e moléculas associadas a patógenos tem sido descrita como um importante mediador da resposta imune inata contra microorganismos invasores. O reconhecimento de LPS por TLR4 em plaquetas tem sido associado com ativação plaquetária, secreção de TNF- α , sequestro de plaquetas na microvasculatura pulmonar e interação entre plaquetas e neutrófilos, além de ser proposto como um mecanismo de plaquetopenia e de lesão tecidual na sepse grave (Andonegui *et al*, 2005; Aslam *et al*, 2006; Jayachandran *et al*, 2006; Clark *et al*, 2007; Urban e Zichlinski, 2007).

A habilidade de plaquetas em modular a resposta inflamatória decorre da interação de plaquetas ativadas com células endoteliais mediada pela integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e CD40L, induzindo um fenótipo pró-inflamatório no endotélio; da interação de plaquetas ativadas com leucócitos mediada pela P-selectina, modulando a ativação e expressão de genes inflamatórios dessas células; e da secreção de fatores inflamatórios e mediadores imunes estocados nos grânulos α plaquetários, dentre eles citocinas como IL-6, quimiocinas como RANTES, MIP-1 α e MCP-3, fatores de crescimento como PDGF e TGF- β , e aminas vasoativas como histamina. Outros fatores como IL-1 β , TXA₂, TF e PAF são sintetizados pela plaqueta ativada (Bergmeier e Wagner, 2007; Bozza *et al*, 2009).

As principais hipóteses para patogênese da dengue são baseadas em eventos relacionados com ativação de células de imunidade inata e adaptativa levando a uma maciça liberação de citocinas capazes de atuar diretamente sobre o endotélio e levando ao aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, hemoconcentração e hipotensão (Pang *et al*, 2007). O papel da ativação de plaquetas nessa produção alterada de citocinas e consequente desbalanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias não foi ainda explorado.

Nesse estudo nós dosamos nos sobrenadantes de culturas de plaquetas expostas ao DENV-2 e controles as citocinas humorais IL-4 e IL-13, as quimiocinas RANTES e MCP-1, o fator de crescimento GM-CSF, e a citocina pró-inflamatória TNF- α . Com exceção de RANTES, todas as citocinas dosadas estavam significativamente elevadas nos sobrenadantes de plaquetas expostas ao DENV-2 quando comparados ao controle. Plaquetas ativadas por trombina, por sua vez, apresentaram um aumento discreto, mas não significativo, na secreção de GM-CSF, MCP-1 e TNF- α , e um aumento significativo na secreção de RANTES.

Esses resultados sugerem que o estímulo com DENV-2 induz um fenótipo pró-inflamatório em plaquetas mais eficientemente do que um agonista fisiológico como a trombina. Diferenças entre os perfis de citocinas observados em plaquetas expostas ao DENV e em plaquetas ativadas por trombina sugerem secreção de citocinas dependente do estímulo,

e que os mecanismos de ativação envolvidos na ativação plaquetária induzida pelo DENV são diferentes daqueles envolvidos na ativação plaquetária por trombina.

As citocinas humorais IL-4 e IL-13 induzem a ativação e a diferenciação dos linfócitos B levando a produção de IgG1 e IgE. Essas citocinas poderiam atuar de forma importante na patogênese da dengue, uma vez que anticorpos da classe IgG podem amplificar a infecção em monócitos e macrófagos (ADE), bem como anticorpos anti-NS1 de reatividade cruzada com integrinas da superfície de plaquetas e de células endoteliais poderiam contribuir para a plaquetopenia e o extravasamento de plasma observados durante a infecção pelo DENV.

O aumento na secreção de TNF- α em plaquetas expostas ao DENV corrobora com os altos níveis plasmáticos dessa citocina em pacientes com dengue, sendo os níveis mais elevados encontrados em pacientes com FHD (Green *et al*, 1999). Um estudo mais recente encontrou níveis significativamente mais elevados de TNF- α e MCP-1, mas não de RANTES, em pacientes com SCD (Chau *et al*, 2008), esses resultados também estão de acordo com os níveis dessas citocinas secretados por plaquetas expostas ao DENV.

Relações entre os níveis plasmáticos de citocinas, gravidade e manifestações clínicas em pacientes com dengue clássica ou grave foram previamente estabelecidas por nosso grupo. Dentre as citocinas secretadas por plaquetas ativadas após interação com o DENV aqui descritas, IL-4, IL-13 e GM-CSF encontravam-se aumentadas em pacientes com dengue grave, TNF- α e MCP-1 foram correlacionados com plaquetopenia e níveis aumentados de GM-CSF e MCP-1 correlacionados com hipotensão (Bozza *et al*, 2008).

Nossos resultados mostram que plaquetas ativadas diretamente pela interação com o DENV podem ter um papel importante na imunopatogênese da doença ao contribuir para a produção dessas citocinas, que por sua vez estão relacionadas com plaquetopenia, alterações endoteliais e gravidade em pacientes com dengue.

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos nas interações entre vírus e células. Células dendríticas mielóides e plasmacitóides, por exemplo, respondem diferentemente a exposição ao DENV e são ambas ativadas. Células dendríticas mielóides apresentam altos níveis de replicação viral correlacionados com a expressão de DC-SIGN, sendo a ativação dessas células dependente da replicação; já as células dendríticas plasmacitóides apesar de serem capazes de internalizar o DENV não são capazes de sustentar a replicação viral, e ainda assim são ativadas após a exposição ao DENV. A ativação de células dendríticas plasmacitóides ocorre de forma independente da replicação viral, sendo mediada pelo reconhecimento do RNA viral por TLR7 (Sun *et al*, 2009).

Em nosso estudo, o aumento na expressão de P-selectina observado em plaquetas ativadas por trombina e em plaquetas expostas ao DENV-2 não foi observado em plaquetas

expostas ao DENV-2 inativado, sugerindo que a ativação plaquetária por exposição ao DENV não se limita a uma resposta da célula aos antígenos virais.

Estudos recentes demonstraram a presença de material genético e proteínas virais (E e NS-1) em plaquetas isoladas de pacientes com dengue e em plaquetas incubadas *in vitro* com o DENV, sugerindo a infecção de plaquetas humanas pelo DENV (Noisakran *et al*, 2009a e 2009b). De fato, plaquetas possuem em sua superfície diversas moléculas como DC-SIGN, CD41, Fc γ II e integrina $\alpha_v\beta_{III}$ (Paul *et al*, 2002; Flaujac *et al*, 2010) que poderiam atuar como receptores primários para a entrada do DENV na célula, mas o papel desses receptores na interação plaqueta-DENV ainda não foi definido.

Novos estudos serão realizados por nosso grupo a fim de determinar quais mecanismos e moléculas estão envolvidos na ativação de plaquetas expostas ao DENV, bem como se plaquetas são capazes de internalizar o DENV ou de sustentar a replicação viral, e o quanto esses eventos são requeridos para a ativação plaquetária.

6.2 Análise da Função Mitocondrial Plaquetária

A fosforilação oxidativa gera dois parâmetros mensuráveis que nos permitiram avaliar a função mitocondrial de plaquetas tanto em seu estado fisiológico quiescente quanto ativado. São eles: o consumo de O_2 e o $\Delta\Psi_m$.

Realizamos as medidas do consumo de O_2 em plaquetas quiescentes intactas mantidas em um meio contendo 5 mM de glicose na presença e na ausência de drogas inibidoras dos complexos enzimáticos mitocondriais ou do desacoplador FCCP. A medida do fluxo de O_2 cianeto sensível (montante do consumo de oxigênio que pode ser inibido por cianeto de potássio) de plaquetas nos permitiu observar que plaquetas consomem um volume pequeno de O_2 quando comparada com outras células. Esse consumo se mostra proporcional ao número de mitocôndrias presentes em cada tipo celular (Tabela 6.1).

O $\Delta\Psi_m$ também foi medido em plaquetas nas mesmas condições, possibilitando comparar os valores encontrados para fluxo de oxigênio e $\Delta\Psi_m$ com os efeitos esperados para cada droga.

A oligomicina ao inibir a ATP-sintase promove o acúmulo de prótons no espaço intermembranas, e o FCCP ao aumentar a permeabilidade das membranas a prótons leva a dissipação do $\Delta\Psi_m$; os efeitos da oligomicina e do FCCP sobre o fluxo de O_2 (redução e aumento respectivamente) são consequências diretas de seus efeitos sobre o $\Delta\Psi_m$, uma vez que o potencial elétrico na membrana interna da mitocôndria regula o fluxo de elétrons nos complexos da CTE.

Tabela 6.1: Comparação entre a respiração mitocondrial de plaquetas e de outros tipos celulares (Peachman *et al*, 2001; Perrotta *et al*, 2003; Maianski *et al*, 2004; White, 2007).

