

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**STEPHANE VICENTE ROZINI**

**AVALIAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO DENV EM UM MODELO DE INTERAÇÃO  
PLAQUETA-MONÓCITO.**

**Juiz de Fora - MG**

**2023**

**STEPHANE VICENTE ROZINI**

**AVALIAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO DENV EM UM MODELO DE INTERAÇÃO  
PLAQUETA-MONÓCITO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, com concentração em Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Eugenio Damaceno Hottz**

**Co-orientador: Carolina de Queiroz Sacramento**

**Juiz de Fora - MG**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rozini, Stephane Vicente.  
AVALIAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO DENV EM UM MODELO DE INTERAÇÃO PLAQUETA-MONÓCITO. / Stephane Vicente Rozini. -  
- 2023. 65 p.

Orientador: Eugenio Damaceno Hottz  
Coorientadora: Carolina de Queiroz Sacramento  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.  
1. Dengue. 2. Plaquetas. 3. Replicação viral. 4. Interação plaqueta-monócito. I. Damaceno Hottz, Eugenio, orient. II. de Queiroz Sacramento, Carolina.

STEPHANE VICENTE ROZINI

**AVALIAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO DENV EM UM MODELO DE INTERAÇÃO PLAQUETA-MONÓCITO**

Dissertação  
apresentada  
ao Programa de Pós-  
graduação em  
Ciências Biológicas  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre em  
Ciências Biológicas.  
Área de  
concentração:  
Imunologia &  
Doenças  
Infectoparasitárias.

Aprovada em 10 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Eugenio Damaceno Hottz** - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Profª. Drª. Carolina de Queiroz Sacramento**

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

**Profª. Drª. Lauren Hubert Jaegger**

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Prof. Dr. Daniel Mansur**



Juiz de Fora, 25/10/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Eugenio Damaceno Hottz, Professor(a)**, em 10/11/2023, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lauren Hubert Jaeger, Professor(a)**, em 11/11/2023, às 09:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Santos Mansur, Usuário Externo**, em 07/12/2023, às 13:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina de Queiroz Sacramento, Usuário Externo**, em 23/01/2024, às 22:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1544517** e o código CRC **F97D05C7**.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter iluminado o meu caminho até aqui;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eugenio Hottz por ter me dado tantas oportunidades ao longo da minha trajetória, por todos os ensinamentos, motivação, críticas e confiança

À minha coorientadora, Dra. Carolina Sacramento que me guiou lado a lado durante todo o meu mestrado. Agradeço imensamente por toda orientação, toda a praticidade e calma que você transmitiu mesmo em meio a tantas mudanças e surtos. Eu ganhei não só uma mãe científica incrível, mas também uma grande amiga. Espero que se orgulhe da sua primeira aluna oficial. Amo você.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunofarmacologia (IOC), Mayara, Carol Freitas, Felipe, Lohanna, Mariana, Carlos e principalmente Bia e Remy. Bia, eu não sei o que teria sido de mim nesse mestrado sem você para dividir meu caos, viver desafios e me arrancar gargalhadas o tempo todo. Você é luz, uma duplinha maravilhosa. Remy, obrigada pela suavidade, pelas aulas, mentoria e por dividir o mundo das plaquetas comigo, ele é bem melhor com você.

Às minhas amigas do Laboratório de Imunotrombose, Paula, Milena e em especial às minhas veteranas, Laura e Cecillia. Obrigada pela parceria e amizade de sempre, por tudo que vivemos, aprendemos e construímos juntas. Mesmo cada uma estando em uma realidade diferente hoje, ainda somos um trio muito bom e eu levo vocês para minha vida.

Às minhas amigas da graduação que permaneceram, Cinthia, Hanna e Thais. Cinthia, compartilhar essa vida dupla de correria JFxRJ foi mais leve com você. Fico feliz que estejamos compartilhando o sonho de ser Fiocruzer juntinhas, de certa forma. Hanninha, obrigada por me apoiar e ser a amiga que está aqui comigo e por mim desde o primeiro dia de faculdade e mesmo com toda a distância. Amo vocês.

Aos colegas de pós-graduação, principalmente à minha amiga Vivi que esteve ao meu lado nas disciplinas e em todos os momentos cruciais do mestrado. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos de vida Sarah, Dudinha e Yuri, que seguem firme ao meu lado, vibrando comigo, sendo apoio e amor. E aos meus amigos que a vida carioca me deu, Kemily e Victor, por me apoiarem, por serem colo, carinho e tranquilidade.

Ao meu bemzinho, Elen, por dividir a vida comigo, por me incentivar, por ser meu porto seguro, minha calma, meu lar.

Aos meus familiares, por serem essa base tão sólida da minha vida. Mãe e Pai, obrigada por serem meu suporte, por incentivarem meus estudos e minha carreira acadêmica. Aos meus avós por todo carinho e torcida. As minhas tias e tios, especialmente Renata e Luciano que me acolheram em sua casa no RJ. As minhas primas que são minhas irmãs de coração e estão comigo sempre para tudo. Amo vocês.

Aos colaboradores da FIOCRUZ, em especial Patrícia T. Bozza e Thiago Moreno por terem aberto as portas do laboratório de vocês, por todo auxílio e ideias compartilhadas.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite.

E finalmente às agências de fomento, FAPEMIG, CAPES, CNPq, e UFJF por tornarem possível o desenvolvimento deste projeto.

## RESUMO

A dengue é uma arbovirose transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* e é considerada um problema de saúde global. Já foi descrito que o vírus da dengue (DENV) é capaz de infectar células como monócitos, macrófagos, células dendríticas, endoteliais e hepáticas. Sabe-se que plaquetas são capazes de internalizar, traduzir e replicar o genoma do DENV. No entanto, nosso grupo e outros demonstraram que a replicação em plaquetas é abortiva. Plaquetas de pacientes com dengue encontram-se mais ativadas e apoptóticas em comparação as células de voluntários saudáveis, e há um aumento na formação de agregados plaqueta-monócito. As plaquetas de pacientes com dengue ou infectadas com o DENV *in vitro* secretam mediadores inflamatórios como PF4, RANTES, IL-1 $\beta$  e MIF, e apresentam aumento na expressão de P-selectina e fosfatidilserina em sua superfície. Este conjunto de sinais expressos e secretados modula a interação com monócitos e a resposta inflamatória. Plaquetas infectadas com o DENV e incubadas com monócitos de voluntários saudáveis induzem a secreção de citocinas como IL-8, MCP-1, IL-10 e IL-6 nos monócitos. Apesar da replicação em plaquetas ser abortiva, nós temos por hipótese que durante a interação plaqueta-monócito as plaquetas seriam capazes de transferir o RNA viral recém-sintetizado para os monócitos, que dariam continuidade ao ciclo replicativo do vírus. Também questionamos se a interação plaqueta-monócito e a transferência do RNA viral poderiam levar a modulação da resposta inflamatória em monócitos através do reconhecimento de dsRNA por TLRs endossomais e sensores citosólicos. O presente projeto tem por objetivo avaliar se as plaquetas são capazes de transferir o genoma viral e/ou modular a resposta inflamatória dos monócitos, e por quais receptores isso ocorre. Nossos resultados demonstram que as plaquetas são capazes de transferir o genoma do DENV para monócitos primários *in vitro*. Além disso, o reconhecimento desse RNA viral em monócitos advindo de plaquetas infectadas levam ao aumento da secreção de IL-8 e MCP-1 nas coculturas, que é reduzido ao bloquear a via downstream de RIG-I/MDA-5, mas não de TLRs endossomais. No entanto, a transferência do RNA viral do DENV para monócitos não ocorre de forma que esses sejam capazes de gerar novas partículas virais infecciosas.

**Palavras-chave:** Plaquetas, monócitos, dengue, replicação viral, agregados plaqueta-monócitos.

## ABSTRACT

Dengue is an arbovirus disease transmitted by *Aedes* mosquitoes and is considered a global health problem. It has already been described that dengue virus (DENV) is capable of infecting cells such as monocytes, macrophages, dendritic, endothelial, and liver cells. It is known that platelets are capable of internalize, translate, and replicate DENV genome. However, our group and others have demonstrated that replication in platelets is abortive. Platelets from dengue patients are more activated and apoptotic when compared to healthy volunteers' cells, and there is an increase in platelet-monocyte aggregates. Platelets from DENV-patients or infected with DENV *in vitro* secrete inflammatory mediators such as PF4, RANTES, IL-1 $\beta$  and MIF, and show increased expression of P-selectin and phosphatidylserine on their surface. These signals modulates the interaction with monocytes and the inflammatory response. DENV-infected platelets incubated with monocytes from healthy volunteers induce the secretion of cytokines such as IL-8, MCP-1, IL-10 and IL-6 in monocytes. Although replication in platelets is abortive, we hypothesize that during platelet-monocyte interaction, platelets would be able to transfer the newly synthesized viral RNA to monocytes, which may continue the virus' replication cycle. We also questioned whether the platelet-monocyte interaction and the transfer of viral RNA could lead to inflammatory response modulation in monocytes through the recognition of dsRNA by endosomal TLRs and cytosolic sensors. This project aims to evaluate whether platelets can transfer the viral genome and/or modulate the inflammatory response of monocytes, and through which receptors it occurs. Our results demonstrate that platelets are capable of transferring the DENV genome to primary monocytes *in vitro*. Furthermore, the recognition of the viral RNA from infected platelets in monocytes induces increased IL-8 and MCP-1 secretion in cocultures, which is reduced by blocking the downstream pathway of RIG-I/MDA-5, but not of endosomal TLRs. However, the transfer of DENV RNA to monocytes does not occur in such a way that they are capable of generating new infectious viral particles.

**Keywords:** Platelets, monocytes, dengue, viral replication, platelet-monocyte aggregates.

## LISTA DE SIGLAS

- ACD - Anticoagulante contendo ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose
- ADE - Amplificação dependente de anticorpo
- ADP - Adenosina difosfato
- ATP - Adenosina Trifosfato
- C - Proteína do capsídeo viral
- CCL - Quimiocina ligante do motivo CC
- CCR - Receptor de quimiocina do motivo CC
- CD - Cluster de diferenciação (do inglês Cluster of differentiation)
- CXCL - Quimiocina ligante do motivo CXC
- DAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês Damage-Associated Molecular Pattern)
- DC-SIGN - Não-integrina acoplada a ICAM-3 específica de célula dendrítica (do inglês dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin)
- DENV - Vírus da dengue
- DF - Febre do dengue
- DHF - Febre hemorrágica do dengue
- DSS - Síndrome do choque do dengue
- dsRNA - Fita dupla de RNA
- E - Proteína do envelope viral
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA - Ensaio imunoenzimático
- FITC - Isotiocinato de Fluoresceína
- HEK - Células renais embrionárias humanas (do inglês Human embryoni kidney cells)
- HUVEC - Células endoteliais de vai umbilical humana
- IL - Interleucina
- LPS - Lipopolissacarídeos
- MCP-1 - Proteína quimioatraente de monócitos 1 (do inglês Monocyte Chemoattractant Protein-1)

MDA-5 - Gene 5 associado à diferenciação anti-melanoma (do inglês Anti-Melanoma Differentiation-Associated gene 5)

MIF - Fator inibidor da migração de macrófagos

NaCl - Cloreto de sódio

oxLDL - LDL oxidada

NETs - do inglês Neutrophil extracellular traps

NLR - Receptor do tipo NOD

NLRP3 - NLR contendo domínio pirina 3

NS - Proteína não estrutural de Flavivírus

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAMP - Padrão molecular associado a patógeno

PBS - Tampão fosfato e salina

PBMC - Células mononucleares de sangue periférico

PF4 - Fator Tecidual 4

PGE1 - Prostaglandina E1;

PSG - Tampão PIPES, salina e glicose

PrM - Proteína pré-membrana viral

PPP - Plasma pobre em plaquetas

PRP - Plasma rico em plaquetas

PRR - Receptor de reconhecimento de padrão

RANTES - Regulado por ativação, expresso e secretado por célula T normal

RIG-I - gene-I induzível por ácido retinóico (do inglês retinoic acid-inducible gene-I)

RNA - Ácido Ribonucleico

SFB - Soro Fetal Bovino

SH - Soro Humano

TBK1/IKK $\epsilon$  - do inglês TANK-binding kinase 1 (TBK1) and I-kappa-B kinase epsilon (IKK $\epsilon$ )

TBS - Tampão Tris e salina

TLR - Receptores do tipo Toll (do inglês Toll-like receptors)

TGF - Fator de crescimento e transformação

TNF - Fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
2.1	Epidemiologia	17
2.2	Aspectos clínicos	19
2.3	O vírus da dengue	21
2.3.1	Morfologia, genoma, proteínas virais e sorotipos	21
2.3.2	Ciclo de replicação	24
2.4	Patogênese da dengue	26
2.4.1	Monócitos na patogênese da dengue	28
2.4.2	Plaquetas na patogênese da dengue	30
2.4.3	Interações plaquetas-monócitos na dengue	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
3.1	Objetivo geral:	34
3.1.1	Investigar se plaquetas infectadas com o DENV modulam a replicação viral ou reprogramam a resposta inflamatória de monócitos por meio de transferência do genoma viral em um modelo de interação plaqueta-monócito <i>in vitro</i> .	34
3.2	Objetivos específicos	34
3.2.1	Estabelecer o protocolo e caracterizar a infecção e replicação produtiva do DENV em monócitos primários humanos;	34
3.2.2	Investigar se plaquetas infectadas com DENV <i>in vitro</i> transferem o material genético viral aos monócitos e se estes completam o ciclo de replicação gerando partículas infecciosas.	34
3.2.3	Investigar se há regulação da secreção de citocinas inflamatórias em monócitos após transferência do RNA viral do DENV por plaquetas infectadas e investigar a participação dos sensores de RNA.	34
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>35</b>



4.1	Cultura de células .....	35
4.1.1	Vero CCL81 e BHK-21 .....	35
4.2	Propagação viral .....	35
4.3	Voluntários saudáveis .....	36
4.4	Isolamento de células humanas do sangue periférico .....	36
4.5	Infecção de plaquetas e monócitos humanos <i>in vitro</i> com DENV-2 e cocultura homóloga de plaqueta-monócitos .....	37
4.5.1	Ensaio com inibidores de receptores de fita dupla de RNA .....	38
4.6	Avaliação da produção viral .....	39
4.6.1	Quantificação por RT-PCR em tempo real em etapa única .....	39
4.6.2	Ensaio de placa .....	40
4.6.3	Quantificação de IgG por Ensaio de imuno absorção enzimática (ELISA) .....	41
4.7	Avaliação da transferência de RNA viral na cocultura .....	41
4.7.1	Microscopia confocal de fluorescência .....	41
4.8	Avaliação do perfil inflamatório a partir da secreção de citocinas na interação plaqueta-monócitos .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
5.1	Monócitos primários humanos mantidos em soro humano replicam o vírus da dengue e formam novas partículas virais infecciosas .....	43
5.2	Soro humano comercial utilizado para cultivar os monócitos primários não apresenta anticorpos IgG anti-DENV que facilitem a entrada do vírus .....	45
5.3	Plaquetas infectadas com DENV <i>in vitro</i> são capazes de entregar o material genético viral recém-sintetizado aos monócitos .....	46
5.4	Monócitos primários humanos em cocultura com plaquetas infectadas com DENV não são capazes de dar continuidade ao ciclo de replicação viral após transferência de RNA viral .....	50
5.5	Interação plaqueta-monócito induz aumento da secreção de citocinas inflamatórias .....	52

5.6	Modulação da secreção de citocinas inflamatórias IL-8, MCP-1 e MIF através do reconhecimento de dsRNA por receptores da imunidade inata .....	54
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXO II.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose mais disseminada no mundo, atingindo 400 milhões de novos casos ao ano, e é considerada um problema de saúde pública global (NELWAN, 2018; WILDER-SMITH *et al.*, 2019). O vírus da dengue (DENV) pertence à família dos Flavivírus, apresenta 4 sorotipos distintos (DENV 1 - 4) e é transmitido pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* e *A. Albopictus* (WILDER-SMITH *et al.*, 2019). O material genético do DENV é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, a qual é traduzida em uma poliproteína, posteriormente clivada em proteínas estruturais (capsídeo C, membrana M e envelope E) e não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (YAP *et al.*, 2017).

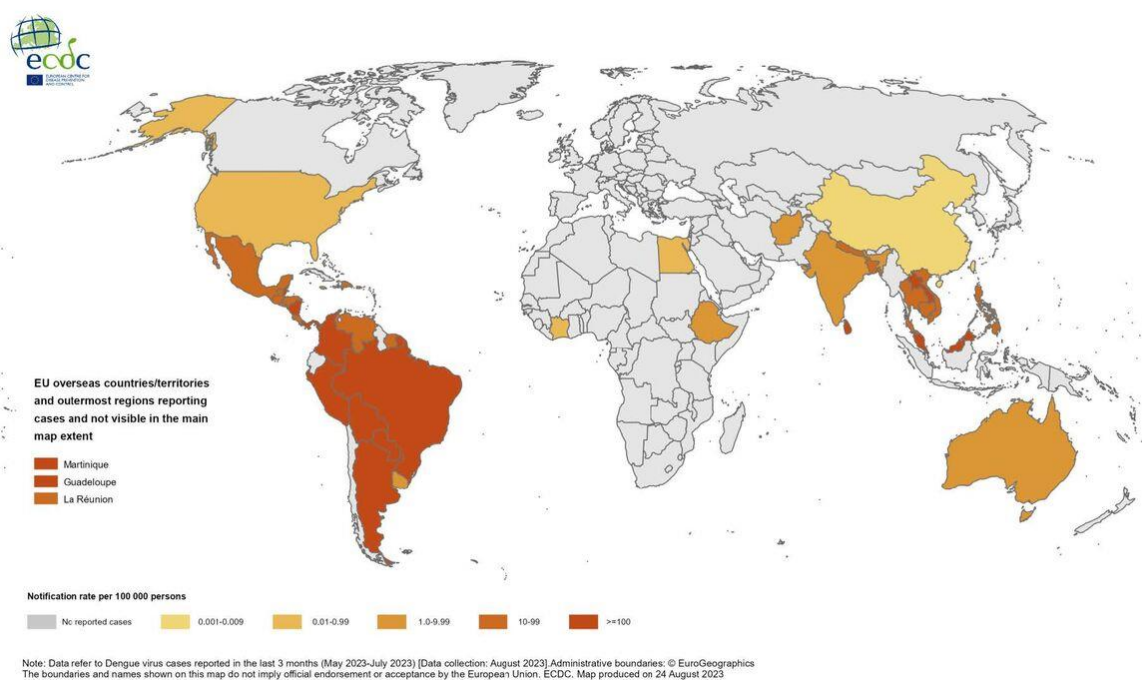
Atualmente já foi demonstrado que o DENV é capaz de infectar uma diversidade de tipos celulares como monócitos, macrófagos, células endoteliais, células dendríticas (HIDARI; SUZUKI, 2011; HSIEH *et al.*, 2020; HWANG *et al.*, 2022; OJHA *et al.*, 2019; TSAI *et al.*, 2017) e, mais recentemente, plaquetas (KAR *et al.*, 2017; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015). O DENV se liga a monócitos primários ou linhagem de monócitos humanos (THP-1) por meio de receptores de manose e moléculas associadas a CD14 (ACOSTA; KUMAR; BARTENSCHLAGER, 2014; HIDARI; SUZUKI, 2011) e essas células replicam o RNA viral produzindo novas partículas virais infecciosas (HSIEH *et al.*, 2020; HWANG *et al.*, 2022; TSAI *et al.*, 2014, 2017). O DENV também é capaz de aderir e infectar plaquetas por meio dos receptores como DC-SIGN e heparan sulfato (HOTTZ *et al.*, 2013b; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015) e essas células são capazes de traduzir e replicar o genoma viral (KAR *et al.*, 2017; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015). No entanto, nosso grupo e outros demonstraram que essa replicação é não-produtiva, visto que novas partículas virais infecciosas não foram detectadas no sobrenadante de plaquetas infectadas (KAR *et al.*, 2017; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020). Embora a replicação viral em plaquetas seja abortiva, sabe-se que plaquetas de pacientes com dengue apresentam-se mais ativadas e apoptóticas (CHAO *et al.*, 2019b; HOTTZ *et al.*, 2013a, 2013b, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2022; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020) e que essas contribuem para a patogênese da doença ao amplificar a resposta inflamatória. Ademais, pacientes