Tipo Celular	Consumo de O ₂ basal nmol/min/ 10 ⁷ células	Consumo de O ₂ cianeto insensível nmol/min/10 ⁷ células	Consumo de O ₂ cianeto sensível nmol/min/10 ⁷ células	Número de mitocôndrias/ célula	Respiração mitocondrial nmol/min/10 ⁷ mitocôndrias
HepG2	115	2	113	~ 1.300	~ 8,7 x 10 ⁻²
PBMC	50	3,75	46,25	1.050 ± 114	~ 4,4 x 10 ⁻²
Neutrófilos	3,75	3,75	–	86 ± 28	–
Eosinófilos	16	14	2	24 a 36	~ 6,6 x 10 ⁻²
Plaquetas	5,3 x 10 ⁻² *	0,52 x 10 ⁻² *	4,78 x 10 ⁻²	1 ou poucas	< 4,78 x 10 ⁻²

* resultados nossos

A antimicina-A por outro lado atuaria primeiro no fluxo de O₂, já que a inibição do complexo III leva a interrupção do fluxo de elétrons e consequentemente do consumo de O₂, o que levaria a gradativa dissipação do $\Delta\Psi_m$ pela ATP-sintase. No entanto, esse efeito da antimicina-A sobre o $\Delta\Psi_m$, comum em outros tipos celulares, não foi observado em plaquetas, pois estas células possuem uma ATP-sintase reversível que pode usar a energia do gradiente de prótons para gerar ATP ou pode hidrolizar ATP em ADP para manter o $\Delta\Psi_m$. Nesse caso, a inibição concomitante dos complexos III e V promoveram a queda do $\Delta\Psi_m$ em plaquetas.

A manutenção do $\Delta\Psi_m$ através da hidrólise de ATP não é um evento exclusivo de plaquetas. Os eosinófilos, cujas mitocôndrias possuem um papel funcional restrito a apoptose, também possuem uma ATP-sintase reversível responsável pelo $\Delta\Psi_m$ dessas células (Peachman *et al*, 2001); em astrócitos a interrupção da CTE leva a ativação da via glicolítica acompanhada da hiperpolarização da mitocôndria (por reversão da ATP-sintase), evitando a depleção do ATP intracelular e a morte da célula por apoptose (Almeida *et al*, 2001); e macrófagos ativados também mantêm um elevado $\Delta\Psi_m$ diante da completa inibição da respiração através da hidrólise do ATP proveniente da via glicolítica como um mecanismo de defesa contra apoptose (Garedew *et al*, 2010).

No que diz respeito à atividade mitocondrial da plaqueta ativada, nossos resultados mostram que a ativação plaquetária por trombina em uma dose de até 0,4 U/mL promove queda do $\Delta\Psi_m$ e aumento no fluxo de O₂ de maneira dependente da dose através de um mecanismo que envolve transição de permeabilidade.

A transição de permeabilidade mitocondrial é o aumento da permeabilidade da membrana interna a solutos com massa molecular de até 1.500 Da em decorrência da

formação do MPTP. Este evento está associado com ruptura da membrana externa, despolarização mitocondrial, vazamento de proteínas do espaço intermembranas para o citoplasma e apoptose. As moléculas atualmente mais aceitas como componentes do MPTP são o VDAC, o ANT e a Cyp-D (Bernarde e Forte, 2007).

A despolarização do $\Delta\Psi_m$ tem sido descrita em plaquetas durante a estocagem e/ou ativação por certos agonistas como trombina ou o ionóforo de cálcio A23187, sendo associada com ativação da via intrínseca de apoptose, demonstrada por aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bid, Bax e Bak, ativação de caspase-3 e exposição de fosfatidilserina (Verhoeven *et al*, 2005; Leytin *et al*, 2006; Lopez 2008).

A ativação plaquetária por colágeno induz ativação de caspase-3, mas pouco altera a exposição de fosfatidilserina (Shcherbina e O'Donnell, 1999; Keuren *et al*, 2005; Leytin *et al*, 2006). Já a ativação por zimosan A opsonizado está associada com a hiperpolarização do $\Delta\Psi_m$, sendo a despolarização observada apenas 24 horas após a adição do estímulo, o que ocorre paralelo ao aumento da exposição de fosfatidilserina, mas não da ativação de caspases-3 e 9 ou da expressão de Bax e Bak (Matarrese *et al*, 2009).

Em um estudo de Leytin *et al* (2009) a inibição da formação do MPTP por CsA foi capaz de prevenir a apoptose de plaquetas ativadas por A23187, prevenindo completamente a despolarização do $\Delta\Psi_m$, ativação de caspase-3, fragmentação em micropartículas, e inibindo parcialmente a exposição de fosfatidilserina. Um outro estudo (Jobe *et al*, 2007) demonstrou que a perda do $\Delta\Psi_m$ observada durante a ativação de plaquetas isoladas de camundongos selvagens por trombina mais convulxina não ocorre em camundongos geneticamente deficientes para Cyp-D (Cyp-D $-/-$). Resultados semelhantes foram obtidos para exposição de fosfatidilserina e ligação ao fibrinogênio, mas não para expressão de P-selectina, sugerindo que a apoptose durante a ativação plaquetária é mediada pela formação de MPTP e dependente de Cyp-D.

Nesse mesmo estudo (Jobe *et al*, 2007), demonstrou-se que a atividade pró-coagulante e a retração do coágulo encontram-se alteradas em plaquetas Cyp-D $-/-$. Os autores sugerem haver um papel crítico do MPTP na regulação da ativação plaquetária, principalmente no que diz respeito à passagem do estado de ativada para altamente ativada.

Estudos anteriores têm sustentado esse conceito de ativação plaquetária gradual em estímulos com diferentes níveis de trombina ou co-estímulo com trombina mais convulxina ou trombina mais colágeno (Jobe *et al*, 2005; Remenyi *et al*, 2005). Nossos resultados mostram diferenças na função mitocondrial plaquetária de acordo com os níveis de trombina aplicados, havendo uma recuperação do $\Delta\Psi_m$ e redução do fluxo de oxigênio em plaquetas ativadas com doses partir de 0,4 U/mL de trombina. Segundo nossos resultados a reversão da ATP-sintase

representa um mecanismo chave nesse processo, e uma vez que em eosinófilos, astrócitos e macrófagos ativados a reversão da ATP-sintase está associada com proteção contra apoptose, sendo os níveis de ATP mantidos pela via glicolítica (Peatchman *et al*, 2001; Almeida *et al*, 2001; Garedeu *et al*, 2010), acreditamos que em plaquetas este mecanismo atue de forma a impedir a morte precoce por apoptose de plaquetas ativadas com altas doses de trombina.

Nesse sentido, a ativação da via glicolítica seria uma importante resposta à ativação plaquetária por trombina. Um estudo de Kirtland e Baum (1974) sugere que o ATP necessário para a agregação plaquetária tem origem principalmente na via glicolítica, sendo pequena a contribuição da mitocôndria. Acreditamos, que a função da mitocôndria na plaqueta ativada seja restrita ao controle da apoptose, enquanto a energia necessária à ativação seja mantida pela via glicolítica. Novos estudos serão realizados por nosso grupo para determinar o papel da ativação da via glicolítica durante a ativação plaquetária, e da ATP-sintase reversível no processo de morte celular em plaquetas.

6.3 Disfunção Mitocondrial e Morte em Plaquetas Expostas ao DENV-2

O envolvimento da mitocôndria na regulação da ativação plaquetária e no controle da morte celular por apoptose é evidente (Remenyi *et al*, 2005; Matarrese *et al*, 2009). Apesar da ativação de plaquetas expostas ao DENV ter sido anteriormente descrita, o envolvimento da mitocôndria na ativação plaquetária diante da interação com o DENV ainda não foi explorado. Nesse estudo observamos que plaquetas ativadas durante a exposição ao DENV apresentam sinais de disfunção mitocondrial e morte celular, estando esses eventos significativamente correlacionados.

O $\Delta\Psi_m$ encontra-se claramente reduzido em plaquetas expostas ao DENV-2, paralelamente essas células exibem um aumento expressivo na exposição de fosfatidilserina, indicando ocorrência de morte celular associada à exposição de plaquetas ao DENV. Apesar de ambos, queda do $\Delta\Psi_m$ e exposição de fosfatidilserina, serem sinais de apoptose, novos ensaios devem ser realizados para determinar se esse é o processo responsável pela morte celular em plaquetas expostas ao DENV (Kroemer *et al*, 2009).

As infecções virais são conhecidas por modular diversas funções no metabolismo das células hospedeiras. Proteínas virais que têm como alvo a mitocôndria podem modular de forma importante disfunção mitocondrial e apoptose em células infectadas por vírus. Diversas dessas proteínas têm sido descritas, entre elas as que se ligam diretamente ao MPTP como a proteína HBx do vírus da hepatite B e a proteína Vpr do HIV, que estão relacionadas com alterações no $\Delta\Psi_m$ e na indução da apoptose (Everett e McFadden, 2001; Verrier *et al*, 2003).

A associação entre disfunção mitocondrial e morte celular induzida pelo DENV foi pela primeira vez investigada por El-Bacha *et al* (2007) em um estudo no qual foram observados aumento do consumo de O₂ e queda do $\Delta\Psi_m$ em hepatócitos infectados pelo DENV-2, culminando na queda do conteúdo de ATP e na carga de energia cinética dessas células. Essas alterações na fisiologia mitocondrial e na homeostase energética foram associadas com alterações ultraestruturais típicas do processo de apoptose.

No que diz respeito às proteínas do DENV individualmente, Catteau *et al* (2003a) demonstraram as propriedades pro-apoptóticas do peptídeo *ApoptoM*, um peptídeo de 9 resíduos na porção C-terminal da proteína M. Células HeLa transfectadas com plasmídeos contendo a região codificante para esse peptídeo apresentaram exposição aumentada de fosfatidilserina e queda do $\Delta\Psi_m$, sendo a ativação de caspase-3 requerida para a indução de apoptose por *ApoptoM*. (Catteau *et al*, 2003b).

Aumento do estresse oxidativo tem sido descrito em pacientes com dengue (Gil *et al*, 2004), mas só recentemente a relação entre estresse oxidativo e gravidade foi estabelecida (Soundravally *et al*, 2008). A peroxidação lipídica e oxidação protéica são significativamente mais altas nos pacientes com dengue, sendo os valores estáveis durante o curso da doença branda e crescentes durante o curso da doença grave. Adversamente, o status antioxidante total é significativamente mais baixo nos pacientes com a doença grave, sendo os valores decrescentes durante o curso da infecção. A peroxidação lipídica mostra correlação tanto com o hematócrito quanto com plaquetopenia em pacientes com FHD e SCD.

Em um estudo realizado por Valero *et al* (2002) os níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) encontravam-se elevados em pacientes com FD, mas não em pacientes com FHD. O possível papel das plaquetas na produção de NO foi testado nesse mesmo estudo incubando plaquetas com DENV-2 (m.o.i. = 0,5 PFU/célula), mas não se observou diferenças nos níveis de NO nos sobrenadantes das plaquetas incubadas com o vírus e das plaquetas controles.

A replicação do HCV, que assim como o DENV é um membro da família flaviviridae, também gera uma disfunção mitocondrial nas células infectadas. Em um modelo de células transformadas construído para mimetizar a infecção pelo HCV *in vitro*, observou-se redução do consumo de O₂, queda do $\Delta\Psi_m$, perda de atividade do complexo I, e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nenhum sinal de disfunção mitocondrial foi observado em células nas quais a transcrição do genoma do HCV foi inibida (Piccoli *et al*, 2006).

O mecanismo pelo qual a interação com o DENV contribui para alterações mitocondriais permanece elusivo. Uma vez que a despolarização do $\Delta\Psi_m$ e a morte celular por apoptose são características do estado de transição de permeabilidade (Crompton, 1999),

proteínas virais ou seus subprodutos poderiam interagir com proteínas das membranas mitocondriais, alterar sua permeabilidade e elevar o vazamento de prótons, causando assim alterações na fisiologia mitocondrial. Por outro lado a produção de ROS também poderia contribuir para a disfunção mitocondrial, uma vez que o aumento no estresse oxidativo tem sido observado na infecção pelo DENV tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Lin *et al*, 2000; Valero *et al*, 2002; Gil *et al*, 2004; Soundravally *et al*, 2008).

6.4 Considerações Finais

No presente estudo nós descrevemos em plaquetas expostas ao DENV-2 alterações morfológicas e funcionais semelhantes às aquelas observadas durante a ativação plaquetária por alguns agonistas conhecidos, como a trombina que foi usada como controle positivo de ativação plaquetária em nosso estudo. A função mitocondrial, principalmente no que diz respeito à formação do MPTP, está envolvida nos processos de ativação e apoptose em plaquetas; dessa forma, agentes farmacológicos que afetam a formação do MPTP são candidatos promissores para o tratamento de doenças associadas com aumentada destruição periférica de plaquetas apoptóticas (Bozza e Weyrich, 2008).

É interessante lembrar que em nosso estudo os efeitos observados em plaquetas expostas ao DENV-2 não foram observados em plaquetas expostas ao vírus inativado, sugerindo que a interação plaqueta-DENV não se limita à exposição da célula aos antígenos virais, e que ocorre uma ação da partícula viral íntegra sobre plaquetas humanas. Novos estudos devem ser realizados no intuito de determinar o quanto interação superficial, internalização das partículas virais ou mesmo infecção são requeridas para a ativação de plaquetas expostas ao DENV, e nesse caso determinar se a replicação viral pode ocorrer nessas células, bem como estabelecer o papel de uma possível infecção plaquetária e de seus efeitos sobre o metabolismo energético da célula na patogênese da dengue.

7 CONCLUSÕES

A) O DENV-2 interagindo diretamente com plaquetas humanas leva a ativação plaquetária, demonstrada nesse estudo pelo aumento na expressão de P-selectina (CD62-P) associada a alterações morfológicas sugestivas de ativação como espalhamento, filopodia e agregação;

B) A ativação de plaquetas pela exposição ao DENV induz a secreção de IL-4, IL-13, GM-CSF, TNF- α e MCP-1.

C) Plaquetas quiescentes apresentam um pequeno consumo de O₂ responsável pela manutenção do $\Delta\Psi_m$ nessas células, que pode também ser mantido pela hidrólise de ATP diante da interrupção da CTE;

D) A ativação plaquetária por trombina em doses de até 0,4 U/mL promove diminuição do $\Delta\Psi_m$ e aumento no fluxo de O₂ de maneira dependente da dose através de um mecanismo que envolve transição de permeabilidade, enquanto a ativação por doses acima de 0,4 U/mL promove aumento do $\Delta\Psi_m$ e diminuição do fluxo de O₂ através de um mecanismo que envolve a reversão da ATP-sintase;

E) A ativação de plaquetas pela interação com o DENV-2 está associada com despolarização do $\Delta\Psi_m$ e exposição de fosfatidilserina, sugerindo a indução de morte celular em plaquetas expostas ao DENV.

8 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos no presente estudos, novas perspectivas devem ser abordadas no intuito de melhor compreender a interação entre o DENV e plaquetas humanas.

Uma vez que plaquetas apresentam em sua superfície moléculas já descritas como receptores primários para a entrada do DENV como DC-SIGN, CD41 e integrina $\alpha_v\beta_{III}$, a avaliação da ativação de plaquetas pré-incubadas com anticorpos de bloqueio para estas moléculas será realizada por nosso grupo no intuito de determinar o papel desses receptores na interação plaqueta-DENV.

Observamos nesse estudo que plaquetas expostas ao DENV-2 apresentam sinais de disfunção mitocondrial e morte celular. A interação de proteínas virais com o MPTP ou a produção de ROS podem estar envolvidas nesse processo, dessa forma os efeitos do DENV sobre plaquetas tratadas com CsA ou com antioxidantes será importante para determinar o papel do MPTP e da produção de ROS na disfunção mitocondrial e morte celular de plasquetas ativadas pela exposição ao DENV. Além disso, pretendemos avaliar a ativação de caspases em plaquetas expostas ao DENV no intuito de caracterizar o processo responsável pela morte celular na interação plaqueta-DENV; bem como pretendemos avaliar o papel da ATP-sintase reversível no processo de morte celular associada à ativação plaquetária por diferentes agonistas ou pelo DENV.

Enfim, novos estudos serão realizados por nosso grupo a fim de confirmar a infecção de plaquetas pelo DENV e, neste caso, determinar se pode ocorrer replicação viral nessas células. Além disso, a avaliação de ativação plaquetária, função mitocondrial, morte celular e secreção de citocinas em plaquetas isoladas de pacientes com dengue possibilitará estabelecer correlações entre estes parâmetros e os aspectos clínicos da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B; Jonson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P. **Molecular Biology of the Cell**, 4th edition, Garland Science Publishing, p.659-710, 2002.

Allison, SL; Schalich, J; Stiasny, K; Mandl, CW; kunz C; Heinz, FX. Oligomeric Rearrangement of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins Induced by an Acidic pH. **Journal of Virology**, Vol. 69, n. 02, p.695-700, 1995.

Almeida, A; Almeida, J; Bolan, JP; Moncada, S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: The role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. **PNAS**, Vol.98, n.26, p.15294-15299, 2001.