com dengue apresentam um aumento na formação de agregados plaqueta-monócito e esses correlacionam positivamente com trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular (HOTTZ *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que a interação *ex-vivo* de monócitos de voluntários saudáveis com plaquetas de pacientes com dengue leva ao aumento na produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 e MCP-1 (HOTTZ *et al.*, 2014). Experimentos *in vitro* do mesmo trabalho também demonstraram que plaquetas podem reprogramar monócitos por meio da expressão de P-selectina e reconhecimento de fosfatidilserina na superfície de plaquetas apoptóticas, induzindo o aumento da secreção de IL-8 e IL-10, respectivamente (HOTTZ *et al.*, 2014). Adicionalmente, já foi demonstrado que plaquetas apoptóticas de pacientes com dengue são fagocitadas por macrófagos em experimentos *ex-vivo* (ALONZO *et al.*, 2012). Em um modelo de interação plaqueta-monócito após infecção *in vitro*, estabelecido pelo nosso grupo, plaquetas infectadas com DENV e incubadas com monócitos são capazes de reprogramar o metabolismo lipídico do monócito com aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos e secreção de PGE2 de modo dependente da secreção da citocina MIF (BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020). No entanto, o impacto da reprogramação inflamatória e metabólica induzida pela interação plaqueta-monócito sobre a permissividade do monócito à replicação viral permanece desconhecida. Nossa hipótese é que, apesar do ciclo de replicação ser abortivo, as plaquetas infectadas com DENV são capazes de entregar o material genético viral recém-sintetizado aos monócitos, e que esses poderiam sustentar uma replicação viral produtiva e/ou reconhecer o genoma viral via sensores de RNA, contribuindo para a disseminação do vírus no organismo ou amplificação inflamatória na patogênese da dengue.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Epidemiologia

A dengue é uma arbovirose transmitida pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* e *A. albopictus* (*WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) AND THE SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TROPICAL DISEASES (TDR)*). É considerada uma doença tropical negligenciada e um problema de saúde global, com aproximadamente 400 milhões de novos casos e 22.000 mortes ao ano (BHATT *et al.*, 2013). Nos últimos 50 anos a incidência dos casos de dengue aumentaram cerca de 30 vezes (CDC 2014). Epidemias de dengue ocorrem anualmente nas regiões das Américas, Ásia, África e Austrália. De acordo com a Pan American Health Organization (PAHO), até agosto de 2023 a maioria dos casos de dengue no mundo foram notificados na América (mais de 3.3 milhões de casos e 1500 mortes), sendo o Brasil e o Peru os países com maior número registros (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa de casos reportados de dengue em 2023 de acordo com Pan American Health Organization (PAHO).

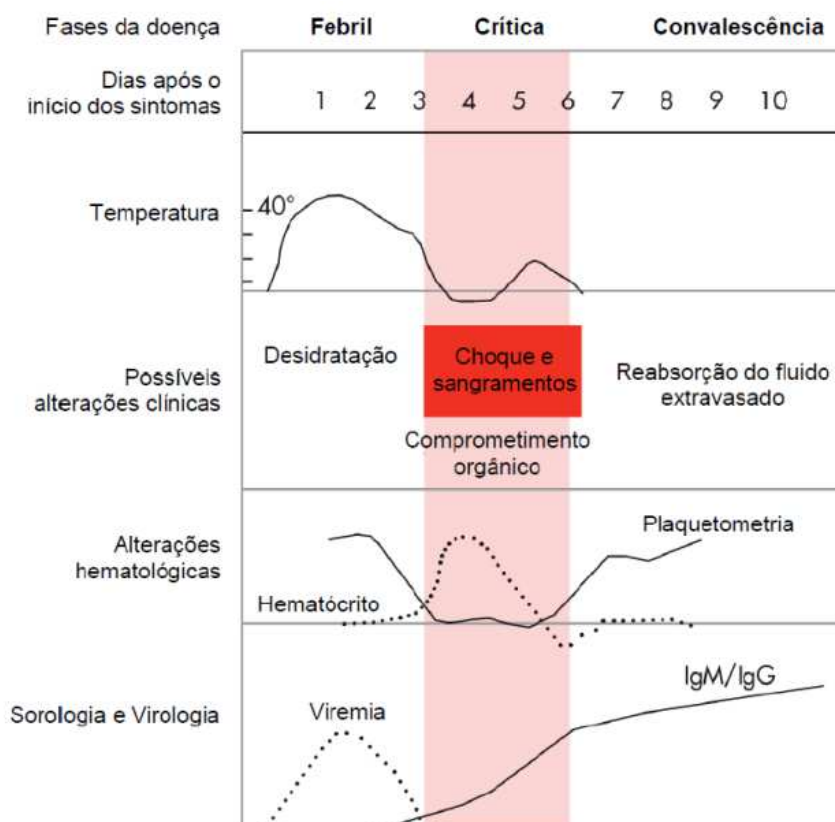
O primeiro surto de dengue registrado ocorreu em 1779 nas cidades de Jacarta, Indonésia e Cairo, no Egito (ROY; BHATTACHARJEE, 2021). No entanto, há relatos

anteriores da doença em uma enciclopédia médica chinesa datada de 992 a.C (SALLES *et al.*, 2018). A hipótese é que entre os séculos XIX e XX o vírus se espalhou pelos países tropicais e subtropicais, visto que já havia casos de uma doença com forte semelhança a dengue na Ásia e Américas antes do fim do século XVIII (SALLES *et al.*, 2018). A trajetória do dengue nas Américas foi dividida em 4 períodos: introdução da dengue nas Américas (1600–1946); plano continental para a erradicação do *A. aegypti* (1947–1970), que foi bem-sucedido em 18 países continentais; reinfestação pelo *A. aegypti* (1971-1999) causada pelo fracasso do programa de erradicação do mosquito; e aumento da dispersão do vetor e circulação do DENV (2000–2010), caracterizada por um aumento no número de surtos de dengue no mundo (SALLES *et al.*, 2018).

No Brasil, o primeiro registro de casos de dengue ocorreu no período colonial por volta de 1685, em Recife (SALLES *et al.*, 2018). Em 1846 teve-se a primeira epidemia de dengue no país abrangendo diversos estados, dentre eles Rio de Janeiro e São Paulo (SALLES *et al.*, 2018). Desde 2010 vem ocorrendo surtos endemo-epidêmicos de doença a cada três a cinco anos no Brasil (DICK *et al.*, 2012). O primeiro caso confirmado laboratorialmente no Brasil entre 1981 e 1982 no estado de Roraima foi causado pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4. O DENV-2 foi introduzido no Brasil em 1990, no estado do Rio de Janeiro, e foi associado aos primeiros casos de febre hemorrágica do dengue (DHS) no país (NOGUEIRA *et al.*, 1993; NOGUEIRA; ZAGNER, 1991; NUNES *et al.*, 2019). Nos anos seguintes, os sorotipos DENV-1 e DENV-2 circularam no Brasil causando pequenas epidemias. Já em 1993 nos estados do Amapá, Pará, Roraima e Tocantins foi introduzido o DENV-3 (BEZERRA *et al.*, 2021). A epidemia de 2002, considerada a mais grave até aquele momento, foi majoritariamente causada pelo DENV-3. Em 2015, um aumento no número de mortes causados pelo dengue, com uma epidemia explosiva onde tiveram 1.649.008 casos de dengue reportados sendo 986 casos fatais confirmados (NUNES *et al.*, 2019). Dessa forma, nos últimos 20 anos, os ciclos de epidemia de dengue que ocorreram no Brasil foram associados a predominância de diferentes sorotipos: DENV-1 (1998), DENV-3 (2002), DENV-2 (2008) e DENV-4 (2010) (BEZERRA *et al.*, 2021).

## 2.2 Aspectos clínicos

A dengue possui um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde quadros assintomáticos (cerca de 25%) à sintomáticos classificados como dengue branda com ou sem sinais de alarme, podendo evoluir para casos mais graves da doença, caracterizados por febre hemorrágica e choque (WHO AND SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES, 2009; WILDER-SMITH *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Aspectos clínicos da dengue. Adaptado de Who and Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (2009).

A infecção do hospedeiro humano pelo DENV ocorre pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* infectada. O período de incubação do vírus dura entre 4 a 7 dias, onde começa a fase febril (WHO AND SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES, 2009). Esta é caracterizada pela manifestação dos sintomas como febre, dores de cabeça, dores no corpo,

náusea, entre outros, além do pico de viremia e aumento do hematócrito (Figura 2). Após esse período, a febre cessa e a viremia diminui, dando início a fase crítica. Nessa fase há redução do número de leucócitos e plaquetas, inflamação sistêmica, aumento da permeabilidade vascular, podendo levar ao extravasamento vascular, hemorragia, hipotensão e choque, o que caracteriza a dengue grave (WHO AND SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES, 2009). É nesse momento que se deve atentar para intervenção médica caso sejam observados os sinais de alarme clínicos, definidos pela OMS em 2009 na nova classificação dos casos de dengue (Figura 3). Após esse período, caso o paciente sobreviva, tem-se início a fase de convalescência ou recuperação, onde há resolução da inflamação, reabsorção do fluido extravasado, aumento do número de plaquetas e leucócitos (Figura 2). Mesmo naqueles pacientes que passam por complicações, o quadro pode ser totalmente revertido em 1 ou 2 semanas tendo-se o devido suporte médico (WILDER-SMITH *et al.*, 2019).