Anderson, R; Wang, S; Osiowy, C; Issekutz, AC. Activation of Endothelial Cells via Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of Peripheral Blood Monocytes. **Journal of Virology**, Vol.71, n.6, p.4226-4232, jun. 1997.

Andonegui, G; Kerfoot, SM; McNagny, K; Ebbert, KVJ; Patel, KD; Kubes, P. Platelet express functional Toll-like receptor-4. **Blood**, Vol.106, n.7, p.2427-2423, 2005.

Araújo, JM; Schatzmayr, HG; de Filippis, AM; dos Santos, FB; Cardoso, MA; Britto, C; Coelho, JM; Nogueira, RM. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **Journal of Virological Methods**, Vol.155, n.1, p.34-38, 2009a.

Araújo, JMG; Filippis, AMB.; Schatzmayr, HG.; Araújo, ESM.; Brito, C; Cardoso, MA; Camacho, LAB; Nogueira, RMR. Quantification of Dengue Virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2009b.

Aslam, R; Speck, ER; Kim, M; Crow, AR; Bang, KWA; Nestel, FP; Ni, H; Lazarus, AH; Freedman, J; Semple, JW. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- α production in vivo. **Blood**, Vol.107, n.2, p.637-641, 2006.

Assunção-Miranda, I; Amaral, FA; Bozza, F.A.; Fagundes, CT; Souza, L.P.; Souza, DG; Pacheco, P; Barbosa-Lima, G; Gomes, R.N; Bozza, PT; Da Poian, AT; Teixeira, MM. Bozza, M.T. Contribution of Macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. **The FASEB Journal**, Vol.24, p.218-228, 2010.

Balmaseda, A; Hammond, SN; Pérez, MA; Cuadra, R; Solano, S; Rocha, J; Idiaquez, W; Harris, E. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.73, n.6, p.1059-1062, 2005.

Bandyopadhyay, S; Lum, LC; Kroeger, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. **Tropical Medicine and International Health**, Vol.11, n.8, p.1238-1255, 2006.

Basu, A; Jain, P; Gangodkar, SV; Shetty, S; Ghosh, K. Dengue 2 virus inhibits in vitro megakaryocytic colony formation and induces apoptosis in thrombopoietin-inducible

megakaryocytic differentiation from cord blood CD34+ cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Vol.53, p.46-51, 2008.

Beeck AOD; Molenkamp, R; Caron, M; Younes, AB; Bredenbeek, P; Dubuisson, J. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope. **Journal of Virology**, Vol.77, n.2, p.813-20, 2003.

Bente, DA; Rico-Hesse, R. Modelos of dengue virus infection. **Drug Discovery Today Disease Models**, Vol.3, n.2, p.97-103, 2006.

Bergmeier, W; Wagner, DD. Inflammation. In Michelson, AD. **Platelets**. 2 ed. San Diego: Elsevier, cap.39, p.713-726, 2007.

Bernardi, P; Forte, M. The mitochondrial permeability transition pore. In Wiley, C. **Mitochondrial biology: New perspectives**, Novartis Foundation Symposium, 287, p.157-169, 2007.

Boonnak, K; Slike, BM; Burgerss, TH; Mason, RM; Wu, SJ; Sun, P; Porter, K; Rudiman, IF; Yuwono, D; Puthavathana, P; Marovich, MA. Role of Dendritic Cells in Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **Journal of Virology**, Vol.82, n.8, p.3939-3951, abr. 2008.

Bozza, FA; Cruz, OG; Zagne, SMO; Azeredo, EL; Nogueira, RMR; Assis, EF; Bozza, PT; Kubelka, CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MPI-I beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infectious Diseases**, Vol.8, n.86, 2008.

Bozza, FA; Shah, AM; Weyrich, AS; Zimmerman, GA. Amicus or Adversary: Platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, Vol.40, p.123-134, 2009.

Bozza, FA; Weyrich, AS. Mitochondria push platelets past their prime. **Blood**, Vol.111, n.5, 2008.

Brinton, MA. Replication of flavivirus. In: Schlesinger, S.; Schlesinger, M. **The Togaviridae and Flaviviridae**. Plenum Press, p. 327-65, 1986.

Briseño-Garcia, B; Gómez-Dantés, H; Argott-Ramirez, E; Montesano, R; Vázquez-Martinez, AL; Ibáñez-Bernal, S; Madrigal-Ayala, G; Ruiz-matus, C; Flisser, A; Tapia-Conyert, R. Potential Risk for Dengue Hemorrhagic Fever: The Isolation os Serotype Dengue-3 in Mexico. **Emerging Infectious Disease**, Vol.2, n.2, p.133-135, 1996.

Carrington, CVF; Foster, JE; Pybus, OG; Bennett, SN; Holmes, EC. Invasion and Maintenance of Dengue Virus Type 2 and Type 4 in the Americas. **Journal of Virology**, Vol.79, n.23, p.14680-14687, dez. 2005.

Catteau, A; Kalinina, O; Wagner, MC; Deubel, V; Courageot, MP; Desprès, P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as *ApoptoM*. **Journal of General Virology**, Vol.84, p.2781-2793, 2003a.

Catteau, A; Roué, G; Yuste, VJ; susin, SA; Desprès, P. Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation. **Biochimie**, Vol.85, p.789-793, 2003b.

Chairulfatah, A; Setiabudi, D; Agoes, R; Colebunders, R. Thrombocytopenia and Platelet Transfusions in Dengue Haemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. **Dengue Bulletin**. Vol.27, p.138-143, 2003.

Chambers, TJ; Hahn, CS; Galler, R; and Rice, CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev. Microbiol.** 44, p.649–688, 1990.

Chareonsirisuthigul, T; Kalayanaroj, 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. **Journal of General Virology**, n.88, p.365-375, 2007.

Chau, TNB; Quyen, NTH; Thuy, TT; Tuan, NM; Hoang, DM; Dung, NTP; Lien, LB; Quy, NT; Hieu, NT; Hieu, LTM; Hien, TT; Hung, NT; Farrar, J; Simmons CP. Dengue in Vietnamese Infants – Results of Infection-Enhancement Assays Correlate with Age-Related Disease Epidemiology, and Cellular Immune Responses Correlate with Disease Severity. **Journal of Infectious Disease**, Vol.198, n.4, p.516-524, 2008

Chong, BH; Kwok, JC. Molecular Mechanisms of Drug-Induced Thrombocytopenia. In Colman, R.W.; Clowes, A.W.; Goldhaber, S.Z.; Marder, V.J.; George, J.N. **Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins. Cap.29, p.505-516, 2006.

Clark, SR; Ma, AC; Tavener, SA; McDonald, B; Goodarzi, Z; Kelly, MM; Patel, KD; Chakrabarti, S; McAvoy, E; Sinclair, GD; Keys, EM; Allen-Vercoe, E; DeVinney, R; Doig, CJ; Green, FHY; Kubes, P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nature Medicine**, Vol.13, n.4, p. 463-469, 2007.

Clarke, DH; Casais, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination - inhibition with arthropode - borne viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**; Vol.7, p.561-573, 1958.

Clyde, K; Kyle, JL; Harrys, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, Vol. 80, n. 23, p.11418-11431, dec. 2006.

Cologna, R; Armstrong, PM; Rico-Hesse, R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. **Journal of Virology**, Vol.79, n.2, p.853-859, jan. 2005.

Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochemical Journal**, Vol.341, p.233-249, 1999.

da Cunha, RV; Miagostovich, MP; Petrola, Z; de Araújo, ESM; Cortez, D; Pombo, V; de Souza, RV; Nogueira, RMN; Schatzmayr, HG. Retrospective Study on Dengue in Fortaleza, State of Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.93, n.2, p.155-159, 1998.

de Almeida, AJ; Campos-de-Magalhães, M; Brandão-Melo, CE; Oliveira, RV; Espírito-Santo, MP; Yoshida, CFT; Lampe, E. Detection of Hepatitis C Vírus in Platelets: evaluating Its Relationship to Antiviral Therapy Outcome. **Hepato-Gastroenterology**, 55, 2009.

de Botton S; Sabri, S; Daugas, E; Zermati, Y; Guidotti, JE; Hermine, O; Kroemer, G; Vainchenker, W; Debili, N; Platelet formation is the consequence of caspase activation within megacaryocytes. **Blood**, Vol.100, n.4, p.1310-1317, 2002.

de Souza, LJ; Martins, ALO; Paravidini, PCL; Nogueira, RMR; Neto, CG; Bastos, DA; Siqueira, EWSS; Carneiro, RC. Hemorrhagic Encephalopathy in Dengue Shock Syndrome: A Case Report. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Vol.9, n.3, p.257-261, 2005.

de Souza, LJ; Nogueira, RMR; Soares, LC; Soares, CEC; Ribas, BF; Alves, FP; Vieira, FR; Pessanha, FEB. The Impact of Dengue on Liver Function as Evaluated by Aminotransferase Levels. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Vol.11, n.4, p.407-410, 2007.