**Figura 3.** Adaptado de Who and Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (2009).



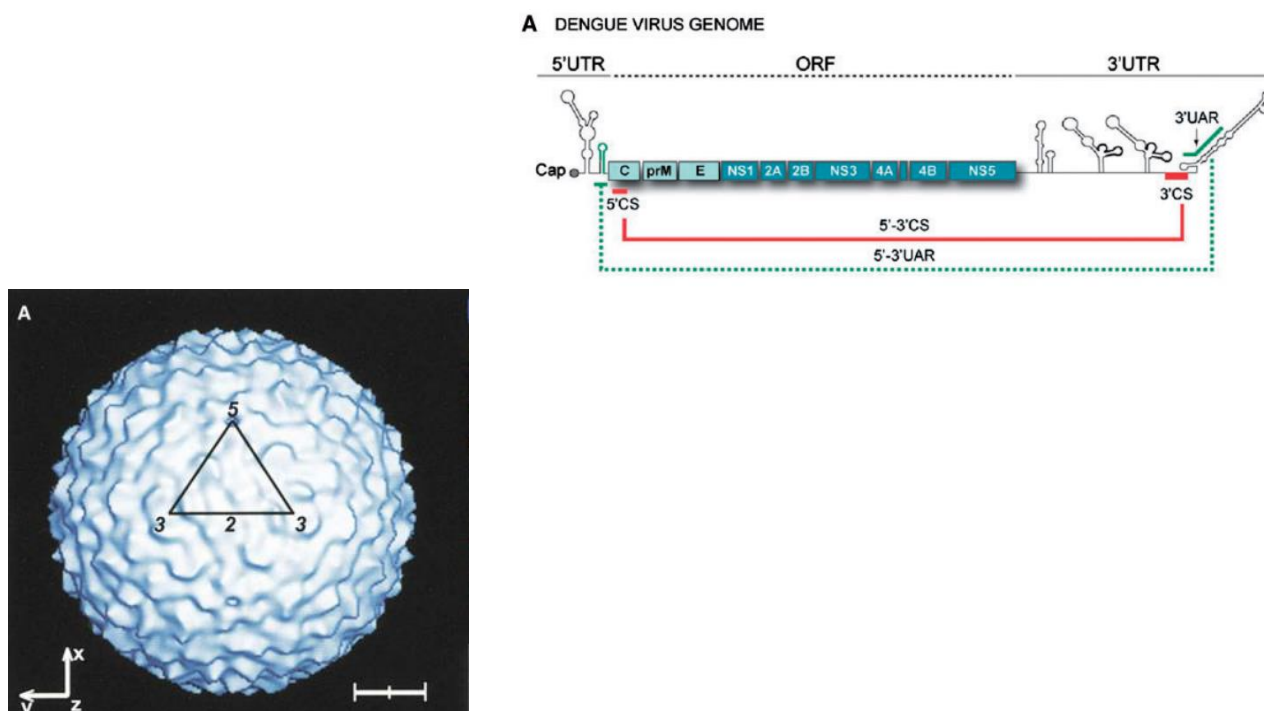
## 2.3 O vírus da dengue

### 2.3.1 Morfologia, genoma, proteínas virais e sorotipos

O vírus da dengue (DENV) pertence à família *Flaviridae*, gênero *Flavivirus*, juntamente com outros agentes etiológicos responsáveis por causar arboviroses humanas como o vírus da febre amarela (YFD), vírus da encefalite japonesa e vírus do Nilo Ocidental (WNV) (HARAPAN *et al.*, 2020; MURUGESAN; MANOHARAN, 2019). A partícula viral madura possui um diâmetro de 50 nanômetros (nm) e é caracterizado por um núcleo elétron-denso cercado por uma bicamada lipídica (KUHN *et al.*, 2002). Seu material genético é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, contendo 10.723 nucleotídeos, a qual é traduzida em uma poliproteína, posteriormente clivada em 3 proteínas estruturais (proteína do capsídeo (C), proteína precursora de membrana - prM, clivada em proteína de membrana (M) durante a maturação - e proteína do envelope (E)) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (DWIVEDI *et al.*, 2017; HARAPAN *et al.*, 2020; MURUGESAN; MANOHARAN, 2019)). Dessas últimas, a NS1 vem sendo bastante estudada por sua participação tanto na replicação viral quanto na indução de respostas imunes inatas e adaptativas (BEATTY *et al.*, 2015; CHAO *et al.*, 2019a; FAN; LIU; YUAN, 2014; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020). A NS2B e NS3 formam a protease do DENV e a NS5 é uma proteína multifatorial com domínio de atividade metiltransferase e polimerase RNA dependente de RNA (RdRp) (HARAPAN *et al.*, 2020; MURUGESAN; MANOHARAN, 2019).

A proteína C tem aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e está envolvida na encapsulação do genoma viral (HARAPAN *et al.*, 2020; KUHN *et al.*, 2002; MURUGESAN; MANOHARAN, 2019). Já proteína M é formada a partir de seu precursor prM após a clivagem do peptídeo “pr” que ocorre durante a maturação viral e se mantém como uma proteína transmembrana abaixo do invólucro da proteína E, funcionando como uma proteção que impede o peptídeo E de sofrer fusão prematura antes da liberação do vírus (HARAPAN *et al.*, 2020; MURUGESAN; MANOHARAN, 2019). O invólucro da glicoproteína consiste em 180 cópias da proteína E e M. A proteína E apresenta-se como 90 homodímeros cabeça-cauda que ficam planos contra a superfície do DENV formando uma camada protetora lisa e possui 3 domínios (I, II, III). O domínio III é o responsável pela ligação vírus-célula, tropismo e virulência (HARAPAN *et al.*, 2020; KUHN *et al.*, 2002; MURUGESAN; MANOHARAN, 2019).

As proteínas não estruturais desempenham um papel importante na replicação do genoma viral. A NS1 está envolvida no complexo de replicação viral (CR) e interage fisicamente com a NS4 (GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011; NANAWARE et al., 2021; NASAR; RASHID; IFTIKHAR, 2020). A NS2A também participa do CR e coordena a mudança entre empacotamento e replicação de RNA. A NS2B está associada a NS3 formando o complexo da protease. A NS3 possui múltiplas atividades enzimáticas e está envolvida na clivagem da poliproteína do DENV assim como na replicação do RNA. As NS4A e NS4B induzem alterações de membrana que também desempenham papel importante na replicação viral. Já a NS5 atua como metiltransferase e polimerase RNA dependente de RNA (GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011; NANAWARE et al., 2021; NASAR; RASHID; IFTIKHAR, 2020).



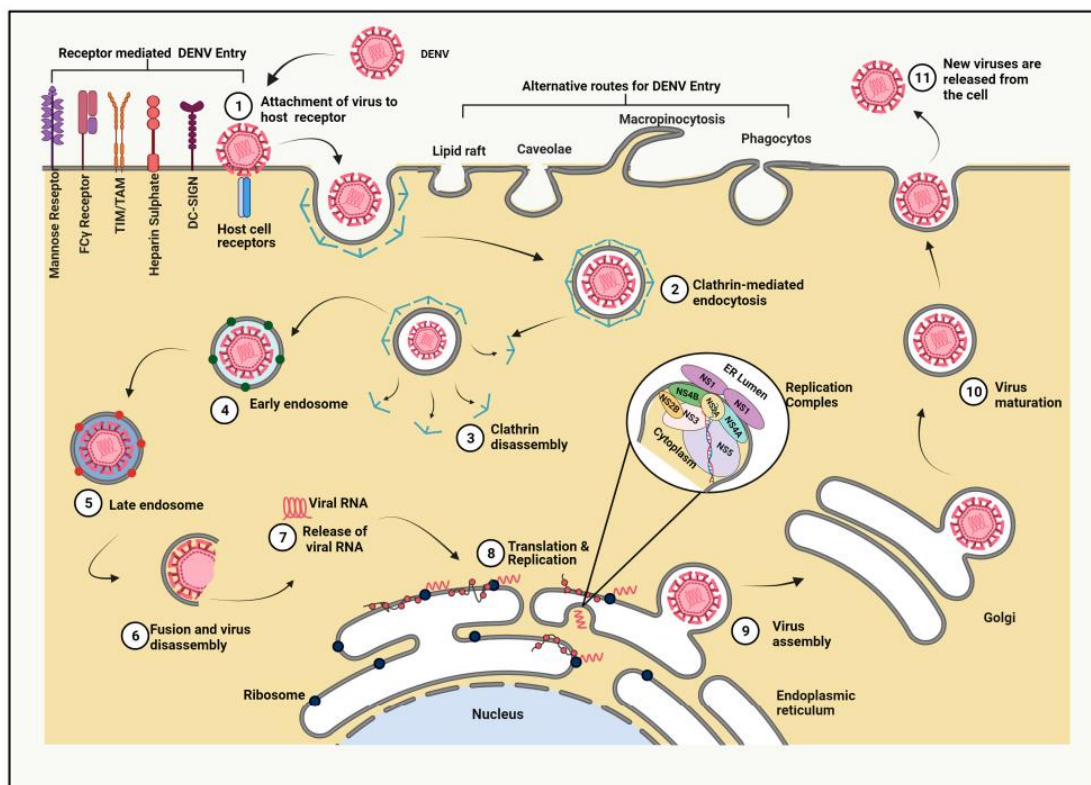
**Figura 4.** A esquerda a estrutura do vírus da dengue (KUHN *et al.*, 2002) e a direita seu material genético (GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011).

O DENV possui 4 sorotipos distintos (DENV1-4) que apresentam cerca de 65% de similaridade na sequência de aminoácidos entre si. Cada um dos sorotipos ainda

possui diferentes genótipos, que são agrupados por apresentarem menos de 6% de divergência na sequência de aminoácidos. Distribuídos globalmente os genótipos são divididos dentro de cada sorotipo da seguinte forma: DENV-1 (I, II, III, IV, V), DENV-2 (Asian I, Asian II, Cosmopolitan, American, American/Asian e Sylvatic), DENV-3 (I, II, III, V) e DENV-4 (I, II, III, Sylvatic). As variações de sorotipo, genótipos, podem influenciar na resposta imunológica do hospedeiro, levando assim a diferentes quadros clínicos.

### 2.3.2 Ciclo de replicação

O DENV é capaz de infectar uma ampla variedade de células como células epiteliais, dendríticas, monócitos e macrófagos, sendo esse últimos os principais sítios de infecção natural (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). Inicialmente, a proteína E do vírus se liga à célula hospedeira por meio de receptores de superfície e é internalizado por endocitose. O nucleocapsídeo é então liberado no citoplasma após a acidificação do endossomo, que desencadeia mudanças conformacionais no virion e leva a fusão da proteína do envelope com a membrana do endossomo. Assim que o genoma viral é liberado no citoplasma ocorre a tradução do RNA viral em uma única poliproteína a qual é processada por proteases virais e do hospedeiro, no retículo endoplasmático contendo ribossomos (ER). Posteriormente, a poliproteína é clivada para dar origem às proteínas estruturais e não estruturais (NANAWARE *et al.*, 2021; YAP *et al.*, 2017). O sítio específico da replicação viral que abrange a membrana do ER e as proteínas não estruturais (NS) é chamado de complexo de replicação (NANAWARE *et al.*, 2021). Durante a replicação do genoma viral, a NS5 (RdRp) é responsável por sintetizar uma fita negativa de RNA que serve de template para a produção de cópias do RNA positivo. O RNA recém-sintetizado é então replicado e se associa a proteína do capsídeo, levando a formação do nucleocapsídeo. A montagem do vírus ocorre na superfície do ER e proteínas estruturais juntamente com o novo RNA viral são liberadas da membrana do ER (ACOSTA; KUMAR; BARTENSCHLAGER, 2014; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). Os vírus imaturos são então transportados pela rede trans-golgi (ACOSTA; KUMAR; BARTENSCHLAGER, 2014; YAP *et al.*, 2017). O processo de maturação ocorre nessa etapa quando a proteína prM é clivada pela furina do hospedeiro. Os vírus maduros são posteriormente liberados para o meio extracelular por exocitose (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; YAP *et al.*, 2017). A Figura 5 exemplifica o ciclo replicativo do DENV.



**Figura 5.** Esquema do ciclo de replicação do vírus da dengue (NANAWARE *et al.*, 2021).

Estudos recentes também têm demonstrado que o DENV consegue se ligar a plaquetas por meio de receptores como heparan sulfato e DC-SIGN. Essas células são capazes de internalizar o vírus e replicar o genoma viral, visto que foi observado um aumento no número de cópias de RNA viral ao longo do tempo (KAR *et al.*, 2017a; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015). Além disso, as plaquetas são capazes de traduzir o genoma do DENV pois foi observada a expressão e secreção da NS1 no sobrenadante dessas células infectadas (KAR *et al.*, 2017a; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015). No entanto, a replicação do DENV em plaquetas é abortiva, já que análises do sobrenadante não foram capazes de detectar novas partículas virais infecciosas (KAR *et al.*, 2017b; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020).

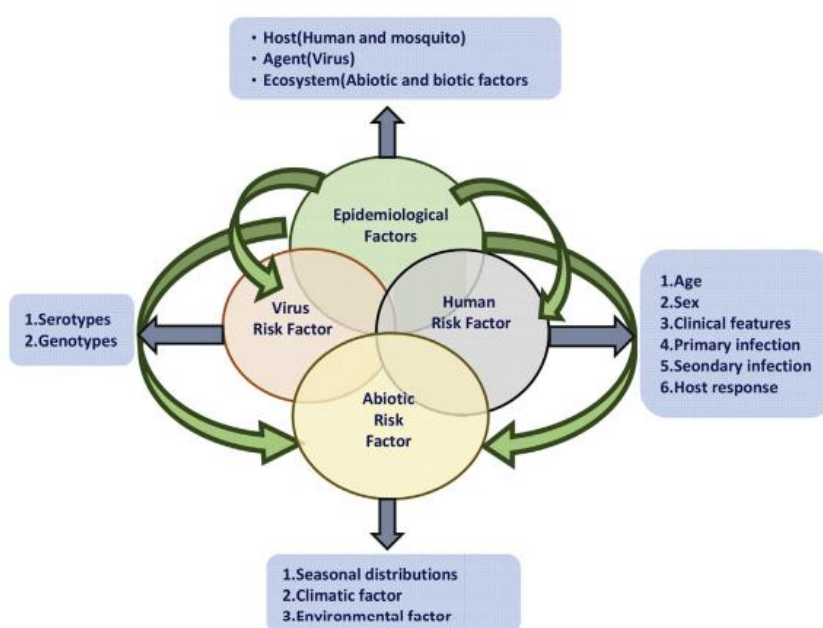
## 2.4 Patogênese da dengue

As primeiras células a serem infectadas pelo DENV são macrófagos residentes da pele do hospedeiro e células dendríticas (NANAWARE *et al.*, 2021). Essas migram para os linfonodos e dessa forma os macrófagos, monócitos e linfócitos são expostos à infecção. Os principais sítios de infecção do DENV reportados encontram-se no fígado, baço e pulmão através de DCs, macrófagos e monócitos (NANAWARE *et al.*, 2021). Sabe-se que em alguns casos, a dengue branda com ou sem sinais de alarme, pode evoluir para quadros mais graves da doença caracterizados pela febre hemorrágica. Esse quadro pode levar a um colapso vascular sistêmico com extravasamento vascular, hipovolemia e choque (BHATT *et al.*, 2021; NANAWARE *et al.*, 2021). No entanto, os mecanismos que levam a dengue grave ainda não estão completamente elucidados. Estudos demonstram que a patogênese da dengue é influenciada tanto por fatores virais quanto do hospedeiro. Hipóteses sugerem que a dengue grave pode estar associada a infecções secundárias, viremia, virulência do sorotipo de DENV e resposta inflamatória exacerbada.

Inicialmente, os casos graves de dengue foram associados a infecções secundárias em epidemias que ocorreram na Ásia (1960) e em Cuba (1980) e também a complicações após infecção primária em bebês nascidos de mães imunes ao DENV e que possuíam anticorpos maternos contra o vírus (BHATT *et al.*, 2021; HARAPAN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Esse fenômeno é conhecido como amplificação dependente de anticorpos (ADE - do inglês *Antibody-Dependent Enhancement*). Isso ocorre pois durante a infecção primária há produção de anticorpos subneutralizantes e de reatividade cruzada entre os sorotipos. Dessa forma, durante uma infecção secundária, com um sorotipo heterólogo, os anticorpos subneutralizantes da primeira infecção se ligam ao DENV formando complexos que são facilmente internalizados pelas células alvo através da ligação com o recetor Fc-gamma (FcγR) resultando em uma infecção aumentada, o que induz aumento da produção viral e consequente alta viremia (MARTÍNEZ-VEGA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020). Somado a isso, esses anticorpos não neutralizantes induzem alterações nas respostas celular e imune levando ao aumento da produção de DENV por célula (HARAPAN *et al.*, 2020; KATZELNICK *et al.*, 2017). Em um estudo de longo prazo em pacientes pediátricos na Nicarágua, foi demonstrado que a dengue grave está associada a baixa produção

de anticorpos anti-DENV, porém naqueles pacientes que possuíam títulos mais altos de anticorpos houve proteção em todos os casos sintomáticos da doença (KATZELNICK *et al.*, 2017). Adicionalmente, o DENV-2 foi associado a quadros de dengue grave durante a segunda infecção quando comparado a qualquer outro sorotipo. Esse fenômeno já foi confirmado *in vitro* com células que possuem o receptor FcγR e em modelos de infecção com DENV em camundongos e primatas não humanos (HARAPAN *et al.*, 2020; KATZELNICK *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020).

A Figura 6 a seguir sintetiza alguns dos fatores associados a dengue grave.



**Figura 6.** Esquema abrangendo fatores associados a gravidade da patogênese dengue.

Uma outra hipótese que explica os quadros graves de dengue é o pecado original antigênico de células T, que induz a chamada tempestade de citocinas (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003; ROTHMAN, 2011; ZOMPI; HARRIS, 2013). Nesse caso, as células B e T de memória ativadas durante uma primeira infecção pelo DENV respondem mais rápido do que células *naïve* durante uma segunda infecção heteróloga. Com isso, além das células T efetoras, as células de memória da infecção anterior são ativadas devido às similaridades entre os sorotipos de DENV(MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003; ROTHMAN, 2011). Elas atuam induzindo a morte de células infectadas por citotoxicidade e produzindo citocinas e quimiocinas inflamatórias de forma exacerbada, o que caracteriza a tempestade de citocinas. Estudos demonstram que em pacientes com dengue há um perfil aumentado de

citocinas pró e anti-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , CD54, CD62E, CD62P, GM-CSF, IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, INF- $\gamma$  e MIF quando comparado aos voluntários saudáveis (PUC *et al.*, 2021). Algumas citocinas como CD62E, CD62P, CD106, CD121b, IL-6 e IL-8 ainda diferem entre os pacientes de acordo com a gravidade (dengue com ou sem sinais de alarme e dengue grave) (PUC *et al.*, 2021).

#### 2.4.1 Monócitos na patogênese da dengue

A superprodução de citocinas pró-inflamatórias induzida pela ativação de células fagocíticas como monócitos, macrófagos e células dendríticas também são importantes fatores associados ao desenvolvimento da dengue grave (ANDRÉS *et al.*, 2019; SRIKIATKHACHORN; MATHEW; ROTHMAN, 2017). Como já dito anteriormente, a infecção pelo DENV se inicia após inoculação do vírus na derme e epiderme do hospedeiro através da picada da fêmea de mosquitos *Aedes* infectados pelo vírus. As primeiras células a serem afetadas são as células de Langherans e células dendríticas residentes do primeiro sítio de infecção (ANDRÉS *et al.*, 2019; NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÈS; CEDILLO-BARRÓN, 2005). Durante o processo de diferenciação das células dendríticas, estas migram para os linfonodos o que facilita a infecção de outros tipos celulares como monócitos e macrófagos (ANDRÉS *et al.*, 2019). Posteriormente, devido a replicação viral nos linfonodos, as partículas virais infecciosas chegam até a corrente sanguínea e infectam células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) como monócitos e células dendríticas mielóides, o que facilita o espalhamento da infecção para outros órgãos e tecidos (ANDRÉS *et al.*, 2019).

Os monócitos primários humanos são o principal sítio de infecção e disseminação do DENV na corrente sanguínea em infecções naturais. Estudos demonstram que em pacientes durante a fase aguda da dengue há presença de monócitos contendo antígenos de DENV (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). Essas células são subdivididas em populações de acordo com seus marcadores de superfície, sendo esses: monócitos clássicos (CD14++CD16-), monócitos intermediários (CD14++CD16+) e monócitos não clássicos (CD14+CD16+), os quais apresentam diferentes comportamentos durante a fisiopatologia do dengue (MAHESHWARI *et al.*, 2022). De maneira interessante, os monócitos intermediários de pacientes com



dengue apresentam genes altamente regulados envolvidos na disfunção endotelial, alterações vasculares e inflamação quando comparados a indivíduos saudáveis (MAHESHWARI *et al.*, 2022). Ademais estudos *in vitro* também demonstram que monócitos humanos primários são as células mais susceptíveis a infecção dentre os PBMCs e que esses são capazes de gerar novas partículas virais infecciosas (CHEN; WANG, 2002; HALSTEAD; O'ROURKE; ALLISON, 1977; HWANG *et al.*, 2022). Essa infecção produtiva ainda é facilitada e ampliada na presença de baixas doses de anticorpos anti-DENV do soro de indivíduos com imunidade para o vírus, mimetizando a ADE (DIAMOND *et al.*, 2000a; KOU *et al.*, 2008). Além disso, também há diferença na replicação viral do DENV de acordo com a cepa infectante e o tipo celular, variando entre monócitos primários, de linhagem como THP-1 e U937 ou diferenciados em macrófagos (DIAMOND *et al.*, 2000a; HWANG *et al.*, 2022).