Dejnirattisai, W; Jumnainsong, A; Onsirirakul, N; Fitton, P; Vasanawathana, S; Limpitikul, W; Puttikhunt, C; Edwards, C; Duangchinda, T; Supasa, S; Chawansuntati, K; Malasit, P; Mongkolsapaya, J; Screaton, G. Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. **Science**, Vol.328, p.745-748, 2010.

Dejnirattisai, W; Duangchinda, T; Lin, CLS; Vasanawathana, S; Jones, M; Jacobs, M; Malasit, P; Xu, X; Screaton, G; Mongkolsapaya J. A Complex Interplay among Virus, Dendritic Cells, T Cells, and Cytokines in Dengue Virus Infections. **Journal of Immunology**, Vol.181, p.5865-5874, 2008.

Dimaano, EM; Saito, M; Honda, S; Miranda, EA; alonzo, MTG; Valério, MD; Mapua, CA; Shingo, I; Kumaori, A; Matias, R; Natividad, FF; Oishi, K. Lack of Efficacy of High-Dose Intravenous Immunoglobulin Treatment of Severe Thrombocytopenia in Patients with Secondary Dengue Virus Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.77, n.6, p.1135-1138, 2007.

Edgil, D; Polacek, C; Harris, E. Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. **Journal of Virology**, Vol. 80, n. 6, p.2976-2986, 2006.

El-Bacha, T; Midlej, V; da Silva, APP; Costa, LS; Benchimol, M; Galena, A; Da Poian, AT. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. **Biochimica et biophysica Acta**, Vol.1772, p.1158-1166, 2007.

Everett, H; McFadden, G. Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria. **Virology**, Vol.288, p.1-7, 2001

Falconar, AKI;.Antibody Response Are Generated to Immunodominant ELK/KLE-Type Motifs on the Nonstructural-1 Glycoprotein during Live Dengue Virus Infection in Mice and Humans: Implications for Diagnosis, Pathogenesis, and Vaccine Design. **Clinical and Vaccine Immunology**, Vol.14, n.5, p.493-504, 2007.

Falconar, AKI. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesion proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Archives of Virology**, Vol.142, p.897-916, 1997.

Falgout, B; Pethel, M; Zhang, YM; Lai, CJ. Both Nonstructural Proteins NS2B and NS3 Are Required for the Proteolytic Processing of Dengue Virus Nonstructural Proteins. **Journal of Virology**. Vol.65, n.5, p.2467-2475, 1991.

Fernandez-Mestre, MT; Gendzekhadze, K; Rivas-Vetencourt, P; Layrisse, Z. TNF-alpha-308^a allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, Vol.64, n.4, p.469-472, 2004.

Ferreira, MLB; Cavalcanti, CG; Coelho, CA; Mesquita, SD. Manifestações neurológicas de Dengue: Estudo de 41 casos. **Arquivo de neuropsiquiatria**, Vol.63, n.2-B, p.488-493, 2005.

Flaujac, C; Boukour, S; Cramer-Borde, EC. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. **Cellular and Molecular Life Science**, Vol.67, p.545-556, 2010

Garedew, A; Henderson, SO; Moncada, S. Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. **Cell Death and Differentiation**, 2010.

George, JN; Colman, RW. Overview of Platelet Structure and Function. In Colman, R.W.; Clowes, A.W.; Goldhaber, S.Z.; Marder, V.J.; George, J.N. **Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins. Cap.24, p.438-441, 2006.

Ghosh, K; Gangodkar, S; Jain, P; Shetty, S; Ramjee, S; Poddar, P; Basu, A. Imaging the Interaction Between Dengue 2 Virus and Human Blood Platelets Using Atomic Force and Electron Microscopy. **Journal of Electron Microscopy**, Vol.57, n.3, p.113-118, 2008.

Gil, L; Martinez, G; Tapanez, R; Castro, O; González, D; Bernardo, L; Vázquez, S; Kouri, G; Guzmán, MG. Oxidative stress in adult dengue patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 71, n.5, p.652-657, 2004.

Green, S; Vaughn, DW; Kalayanarooj, S; Nimmannitya, S; Suntayakorn, S; Nisalak, A; Lew, R; Innis, BL; Kurane, I; Rothman, AL. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. **Journal of Infectious Disease**, Vol.179, n4, p755-762, 1999

Gubler, DJ; Clark, GG. Dengue/ Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem, **Emerging Infectious Disease**, Vol. 1, no. 2. 1995.

Gubler, DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Vol.11, n.3, p.480-496, 1998.

Gubler, DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiology**. Vol.10, p.100-103, 2002.

Gubler, DJ; Kuno, G; Sather, GE; Velez, M; Oliver, A. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol.33, p.158-165, 1984.

Guzmán, MG; Kouri, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**. V. 2, p. 33-42, 2002.

Guzmán, MG; Kouri, G; Valdés, L; Bravo, J; Vázquez, S; Halstead, SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. **Panamerican Journal of Public Health**, Vol.11, n.4, p.223-227, 2002.

Halstead, SB; Antibodies Determine Virulence in Dengue. **Immunology and Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers: Ann. of New York Academy of Science**, 1171, p.E48-E56, 2009.

Halstead, SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? **Revista Panamericana de Salud Publica**, Vol.20, n.6, p.407-415, 2006.

Halstead, SB. Is there an inapparent dengue explosion? **Lancet**, Vol.27, n.353(9158), p.1100-1101, 1999.

Halstead, SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v.239, p.476-481, jan. 1988.

Hamburger, SA; McEver, RP; GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. **Blood**, Vol.75, p.550-554.

Heid, CA; Stevens, J; Livak, KJ; Williams, PM. Real time quantitative PCR. **Genome Research**. Vol.6, n.10, p.986-994, 1996.

Heinz, FX; Allison, SL. The machinery of flavivirus fusion with host cell membranes. **Current Opinion in Microbiology**, Vol.4 p.450-455, 2001.

Ho, LJ; Wang, JJ; Shaio, MF; Kao, CL; Chang, DM; Han, SW; Lai, JH. Infection of Human Dendritic Cells by Dengue Virus Cause Cell Maturation and Cytokine Production. **Journal of Immunology**, Vol.166, p.1499-1506, 2001.

Holland, PM; Abramson, RD; Watson, R; Gelfand, DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci USA**. Vol.88, p.7276-7280, 1991.

Honda, S; Saito, M; Dimaano, EM; Morales, PA; Alonzo, MTG; Suarez, LC; Koike, N; Inoue, S; Kumatori, A; Matias, RR; Natividad, FF; Oishi, K. Increased Phagocytosis of Platelets from Patients with Secondary Dengue Virus Infection by Human Macrophages. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.80, n.5, p.841-845. 2009

Igarashi, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **J Gen Virol**. Vol.40, p.531-44, 1978.

Italiano, JE Jr; Hartwig, JH. Megacaryocyte Development and Platelet Formation. In Michelson, A.D. **Platelets**. 2 ed. San Diego: Elsevier, cap.2, p.23-44, 2007.

Jayachandran, M; Brunn, GJ; Karnicki, K; Miller, RS; Owen, WG; Miller, VM. In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. **Journal of Applied Physiology**, Vol.102, p.429-433, 2007.

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. **Journal of Infectious Disease**, Vol.189, n.8, p.1411-1418, 2004.

Jobe, SM; Leo, L; Eastvold, JS; Dickneite, G; Ratliff, TF; Lentz, SR; Di Paola, J. Role of FcR γ and factor XIIIa in coated platelet formation. **Blood**, Vol.106, n.13, p.4146-4151, 2005.

Jobe, SM; Wilson, M; Leo, L; Raimondi, A; Molkenin, JD; Lentz, SR; Di Paola, J. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. **Blood**, 1ed, p.1489, 2007.

Kalayanarooj, S; Chansiriwongs, V; Nimmannitya, S. Dengue Patients at the Children's Hospital, Bangkok: 1995-1999 Review. **Dengue Bulletin**. Vol.26, p.33-43, 2002

Kalayanarooj, S; Vaughn, DW; Nimmannitya, S; Green, S; Suntayakorn, S; Kunentrasai, N; Viramitrachai, W; Ratanachu-ek, S; Kiatpolpoj, S; Innis, BL; Rothman, A. L.; Nisalak, A.; Ennis, F. A. Early Clinical and Laboratory Indications of Acute Dengue Illness. **The Journal of Infectious Diseases**, Vol. 176, p.313-321, 1997.