Wong *et al.* (2012) demonstraram que monócitos CD16<sup>+</sup> e CD16<sup>-</sup> são igualmente susceptíveis a infecção pelo DENV e contribuem de forma semelhante para a proteção ao secretar fatores antivirais incluindo IFN- $\alpha$ , CXCL10 e TRAIL. Além disso, monócitos infectados com DENV contribuem para a fisiopatologia da doença pela produção de mediadores inflamatórios como, por exemplo, o óxido nítrico que está associado ao aumento da permeabilidade vascular (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). Também secretam uma variedade de citocinas inflamatórias dentre elas IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  e MIP-1a que modulam a função de outras células, particularmente as do endotélio vascular, contribuindo para o extravasamento vascular durante a dengue grave (Chen & Wang, 2002; Wan *et al.*, 2018). Outro estudo demonstrou que durante a fase aguda da dengue, pacientes apresentam uma menor expressão de TLR2 na superfície de monócitos quando comparados a voluntários saudáveis (AGUILAR-BRISEÑO *et al.*, 2020). No entanto, monócitos clássicos desses pacientes apresentam altos níveis de TLR2 quando comparados aos monócitos intermediários e não clássicos e essa expressão está correlacionada à gravidade da doença (AGUILAR-BRISEÑO *et al.*, 2020). De forma contraditória, a infecção com DENV em monócitos *in vitro* leva ao aumento da expressão de TLR2 e CD16 (AGUILAR-BRISEÑO *et al.*, 2020). Ademais, a secreção de citocinas inflamatórias como IFN- $\beta$  e IFN- $\lambda$ 1 por monócitos infectados é dependente de TLR2/CD14 e a ativação de TLR2 junto com seus co-receptores CD16 e TLR6 induzem ativação de células endoteliais impactando na integridade do endotélio *in vitro* (AGUILAR-BRISEÑO *et al.*, 2020).

O reconhecimento de fatores virais pelo sistema imune inato através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) tem um papel importante na resposta inflamatória durante doenças infecciosas (TSAI *et al.*, 2009). Particularmente, monócitos e macrófagos possuem TLRs em abundância, que participam do início de cascatas de sinalização ao serem ativados por PAMPs virais, desencadeando a secreção de citocinas inflamatórias como IL-8, IFN- $\alpha/\beta$  e TNF- $\alpha$  (TSAI *et al.*, 2009). Já foi demonstrado que o DENV ativa TLR3 em linhagem de monócitos como U937 e THP-1, levando ao aumento da secreção de IL-8 e IL-6 e que o mRNA do DENV colocaliza com TLRs endossomais como TLR3, 7 e 8 em células infectadas (TSAI *et al.*, 2009). De forma semelhante, um estudo realizado em cultura de hepatócitos (HepG) infectados com DENV demonstrou que a ativação de TLR3 por seu agonista poly (I:C) induz secreção de interferon tipo I (IFN- $\beta$ ) e IFN tipo III (IL-28A/B) e reduz a expressão de mRNA viral e a replicação viral nessas células (LIANG *et al.*, 2011). Dentre os receptores da imunidade inata que reconhecem dsRNA e participam da ativação das vias de IFN tem-se também o RIG-I (do inglês *retinoic acid-inducible gene 1*). O RIG-I é uma helicase citoplasmática que atua como um sensor de dsRNA e RNA intracelular gerados pela polimerase viral, que leva a ativação de fatores regulatórios de IFN e outros fatores de transcrição (NASIRUDEEN *et al.*, 2011). Também já foi demonstrado que células HuH-7 com silenciamento para RIG-I/MDA5 apresentam maior infecção por DENV1 quando comparada aos controles, e que há um aumento da expressão de RIG-I/MDA5 nas células infectadas. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que RIG-I/MDA5 atuam sinergicamente induzindo respostas antivirais por meio da secreção de IFN- $\beta$  (NASIRUDEEN *et al.*, 2011).

#### 2.4.2 Plaquetas na patogênese da dengue

As plaquetas são classicamente conhecidas por participarem da hemostasia, trombose e reparo tecidual. Elas têm origem a partir do alongamento do citoplasma de grandes células de origem mielóide conhecidas como megacariócitos. Os megacariócitos passam por um processo de endomitose, onde há replicação dos cromossomos, tornando-se células poliplóides, pois não ocorre a divisão celular (MACHLUS; JR, 2013). Essas células migram para as margens dos sinusoidais venosos da medula óssea e liberam fragmentos do seu citoplasma para dentro da

corrente sanguínea, conhecidos como pró-plaquetas, que posteriormente são fragmentados dando origem às plaquetas. Dessa forma, as plaquetas são entendidas como células anucleadas, que possuem conteúdo citoplasmático e organelas advindos de sua célula de origem.

As plaquetas possuem 3 tipos principais de grânulos que são os grânulos  $\alpha$ , densos e lisossomos (FLAUMENHAFT; SHARDA, 2018; HARRISON; MARTIN CRAMER, 1993). Os grânulos  $\alpha$  são os principais encontrados no citoplasma plaquetário e possuem uma variedade de conteúdos, majoritariamente proteicos, como moléculas de adesão (P-selectina, fibrinogênio, fator de Von Willebrand (VWF)), citocinas e quimiocinas (Fator Plaquetário 4 (PF4), MIF, IL-8, TGF- $\beta$ , PF4/CXCL4, RANTES/CCL5, CXCL7), fatores de coagulação V e VIII, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e VEGF, além de tromboxano A2, um eicosanoide capaz de ativar outras plaquetas e promover a contração da musculatura lisa (HARRISON; MARTIN CRAMER, 1993). Já os grânulos densos constituem cerca de 20% dos grânulos citoplasmáticos e estocam principalmente ATP e ADP, serotonina e íons de cálcio. A ativação plaquetária por distintos estímulos pode induzir a secreção desses grânulos.

Nos últimos anos, as plaquetas vêm sendo entendidas como células efetoras da resposta imune inata e da resposta inflamatória. Elas possuem receptores de reconhecimento de padrão (PRR), incluindo os da família dos *toll-like receptors* (TLR 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 9) (BISWAS *et al.*, 2017; CLARK *et al.*, 2007; CROZAT; BEUTLER, 2004; HALLY *et al.*, 2017; KOUPENOVA *et al.*, 2014; MODHIRAN *et al.*, 2017; SEMERARO *et al.*, 2011), NLR (do inglês *NOD-like receptors*) como NOD-2 (ZHANG *et al.*, 2015) e NLRP3 (HOTTZ *et al.*, 2013a) e CLR (do inglês *C-type lectin-like receptor*) como DC-SIGN e CLEC-2. Além disso, plaquetas possuem outros receptores de superfície como receptores ativados por protease conhecidos como PAR-1 e -4, receptores purinérgicos (P2YR), receptores de citocinas (receptor de IL-1 (IL-1R), receptor IFN tipo 1 (IFNARI), e receptor de TNF- $\alpha$  (TNFRI e TNFRII) e quimiocinas (CCRs e CXCRs). Recentemente nosso grupo publicou uma revisão de literatura sobre receptores imunes inatos em plaquetas e interações plaqueta-leucócitos (DIB *et al.*, 2020).

Como já dito anteriormente, plaquetas são capazes de internalizar o DENV, replicar e traduzir o genoma viral, no entanto, não são capazes de gerar novas partículas virais infecciosas (KAR *et al.*, 2017; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020;

SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015). No entanto, nós acreditamos que o RNA viral advindo das plaquetas poderia ser reconhecido por outras células do sangue periférico que apresentam receptores para dsRNA como os monócitos (ALEXOPOULOU *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2011; TSAI *et al.*, 2009; URCUQUI-INCHIMA; CABRERA; HAENNI, 2017), podendo estar contribuindo para resposta inflamatória e antiviral durante a dengue (LIANG *et al.*, 2011; TSAI *et al.*, 2009).

Já foi demonstrado que plaquetas de pacientes com dengue se encontram mais ativadas e apoptóticas, com aumento da expressão de P-selectina e fosfatidilserina em sua superfície, além da secreção de citocinas e quimiocinas inflamatórias como PF4 e RANTES (Hottz *et al.*, 2014a; Hottz, Oliveira, *et al.*, 2013; Trugilho *et al.*, 2017). Plaquetas de pacientes com dengue ou infectadas *in vitro* apresentam aumento da expressão de IL-1 $\beta$  e secreção de IL-1 $\beta$  por meio de micropartículas, a partir da ativação de caspase-1 e do inflamassomo NLRP3 (HOTTZ *et al.*, 2013a). Ademais, essa secreção de micropartículas contendo IL-1 $\beta$  foi associada ao aumento da permeabilidade vascular durante a dengue (HOTTZ *et al.*, 2013a). Nosso grupo também demonstrou que plaquetas de pacientes com dengue apresentam aumento da expressão de iNOS e secreção de óxido nítrico (NO) durante a fase aguda, quando comparadas a voluntários saudáveis e aos mesmos pacientes após a fase de convalescência (Anexo 1) (PINHEIRO *et al.*, 2022). Essa produção de NO foi associada a sinais de alarme em pacientes com dengue como manifestações hemorrágicas e gravidade da doença (PINHEIRO *et al.*, 2022). Nesse estudo, nós demonstramos que o estímulo por IL-1 $\beta$  induz a expressão de iNOS e produção de NO em plaquetas e que o bloqueio do receptor de IL-1 (IL-1R) por seu antagonista (IL-1Ra) leva a redução da expressão de iNOS e secreção de NO em plaquetas infectadas com DENV *in vitro*, sugerindo uma alça autócrina de sinalização (PINHEIRO *et al.*, 2022). A NS1 também é capaz de ativar plaquetas através de TLR4, levando a expressão de CD62P e induzindo respostas pró-trombóticas (CHAO *et al.*, 2019a) e inflamatórias com aumento da secreção de MIF, RANTES e TGF- $\beta$  (QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020). A participação das plaquetas durante a dengue está mais amplamente abordada em nossa revisão de literatura (Anexo 2) (QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2021).