Keuren, JFW; Wienders, SJH; Ulrichs, H; Hackeng, T; Heemskerk, JWM, Deckmyn, H; Bevers, EM; Lindhout, T. Synergistic Effect of Thrombin on Collagen-Induced Platelet Procoagulant Activity Is Mediated Through Protease-Activated Receptor-1. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Vol.25, p.1499-1505, 2005.

Khromykh AA; Sedlak PL; Westaway EG. Trans-complementation analysis of the flavivirus Kujin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. **Journal of Virology**. Vol.73, n.11, p.9247-9255, 1999

Kiermayr, S; Kofler, RM; Mandl, CW; Messner, P; Heinz, FX. Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. **Journal of Virology**, Vol. 78, n. 15, p.8078-8084, 2004.

Kirtland, SJ; Baum, H. Mitochondrial respiration and the thrombin-induced release reaction of platelets. **Biochemical Pharmacology**, Vol.23, p.1859-1870, 1974.

Kliks SC; Nisalak A; Brandt WE; Wahl L; Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 40(4), p.444-451, 1989.

Kouri, YH; Borkowsky, W; Nardi, M; Karpatkin, S; Basch, RS. Human Megakaryocyte Have a CD4 Molecule Capable of Binding human immunodeficiency Virus-1. **Blood**, Vol.81, n.10, p.2664-2670, mai. 1993.

Kouri, GP; Guzmán, MG; Bravo, JR; Triana, C. Dengue haemorrhagic fever/ dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bulletin of the World Health Organization**, Vol.67, n.4, p.375-380, 1989.

Kouri G; Guzmán MG; Bravo J. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? II. An integral analysis. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.81, p.821-823, 1987.

Krishnamurti, C; Peat, RA; Cutting, MA; Rothwell, SW. Platelet Adhesion to Dengue-2 Virus-Infected Endothelial Cells. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol.66, n.4, p.435-441, 2002.

Kroemer, G; Galluzzi, L; Vandenabeele, P; Abrams, J; Alnemri, ES; Baehrecke, EH; Blagosklonny, MV; El-Deiry, WS; Golstein, P; Green, DR; Hengartner, M; Knight, RA; Kumar, S; Lipton, SA; Malorni, W; nuñez, G; Peter, ME; Tschopp, J; Yuan, J; Piacentini, M; Zhivotovsky, B, Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, Vol.16, p.3-11, 2009.

Kuhn, RJ; Zhang, W; Rossmann, MG; Pletnev, SV; Corver, J; Lenches, E; Jones, CT; Mukhopadhyay, S; Chipman, PR; Strauss, EG; Baker, TS; Strauss, JH. Structure of Dengue Virus: Implications for *Flavivirus* Organization, Maturation, and Fusion. **Cell**, Vol. 108, p.717-725, 2002.

Kumarasamy, V; Chua, SK; Hassan, Z; Wahab, AH; Chem, YK; Mohamad, M; Chua, KB. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. **Singapore Med J**. Vol.48, n.7, p.669-673, 2007.

Kuno, G; Gomez, I; Gubler, DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol.36, n.1, p.153-159, 1987.

Kuter, DJ; Begley, CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. **Blood**, Vol.100, n.10, p.3457-3469, nov. 2002.

La Russa, VF; Innis, BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. **Baillibre's Clinical Haematology**, Vol.8, n.1, p.249-270, mar. 2008.

Lanciotti, RS; Calisher, CH; Gubler, DJ; Chang, GJ; Vorndam, AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol.30, n.3, p.545-551, 1992.

Laue, T; Emmerich, P; Schmitz, H. Detection of Dengue Virus RNA in Patients after Primary or Secondary Dengue Infection by Using the TaqMan Automated Amplification System. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol.37, n.8, p.2543-2547, 1999.

Leitmeyer, KC; Vaughn, DW; Watts, DM; Salas, R; Chacon, IV; Ramos, C; Rico-Hesse, R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **Journal of Virology**, Vol.73, n.6, p.4738-4747, 1999.

Leytin, V; Allen, DJ; Mutlu, A; Gyulkhandanyan, AV; Mykhaylov, Freedman, J. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporine A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. **Laboratory Investigation**, Vol.89, p.374-384, 2009.

Leytin, V; Allen, DJ; Mykhaylov, S; Lyubimov, E; Freedman, J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. **Journal of thrombosis and Haemostasis**, Vol.4, p.2656-2663, 2006.

Libraty, DH; Endy, TP; Houn, HH; Green, S; Kalayanarooj, S; Suntayakorn, S; Chansiriwongs, W; Vaugh, DW; Nisalak, A; Ennis, FA; Rothman, AL. Differing Influences

of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. **The Journal of Infectious Disease**, Vol.158, p.1213-1221, 2002.

Libraty, DH; Pichyangkul, S; Ajariyakhajorn, C; Endy, T; Ennis, FA. Human Dendritic Cells Are Activated by Dengue Virus infection: Enhancement by Gamma Interferon and implications for Disease Pathogenesis. **Journal of Virology**, Vol.75, n.8, p.3501-3508, 2001.

Lin, CF; Chiu, SC; Hsiao, YL; Wan, SW; Lei, HY; Shiau, AL; Liu, HS; Yeh, TM; Chen, SH; Liu, CC; Lin, YS. Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules during Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein 1. **Journal of Immunology**, Vol.174, p.395-403, 2005.

Lin, CF; Wan, SW; Cheng, HJ; Lei, HY; Lin YS. Autoimmune Pathogenesis in Dengue Virus Infection. **Viral Immunology**, Vol.19, n.2, p.127-132, 2006.

Lin, YL; Liu, CC; Chuang, JI; Lei, HY; Yeh, TM; Lin, YS; Huang, YH; Liu, HS. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. **Virology**, Vol.276, p.114-126, 2000.

Lindenbach, BD; Rice, CM. Trans-Complementation of Yellow Fever Virus NS1 Reveals a Role in Early RNA Replication. **Journal of Virology**, Vol.71, n.12, p. 9608-9617, 1997.

Lindenbach, BD; Thiel, HJ; Rice, CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In Knipe, D.M.; Howley, P.M. In **Fields Virology**, 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1101-1252, 2007.

Lopez, JJ; Salido, GM; Pariente, JA; Rosado, JA. Thrombin induces activation and translocation of Bid, Bax and Bak to the mitochondria in human platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Vol.6, p.1780-1788, 2008.

Louache, F; Bettaieb, A; Henri, A; Oksenhendler, E; Farcet, JP; Bierling, P; Seligmann, M; Vainchenker, W. Infection of Megakaryocyte by Human Immunodeficiency Virus in Seropositive Patients With Immune Thrombocytopenic Purpura. **Blood**, Vol.78, n.7, p.1697-1705, 1991.

Lozach, PY; Burleigh, L; Staropoli, I; Navarro-Sanchez, E; Harriague, J; Virelizier, JL; Rey, FA; Despres, P; Renzanasidesdos, F; Amara, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3- grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p.23698-23708, 2005.

Mackenzie, JS; Gubler, DJ; Petersen, LR. Emerging Flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**. Vol.10, n.12, p.s98-s109, 2004.

Mackenzie, JM; Westaway, EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of Virology**, Vol. 75, n. 22, p.10787-10799, 2001.

Maianski, NA; Geissler, J; Srinivasula, SM; Alnemri, ES; Roos, D; Kuijpers, TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, Vol.11, p.143-153, 2004.

Mangada, MM; Endy, TP; Nisalak, A; Chunsuttiwat, S; Vaughn, DW; Libraty, DH; Green, S; Ennis, FA; Rothman, AL. Dengue-Specific T Cell Responses in Peripheral Blood Mononuclear Cells Obtained prior to Secondary Dengue Virus Infections in Thai Schoolchildren. **The Journal of Infectious Diseases**, n.185, p.1697-1703, 2002.

Mason, KD; Carpinelli, MR; Fletcher, JI; Collinge, JE; Hilton, AA; Ellis, S; Kelly, PN; Ekert, PG; Metcalf, D; Roberts, AW; Huang, DCS, Kile, BT. Programmed Anuclear Cell Death, Delimits Platelet Life Span. **Cell**, Vol. 128, p.1173-1188, 2007.

Matarrese, P; Straface, E; Palumbo, G; Anselmi, M; Gambardella, L; Ascione, B; Del Principe, D; Malorni, W. Mitochondria regulate platelet metamorphosis induced by opsonized zymosan A – activation and long-term commitment to cell death. **FEBS Journal**, Vol.276, p.845-856, 2009.

Mathew, A; Rothman, AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, v.225, p.300-313, 2008.

Miagostovich, MP; Vorndam, V; Araújo ESM; Santos, FB; Schatzmayr, HG; Nogueira, RMR. Evaluation of IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **Journal of Clinical Virology**. Vol.14, p.183-89, 1999.

Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: Diagnóstico e Manejo Clínico – Adulto e Criança**. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em Saúde: Dengue**. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=931>. Acesso em 02/09/2010.

Mintzer, DM; Billet, SN; Chmielewski, L. Drug-Induced Hematologic Syndromes. **Advances in Hematology**, Vol.2009, p.1-11, 2009.

Monath, TP. Dengue and Yellow Fever – Challenges for the Development and Use of Vaccines. **New England Journal of Medicine**, Vol.357, n.22, p.2222-2225, 2007.

Monath, TP. Dengue: The Risk to Developed and Developing Countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Vol. 91, p. 2395-2400. 1994.

Mongkolsapaya, J; Dejnirattisai, W; Xu, X; Vasanawathana, S; Tangthawornchaikul, N; Chairunsri, A. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. **Nature Medicine**, Vol.9, p-921-927, 2003.

- Morita, K; Tanaka, M; Igarashi, A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol.29, n.10, p.2107-2110, 1991.
- Mourão, M P; Lacerda, MV; Macedo, VO; Santos, JB. Thrombocytopenia in Patients with Dengue Vírus Infection in the Brazilian Amazon. **Platelets**, 18(8), p.605-612, Dez. 2007.
- Mukhopadhyay, S; Kun, RJ; Rossmann, MG. A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, Vol.3, p.13-22, 2005.
- Muñoz-Jordán, JL; Laurent-Rolle, M; Ashour, J; Martinez-Sobrido, L; Ashok, M; Lipkin, WI; García-Sastre, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **Journal of Virology**, Vol.79, n.13 p.8004-8013, 2005.
- Muñoz-Jordán, JL; Sánchez-Burgos, GG; Laurent-Rolle, M; García-Sastre, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Vol.100, n.24 p.14333-14338, 2003.
- Muylaert, IR; Galler, R; Rice, CM. Genetic Analysis of the Yellow Fever Virus NS1 Protein: Identification of a Temperature-Sensitive Mutation Which Blocks RNA Accumulation. **Journal of Virology**, Vol.71, n.1, p.291-298, 1997.
- Navarro-Sánchez, E; Altmeyer, R; Amara, A; Schwartz, O; Fieschi, F; Virelizier, JL; Arenzana-Seisdedos, F; Dèspres, P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Reports**, v. 4, p.723-728, 2003.
- Nightingale, ZD; Patkar, C; Rothman, AL. Viral replication and paracrine effects result in distinct, functional responses of dendritic cells following infection with dengue 2 virus. **Journal of Leukocyte Biology**, Vol.84, p.1028-1038, 2008.
- Nogueira, RM; Araújo, JMG; Schatzmayr, HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Vol.22, n.5, p.358-363, 2007.
- Nogueira, RM; Schatzmayr, HG; Filippis, AMB; dos Santos, FB; Cunha, RV; Coelho, JO; Souza, LJ; Guimarães, FR; Araújo, ESM; De Simone, TS; Baran, M; Teixeira Jr, G; Miagostovich, MP. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Disease**, Vol.11, n.9, p.1376-1381, 2005.
- Nogueira, RMR; Miagostovich, MP; Filippis, AMB; Pereira, MAS; Schatzmayr, HG. Dengue type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.96, n.7, p.925-926, 2001.
- Nogueira, RMR; Miagostovich, MP; Schatzmayr, HG; Moraes, GC; Cardoso, FMA; Ferreira, J; Cerqueira, V; Pereira, M. Dengue type 2 outbreak in the South of the State of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol.37, n.6, p.507-510, 1995.
- Nogueira, RMR; Zagne, SMO; Martins, ISM; Lampe, E; Miagostovich, MP; Schatzmayr, HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.86, n.2, p.269, 1991.

Noisakran, S; Gibbond, RV; Songprakhon, P; Juirungsri, A; Ajariyakhajorn, C; Nisalak, A; Jarman, RG; Malasit, P; Chokephaibulkit, K; Perng, GC. Detection of Dengue Vírus in Platelet Isolated from Dengue Patients. **Southeast Asia Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Vol. 40, n. 2, p.253-262, 2009a.

Noisakran, S; Chokephaibulkit, K; Songprakhon, P; Onlamoon, N; Hsiao, H; Villinger, F; Ansari, A; Perng, GC. A Re-evaluation of the Mechanisms Leading to Dengue Hemorrhagic Fever. **Immunology and Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers: Annals of the New York Academy of Sciences**, 1171, p.E24-E35, 2009b.

Ooi, EE; Gubler, DJ. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. **Caderno de Saúde Pública**, Vol.25, sup.1, p.S115-S124, 2008.

Osanai, CH; Travassos Da Rosa, APA; Tang, AT; Amaral, RS; Passos, ADC; Tauil, PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota Prévia. **Rev Inst Med Trop São Paulo** Vol.25, n.4, p.53-54, 1983.

Pan American Health Organization. Dengue in the Americas. 1980-1987. **Epidemiological Bulletin**, Vol.10, n.1, p.1-16, 1989.

Pan American Health Organization. Re-emergence of Dengue in the Americas. **Epidemiological Bulletin**, Vol.18, n.2, p.1-16, 1997.

Pang, T; Cardoso, MJ; Guzman, MG. Of Cascades and Perfect Storms: The Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever-Dengue Shock Syndrome (DHF/DSS). **Imunology and Cell Biology**, Vol.85, p.43-45, 2007.

Pang, T; Theofilopoulos, AN; Wilson, CB; Dixon, FJ. The Raji Cell Radioimmune Assay for Detecting Immune Complexes in Human Sera. **The Journal of Clinical Investigation**, Vol.57, p.169-182, 1976.

Patel-Hett, S; Richardson, JL; Schulze, H; Drabek, K; Isaac, NA; Hoffmeister, K; Shivdasani, RA; Bulinski, C; Galjart, N; Hartwig, JH; Italiano, JE Jr. visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. **Blood**, Vol.111, n.9, p.4605-4616, 2008.

Paul, BZS; Vilaire, G; Kunapuli, SP; Bennett, JS. Concurrent signaling from $G\alpha_q$ - and $G\alpha_i$ -coupled pathways is essential for agonist-induced $\alpha v\beta 3$ activation on human platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Vol. 1, p.814-820, 2002.

Peachman, KK; Lyles, DS; Bass, DA. Mitochondria in eosinophils: Functional role in apoptosis but not respiration. **PNAS**, Vol.98, n.4, p.1717-1722, 2001.

Perrotta, PL; Perrotta, CL; Snyder, EL. Apoptotic activity in stored human platelets. **Transfusion**, Vol.43, p.527-535, 2003.

Piccoli, C; Scrima, R; D'Aprile, A; Ripoli, M; Lecce, L; Capitanio, BN. Mitochondrial dysfunction in hepatitis C virus infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol.1757, p.1429-1437, 2006.

Polizel, J.R.; Bueno, D.; Visentainer, J.E.L.; Sell, A.M.; Borelli, S.D.; Tsuneto, L.T.; Dalalio, M.M.O.; Coimbra, M.T.M.; Moliterno, R.A. Association of Human Leukocyte Antigen DQ1 and Dengue Fever in a White Southern Brazilian Population. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.99, n.6, p.559-562, out. 2004.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.65, n.5, p.427-434, 2001.

Rand, ML; Wright, JF. Virus-associated Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. **Transfus. Sci.**, Vol.19, n.3, p.253-259, 1998.

Remenyi, G; Szasz, R; Friese, P; Dale, GL. Role of Mitochondrial Permeability Transition Pore in Coated-Platelet Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vol.25, p.467-471, 2005.

Rico-Hesse, R; Harrison, LM; Salas, RA; Tovar, D; Nisalak, A; Ramos, C; Boshell, J; de Mesa, MTR; Nogueira, RMR; Rosa, AT. Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas. **Virology**, Vol.230, p.244-251, 1997.

Ritchie, A; Braun, SE; He, J; Broxmeyer, HE. Thrombopoietin-induced conformational change in p53 lies downstream of the p44/p42 mitogen activated protein kinase cascade in the human growth factor-dependent cell line M07e. **Oncogene**, Vol.18, 1465-1477, 1999.

Rothman, AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, Vol.113, n.7, p.946-951, 2004.

Rothwell, SW; Putnak, R; La Russa, VF. Dengue-2 Virus Infection of Human Bone Marrow Characterization of Dengue-2 Antigen-Positive Stromal Cells. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 54(5), p.503-510, 1996.

Russell, PK; Brandt, WE; Dalrymple, JM. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In Schlesinger, R.W. **The Togaviruses. Biology, Structure, Replication**. New York: Academic Press, p.503-529, 1980.