### 2.4.3 Interações plaquetas-monócitos na dengue

Sabe-se que no contexto de inúmeras patologias infecciosas e não infecciosas há um aumento de interações plaquetas-leucócitos que desempenham um papel importante na resposta imune e inflamatória (DIB *et al.*, 2020; HOTTZ *et al.*, 2020). Durante a dengue, há indução da expressão de P-selectina, CD40L e HLA-I na superfície plaquetária (HOTTZ *et al.*, 2013b, 2019; TRUGILHO *et al.*, 2017), moléculas que estão envolvidas nas interações com linfócitos, monócitos e neutrófilos. Estudos recentes demonstram que durante a dengue há um aumento de agregados plaquetas-monócitos, o que correlaciona com a trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular em pacientes com dengue (HOTTZ *et al.*, 2014a; TSAI *et al.*, 2017a), além de interações plaqueta-neutrófilos que induzem a secreção de armadilhas extracelulares de DNA (NETs) (SUNG; HUANG; HSIEH, 2019). Plaquetas infectadas com dengue são ativadas por meio de CLEC-2 e secretam vesículas extracelulares que são capazes de ativar neutrófilos via TLR2 e CLEC5A induzindo NETs e secreção de citocinas (SUNG; HUANG; HSIEH, 2019). Experimentos *ex-vivo* com plaquetas de pacientes com dengue em cocultura com monócitos saudáveis levam ao aumento da secreção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-10 (HOTTZ *et al.*, 2014a). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que plaquetas infectadas com DENV e incubadas com monócitos induzem reprogramação do metabolismo lipídico em monócitos com indução de biogênese de corpúsculos lipídicos e secreção de PGE<sub>2</sub> de forma dependente da secreção de MIF, e contribuem para o aumento da secreção de outras citocinas inflamatórias como IL-6, IL-8, IL-10, CCL2/MCP-1 (BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020a). Outro estudo ainda demonstrou que plaquetas infectadas com DENV ou o sobrenadante dessas células induzem o aumento da replicação e propagação viral em monócitos (OJHA *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a secreção de PF4 foi associada a propagação e replicação de DENV e a inibição de PF4 nessas condições levou à redução da replicação viral e aumento da secreção de IFN- $\alpha$  (OJHA *et al.*, 2019). Dessa forma, será importante compreender os mecanismos que governam as interações de plaquetas infectadas pelo DENV com monócitos, e o papel da possível transferência do RNA viral das plaquetas aos monócitos na replicação viral e/ou produção de mediadores inflamatórios.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

3.1.1 Investigar se plaquetas infectadas com o DENV modulam a replicação viral ou reprogramam a resposta inflamatória de monócitos por meio de transferência do genoma viral em um modelo de interação plaqueta-monócito *in vitro*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Estabelecer o protocolo e caracterizar a infecção e replicação produtiva do DENV em monócitos primários humanos;

3.2.2 Investigar se plaquetas infectadas com DENV *in vitro* transferem o material genético viral aos monócitos e se estes completam o ciclo de replicação gerando partículas infecciosas.

3.2.3 Investigar se há regulação da secreção de citocinas inflamatórias em monócitos após transferência do RNA viral do DENV por plaquetas infectadas e investigar a participação dos sensores de RNA.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Cultura de células**

#### **4.1.1 Vero CCL81 e BHK-21**

Células epiteliais do rim de Macaco Verde Africano subtipo CCL81 (Vero CCL81) e células epiteliais de rim de hamster (BHK-21) foram cultivadas, respectivamente, em meio de cultura 199 (M199) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) ou DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose) com 5% de SFB e ambas foram tratadas com antibióticos (1% de penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100µg/mL). Ambas as culturas foram mantidas em garrafas de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> ou 175 cm<sup>2</sup>, em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) a 37°C e acompanhadas diariamente ao microscópio óptico de campo claro. Durante o repique as células foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato) 1x pH 7,2 e tratadas com tripsina 0,25 %.

### **4.2 Propagação viral**

Para a produção de estoques do DENV, nós propagamos o vírus DENV-2 (cepa 16881) em células Vero CCL-81. Para tal, as células (4x10<sup>6</sup> células-garrafa de cultura G) foram infectadas com um MOI de 0,1 e acompanhadas diariamente até observação do efeito citopático (CPE) causado pelos vírus. O sobrenadante do crescimento viral foi coletado e centrifugado por 5 minutos a 500 x g. O pellet contendo debris celulares foi descartado e o sobrenadante contendo o vírus foi novamente coletado e concentrado utilizando dispositivos de centrifuga com filtros de corte de 100 kDa (Amicon, Ultra-15) centrifugados a 2500 ou 3000 x g até obter um volume reduzido (aproximadamente 5 mL). O sobrenadante contendo o vírus concentrado foi aliquoteado e armazenado a -80°C. A titulação viral foi realizada através de ensaios de placa em células BHK-21.

### 4.3 Voluntários saudáveis

Foram coletadas amostras do sangue periférico de voluntários saudáveis a partir do protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa IOC/FIOCRUZ # 42999214.1.1001.5248 e HU-UFJF # 2.223.542. Foram incluídos voluntários de ambos os sexos, estudantes ou profissionais do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro mediante aos seguintes critérios: Maiores de 18 anos, sem apresentar sintomas de doenças infecciosas ou alergias, sem uso de anti-inflamatórios, antibiótico na última semana e sem ingestão de cafeína no dia da coleta.

### 4.4 Isolamento de células humanas do sangue periférico

Plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente por Hottz *et al.* (2013). Foram coletados 17 ml de sangue utilizando escalpe e seringa contendo 3 mL de citrato-ácido-dextrose (ACD - 8 g/L de ácido cítrico, 22,4 g/L de citrato de sódio e 2 g/L de dextrose; pH 5,1), transferidos para um Falcon estéril de 50mL, na cabine de fluxo laminar. O sangue foi centrifugado a 200 xg por 20 minutos, temperatura ambiente, com parada sem freio. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi recuperado, adicionados 100nM prostaglandina E1 (PGE1; Cayman 13010) e centrifugado a 500g por 20 min, a temperatura ambiente para formar o pellet de plaquetas. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi descartado e as plaquetas foram ressuspendidas em 2,5 ml de tampão salina-fosfato (PBS) contendo 2mM EDTA e 0,5% de albumina humana (HSA) e 100nM de PGE1 e incubada com 10 uL de anti-CD45 por 10 min e posteriormente com 20 mL de beads magnéticas por mais 10 minutos antes da purificação no magneto (Human CD45 depletion kit; StemCell, Easy Sep Technology). Vertemos as plaquetas purificadas em um novo tubo Falcon e adicionamos PSG (5 mM de PIPES, 145 mM de 35 NaCl, 4 mM de KCl, 50 µM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5,5 mM de glicose; pH 6,8) contendo 100nM de PGE1 para um volume final de 25 mL e novamente centrifugados a 500g por 20 min, a temperatura ambiente, com parada sem freio. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de meio M199 contendo HBSS, L-Glutamina e HEPES; (Lonza 12-117F). Foi realizada a contagem de plaquetas e a concentração plaquetária foi corrigida para 1x10<sup>9</sup> plaquetas/mL.



As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de voluntários saudáveis foram isoladas através de gradiente de Ficoll como descrito anteriormente (HOTTZ *et al.*, 2014) e os monócitos foram selecionados por aderência em placas de cultura celular (FERREIRA *et al.*, 2021). Para isso, os PBMCs foram plaqueados ( $10^6$  células/poço em placas de 48 poços) em meio 199 suplementado com 5% de SH ou 10% de SFB e incubados na estufa à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24h.

Após 24, 48 ou 72 h, o sobrenadante das culturas foi coletado para avaliação da produção de partículas virais infecciosas por ensaio de placa e do genoma viral por RT-qPCR, e a monocamada de células foi lisada para quantificação do RNA viral por RT-qPCR.

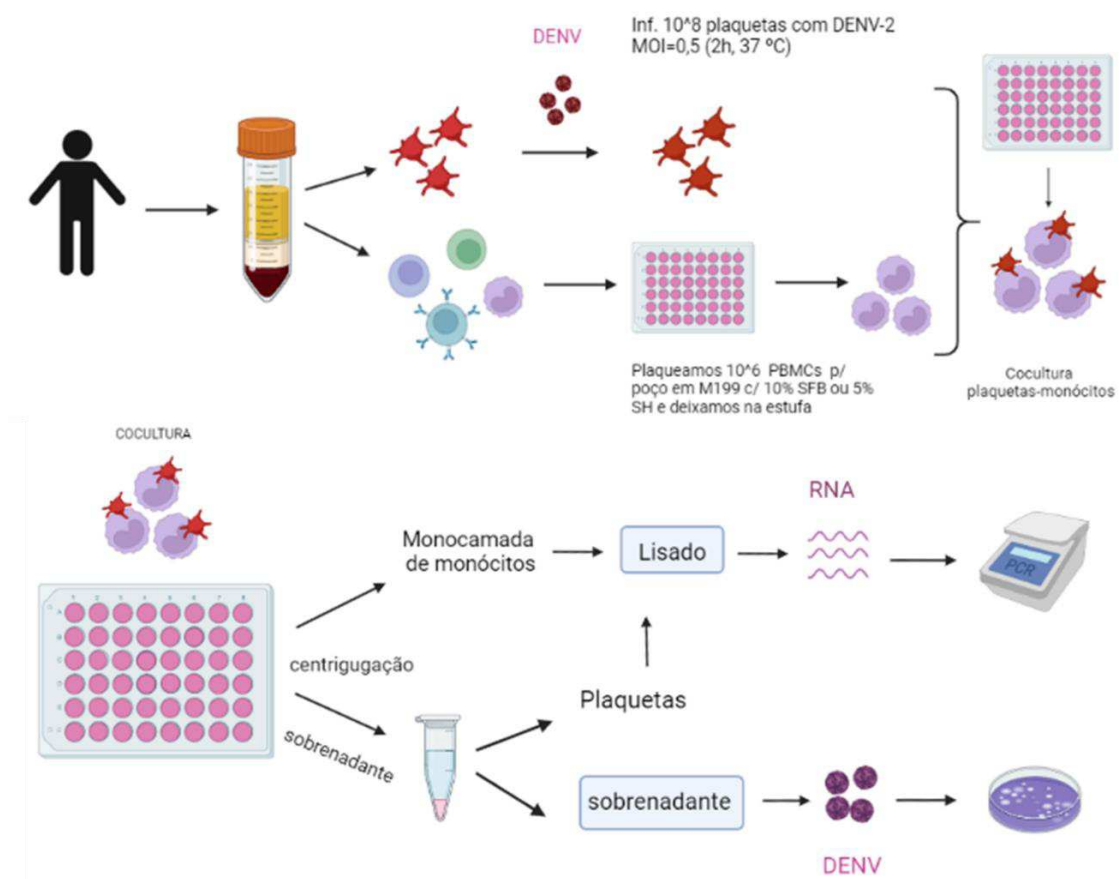
#### **4.5 Infecção de plaquetas e monócitos humanos *in vitro* com DENV-2 e cocultura homóloga de plaqueta-monócitos**

Após o período de seleção dos monócitos por aderência, as culturas foram lavadas com PBS para remoção das células não aderentes e os monócitos foram infectados com os diferentes MOIs do DENV-2 (cepa 16881) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 1h30min em 250 uL de M199 sem SFB ou SH. Após esse período, o inóculo foi removido, os poços foram lavados 2x com PBS para retirada dos vírus não adsorvidos e foi adicionado meio de cultura fresco suplementado com 5% de SH ou 10% de SFB.