Saito, M; Oishi, K; Inoue, S; Dimaano, EM; Alera, MTP; Robles, AMP; Estrella Jr, BD; Kumatori, A; Moji, K; Alonzo, MT; Buerano, CC; Matias, RR; Morita, K; Natividad, FF. Association of Increased Platelet-Associated Immunoglobulins with Thrombocytopenia and the Severity of Disease in Secondary Dengue Virus Infection. **Clinical and Experimental Immunology**, Vol.138, p.299-303, 2004.

Samsa, MM; Mondotte, JA; Iglesias, NG; Assunção-Miranda, I; Barbosa-Lima, G; DaPoian, AT; Bozza, PT; Gamarnik, AV. Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. **Plos Pathogens**, Vol.5, n.10, 2009.

Schalich, J; Allison, SL; Stiasny, K; Mandl, CW; Kunz, C; Heinz, FX. Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. **J. Virol.** 70, p.4549-4557, 1996.

Schatzmayr, HG; Nogueira, RMR; Travassos da Rosa, APA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.81, n.2, p.245-246, 1986.

Schatzmayr, HG. Dengue Situation on Brazil by Year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.95, Supl.I, p.179-181, 200.

Shcherbina, A; O'Donnell, ER. Role of Caspase in a Subset of Human Platelet Activation Responses. **Blood**, Vol.93, n.12, p.4222-4231, 1999.

Soundravally, R; Sankar, P; Bobby, Z; hoti, SL. Oxidative stress in severe dengue viral infection: Association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. **Platelets**, Vol.19, n.6, p.447-454, 2008.

Souza, DG; Fagundes, CT; Souza, LP; Amaral, FA; Souza, RS; Souza, AL; Kroon, EG; Sachs, AL; Cunha, FQ; Bukin, E; Atrasheuskaya, A; Ignatyev, G; Teixeira, MM. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue vírus infection. **PNAS**, Vol.106, n.33, p.14138-14143, 2009.

Stadler, K; Allison, SL; Schalich, J; Heinz, FX. Proteolytic Activation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Furin. **Journal of Virology**, Vol.71, n.11, p.8475-8488, nov. 1997.

Suksanpaisan, L; Susantad, T; Smith, DR. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. **Journal of Biomedical Science**, Vol.16, p.17, 2009.

Sun, DS; King, CC; Huang, HS; Shih, YL; Lee, CC; Tsai, WJ; Yu, CC; Chang, HH. Antiplatelet Autoantibodies Elicited by Dengue Virus Non-Structural Protein 1 Cause Thrombocytopenia and Mortality in Mice. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Vol.5, p.2291-2299, 2007.

Sun, P; Fernandez, S; Marovich, MA; Palmer, DR; Celluzi, CM; Boonak, K; Liang, Z; Subramanian, H; Porter, KR; Sum, W; Burgess, TH. Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. **Virology**, Vol.383, p.207-215, 2009.

Tanaka, M; Kamijo, T; Koike, K; Ueno, I; Nakazawa, Y; Kurokawa, Y; Sakashita, K; Komiyama, A; Fujisawa, K. Specific Autoantibodies to Platelet Glycoproteins in Epstein-Barr Virus-Associated Immune Thrombocytopenia. **International Journal of Hematology**, Vol.78, p.168-170, 2003.

Torres, EM. Dengue. **Estudos Avançados**. Vol.22, n.64, p.33-52, 2008.

Uehara, PM; da Cunha, RV; Pereira, GROL; Oliveira, PA. Envolvimento hepático em pacientes com dengue hemorrágico: manifestação rara? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol.39, n.6, p.544-547, 2006.

Urban, C; Zychlinski, A. Netting bactéria in sepsis. **Nature Medicine**, Vol.13, n.4, p.403-404, 2007.

Valero, N; Espina, LM; Anez, G; Torres, E; Mosquera, JA. Short Report: Increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.86, n.6, p.762-764, 2002.

Vasconcelos, PFC; Travassos da Rosa, ES; Freitas, RB. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaia, Tocantins, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol.35, n.2, p.141-148, 1993.

Vaughn, DW; Green, S; Kalayanarooj, S; Innis, BL; Nimmannitya, S; Suntayakorn, S; Endy, TP; Raengsakulrach, B; Rothman, AL; Ennis, FA; Nisalaki, A. Dengue Viremia Titer, Antibody Response, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **The Journal of Infectious Diseases**, 181, p.2-9, 2000.

Varrier, F; Mignotte, B; Jan, G; Brenner, C. Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target. **Annals of New York Academy of Sciences**, Vol. 1010, p.126-142, 2003.

Verhoeven, AJ; Verhaar, R; Gouwerok, EGW; de Korte, D. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. **Transfusion**, Vol.45, p.82-89, 2005.

Weyrich, AW; Prescott, SM; Zimmerman, GA. Platelets, Endothelial Cells, Inflammatory Chemokines, and Restenosis: Complex Signaling in the Vascular play Book. **Circulation**, Vol.106, p.1433-1435, 2002.

White, JG. Platelet Structure. In Michelson, AD. **Platelets**. 2 ed. San Diego: Elsevier, cap.3, p.45-73, 2007.

Whitehead, SS; Blaney, JE; Durbin, AP; Murphy, BR. Prospects for a Dengue Virus Vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, Vol.5, p.518-528, 2007.

World Health Organization. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009.

World Health Organization. **Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. 2 ed. Geneva: World Health Organization, 1997.

World Health Organization. Epidemic and Pandemic Alert and Response, Dengue/Dengue hemorrhagic fever, **Impact of Dengue**. Geneva: World Health Organization, 2009; Disponível em <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>>. Acesso em 24/03/2010.

Wu, SJ; Grouard-Vogel, G; Sun, W; Mascola, JR; Brachtel, E; Putvatana, R; Louder, MK; Filgueira, L; Marovich, MA; Wong, HK; Blauvelt, A; Murphy, GS; Robb, ML; Innes, BL; Birx, DL; Hayes, CG; Frankel, SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, Vol.6, n.7, p.816-820, 2000.

Zhang, Y; Corver, J; Chipman, PR; Zhang, W; Pletnev, SV; Dagmar, S; Baker, TS; Strauss, JH; Kuhn, RJ; Rossmann, MG. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**, Vol.22, n.11. p.2604-2613, 2003.

Zimmerman, GA. Two by Two: The pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. **PNAS**, Vol. 98, n.18, p.10023-10024, 2001.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

TÍTULO: Mecanismos de Ativação Plaquetária na Infecção pelo Vírus da Dengue

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo identificar alguns fatores associados à queda da contagem de plaquetas pela infecção pelo vírus da Dengue, visando estabelecer novos tratamentos e marcadores que auxiliem no diagnóstico da progressão para as formas graves.

PROPOSTA DO ESTUDO

O Sr(a) _____ está sendo convidado a participar deste estudo, que incluirá coleta de sangue para uso em pesquisa.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Será realizada a coleta de uma amostra de sangue de 50 (conquenta) mL, através de uma punção de veia periférica, utilizando-se material estéril e descartável. Este procedimento é semelhante à coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina.

Após a análise inicial, estas amostras ficarão armazenadas por 48 meses, para eventuais necessidades de realização de novas dosagens e/ou análises. Estas amostras estarão sob a responsabilidade do coordenador do estudo, Dr. Fernando Augusto Bozza.

BENEFÍCIOS

A sua participação no estudo não trará benefícios diretos, no entanto pode trazer benefícios para o aumento do conhecimento a respeito da doença e para melhorias em diagnóstico e tratamento, pois o material colhido será utilizado em diversos testes que ajudarão a entender como ocorre a patologia e a progressão para as formas mais graves da Dengue.

DESCONFORTOS E RISCOS

Os desconfortos que podem ocorrer são aqueles relacionados a uma retirada normal de sangue para exame, como dor no local da punção venosa e formação de um hematoma local.

Este estudo não implica em qualquer modificação do tratamento empregado nem em administração de medicamentos experimentais.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NO ESTUDO

A participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar, bem como cancelar sua participação a qualquer momento do estudo. Esta decisão não afetará de nenhuma maneira os cuidados médicos que lhe serão oferecidos.

CONFIDENCIALIDADE

O seu nome não será mencionado em publicações ou relatórios produzidos para este estudo. Entretanto seu prontuário médico poderá ser consultado pelos profissionais envolvidos no estudo.

SE VOCÊ TEM DÚVIDAS

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor, telefone para o Dr. Fernando Bozza no telefone 2562-1311.

CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua assinatura significa que você leu este formulário ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação no estudo.

Assinatura (Paciente)

Local e Data

Se o paciente não é capaz de consentir:

A sua assinatura, como representante legal do paciente, significa que você leu este formulário ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação do paciente no estudo.

_____ não é capaz de dar o seu consentimento.

Nome do Paciente (em letra de forma)

**Nome do Representante Legal
(em letra de forma)**

**Grau de parentesco com o paciente
(em letra de forma)**

Assinatura (Representante legal)

Local e Data