As plaquetas isoladas foram infectadas com MOI de 0,5 do DENV-2 (cepa 16881) ou estimuladas com MOCK (veículo) por 2h, o inóculo/estímulo foi removido e as plaquetas foram lavadas para a retirada dos vírus não adsorvidos através de centrifugação por 15 minutos à 900 x g. As plaquetas foram então mantidas na estufa por 24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Após o período de adesão dos monócitos e infecção das plaquetas (24h), plaquetas infectadas (DENV) ou controle (MOCK) foram adicionadas aos monócitos e mantidas em cocultura por 24, 48 e 72h, condição chamada no decorrer do texto de cocultura. Como controle da replicação viral nas células separadamente, plaquetas infectadas foram mantidas em cultura na ausência de monócitos pelos mesmos períodos, e monócitos foram infectados com MOI 0,5 de DENV na ausência de plaquetas. Após 24, 48 e 72h de cocultura, o sobrenadante foi coletado e centrifugado para obtenção das plaquetas e a monocamada foi lavada 2x com PBS para obtenção dos monócitos. Em alguns casos foi utilizado a tripsina diluída 10x (0,025%) por 1

minuto na monocamada de monócitos, que foi lavada 2x antes da lise celular para RT-qPCR. Plaquetas e monócitos foram congelados a seco para posterior extração do RNA ou lisadas imediatamente com tampão de lise do Kit Promega para extração do RNA, como descrito a seguir. A metodologia dessa sessão está resumida em um esquema representativo na figura 7.



**Figura 8.** Esquema representativo dos experimentos de cocultura plaquetas-monócitos infectados.

#### 4.5.1 Ensaio com inibidores de receptores de fita dupla de RNA.

Para avaliar a modulação do perfil inflamatório dos monócitos após a transferência do RNA viral a partir de plaquetas infectadas na interação plaqueta-monócito, plaquetas foram infectadas com MOI=1 do DENV-2 seguido da cocultura com monócitos aderidos, seguindo os métodos descritos acima, e recolhemos o sobrenadante para quantificação de citocinas por ELISA. Além disso, em experimentos selecionados, os monócitos foram pré-tratados com inibidores do complexo TLR3/dsRNA (Sigma Catálogo 614310, 10,2 ug/mL), composto 5 antagonista de TLR3/7,8/9 (TAC-5, 2-Amino-3-benzyloxy pyridine, Sigma Catálogo

144487, 50 ug/mL) e o inibidor de TBK1/IKKε (Amlexanox; Invivogen; Catálogo: inh-amx, 150µg/mL). Tratamos os monócitos aderidos por 30 minutos antes de adicionar as plaquetas. Como controle negativo, tratamos as coculturas com DMSO (veículo).

#### 4.6 Avaliação da produção viral

##### 4.6.1 Quantificação por RT-PCR em tempo real em etapa única

###### 4.6.1.1 Extração de RNA

As extrações de RNA viral foram realizadas utilizando-se o kit ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep System, Custom (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foi adicionado 200 µL de tampão de lise celular (tampão CLD) e 20 µL de proteinase K a 200 µL da amostra a ser extraída (sobrenadante) ou no pellet congelado. Após incubação de 10 minutos a temperatura 56°C, foi adicionado 250 µL de tampão BBA para permitir a ligação do RNA à membrana de sílica em gel. Foram realizadas duas etapas de lavagens para retirada de impurezas com tampão CWD e o RNA viral purificado foi eluído em 80 µL de água livre de DNase/RNase e estocado a – 70°C até o momento de uso.

###### 4.6.1.2 RT-PCR em tempo real em única etapa

O RNA extraído foi submetido à reação de RT-PCR em tempo real em etapa única para quantificação do gene da proteína do envelope (E) de DENV-2 de acordo com o protocolo do Centers for Disease Control and Prevention/Atlanta – World Health Organization (CDC-WHO) (SANTIAGO et al., 2013). Utilizamos os primers de DENV na concentração de 50 µM com as sequências, além da sonda (na concentração de 10 µM) com as sequências a seguir (TABELA 1):

**Tabela 1.** Sequências de primers e probe utilizados no estudo.

<b>Alvo genético</b>	<b>Primer</b>	
<i>GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA E – DENV 2</i>	<i>Forward</i>	5'- CAGGCTATGGCACYGTCACGAT - 3'
	<i>Reverse</i>	5'- CCATYTG CAGCARCACCATCTC - 3'
	<i>Sonda</i>	5'- CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA - 3'

A reação foi realizada da seguinte forma:

**Tabela 2.** Reagentes para a reação de RT-qPCR.

REAGENTES	Volume ( $\mu$ l)
Enzima Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix	5
Primer direto ( <i>forward</i> )	1
Primer reverso ( <i>reverse</i> )	1
Sonda	0,5
Água Ultrapura livre de RNA/DNAse	7,5
Amostra de RNA	5
Volume total	20

A ciclagem utilizada no termociclador (Amplio96) foi 45°C por 15 minutos para etapa de transcrição reversa, 95°C por 10 minutos para inativar a enzima transcriptase reversa, 95°C por 2 minutos para desnaturação, 60 °C anelamento dos primers e sonda e 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos para a fase de extensão.

Para a quantificação do número de cópias de RNA obtido através da reação de RT-qPCR de cada amostra, foi utilizada a análise de curva padrão. Para tal, foi extraído o RNA de uma alíquota do vírus DENV-2 previamente titulado por unidade formadora de placas por ml (PFU/ml). Foi feita uma diluição seriada de base 10 do RNA viral (amostra bruta até  $10^{-6}$ ) e, após a reação de RT-qPCR, cada diluição foi correlacionada ao título viral em PFU/mL e ao Ct (cycle threshold). Foi feita uma curva de regressão linear no Excel que foi usada para o cálculo do número de cópias por ml das amostras coletadas.

#### 4.6.2 Ensaio de placa

Para os ensaios de formação de placas nós utilizamos células BHK-21 em placas de 12 ou 24 poços ( $5 \times 10^4$  e  $2,5 \times 10^4$  células/poço, respectivamente) em meio DMEM alta glicose com 10 % de SFB. Infectamos as células com diferentes diluições dos vírus concentrados para titulação ou dos sobrenadantes dos experimentos de infecção *in vitro* por 1h 30min na estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Adicionamos meio semissólido (DMEM alta glicose contendo carboximetilcelulose 1% (CMC) e suplementado com 1% SFB), incubamos as placas na estufa por 4 ou 5 dias após a

infecção e, posteriormente, as células foram fixadas com formalina 10% por 24 h e coradas com cristal violeta 0,4% por 40 minutos. O número de placas de lise celular foi contado e o título viral foi determinado em unidades formadoras de placa (PFU, do inglês *plaque forming units*) por mL.

#### 4.6.3 Quantificação de IgG por Ensaio de imuno absorção enzimática (ELISA)

Para investigar se a entrada e consequente replicação do vírus em monócitos mantidos em SH estava sendo facilitada pelo mecanismo de amplificação dependente de anticorpos (ADE – do inglês Antibody-Dependent Enhancement), nós avaliamos a presença de anticorpos IgG contra o vírus da dengue nos lotes de soro humano comercial utilizados através de KIT de ELISA para IgG contra o vírus dengue (EI266B-9601G; EUROIMMU), seguindo o protocolo do fabricante.

### 4.7 Avaliação da transferência de RNA viral na cocultura

#### 4.7.1 Microscopia confocal de fluorescência

Para investigar se o tratamento da cocultura plaquetas-monócitos com tripsina diluída (0,025%) foi eficiente em retirar as plaquetas aderidas aos monócitos e para avaliar a presença de RNA viral nessas células, nós fizemos marcação do núcleo com DAPI, do citoesqueleto com faloidina (Alexa-Fluor 488) e para fita dupla de RNA (dsRNA) com anticorpo primário monoclonal J2 não conjugado e secundário anti-mouse conjugado a um fluorocromo (Dylight 550). Para isso, preparamos placas de 24 ou 48 poços com lamínula adequada para a aderência dos monócitos por 24h. Após o experimento de cocultura e coleta do sobrenadante, nós lavamos os poços com PBS 1x e fixamos as lamínulas com PFA 4% por 20 min. Lavamos novamente e permeabilizamos com solução de Permeabilização – PBS (0.1% Triton + 0.2% BSA) por 10 min. Nos ensaios com marcação para o J2 nós diluímos o anticorpo primário (1:1000) em PBS CM (com adição de CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub> + 0,2% BSA) e deixamos incubando na geladeira overnight. Lavamos mais 2 vezes com 200uL de PBS CM e adicionamos 200uL/poço do anticorpo secundário anti-mouse dylight550 (1:1000) e deixamos por 1h. Lavamos os poços da mesma forma como a anterior e adicionamos 200uL/poço da faloidina Alexa fluor-488 por 30 min diluído em PBS 1X (1:400). Após esse período, lavamos com PBS 1x e adicionamos a sonda DAPI diluída (1:10000)

por 10 min. Lavamos novamente e por fim adicionamos 3uL de Vectashield sobre cada lâmina e montamos em uma lâmina grande para posterior visualização no microscópio confocal (ZEISS LSM710) da rede de plataformas tecnológicas da FIOCRUZ, no aumento de 40x.

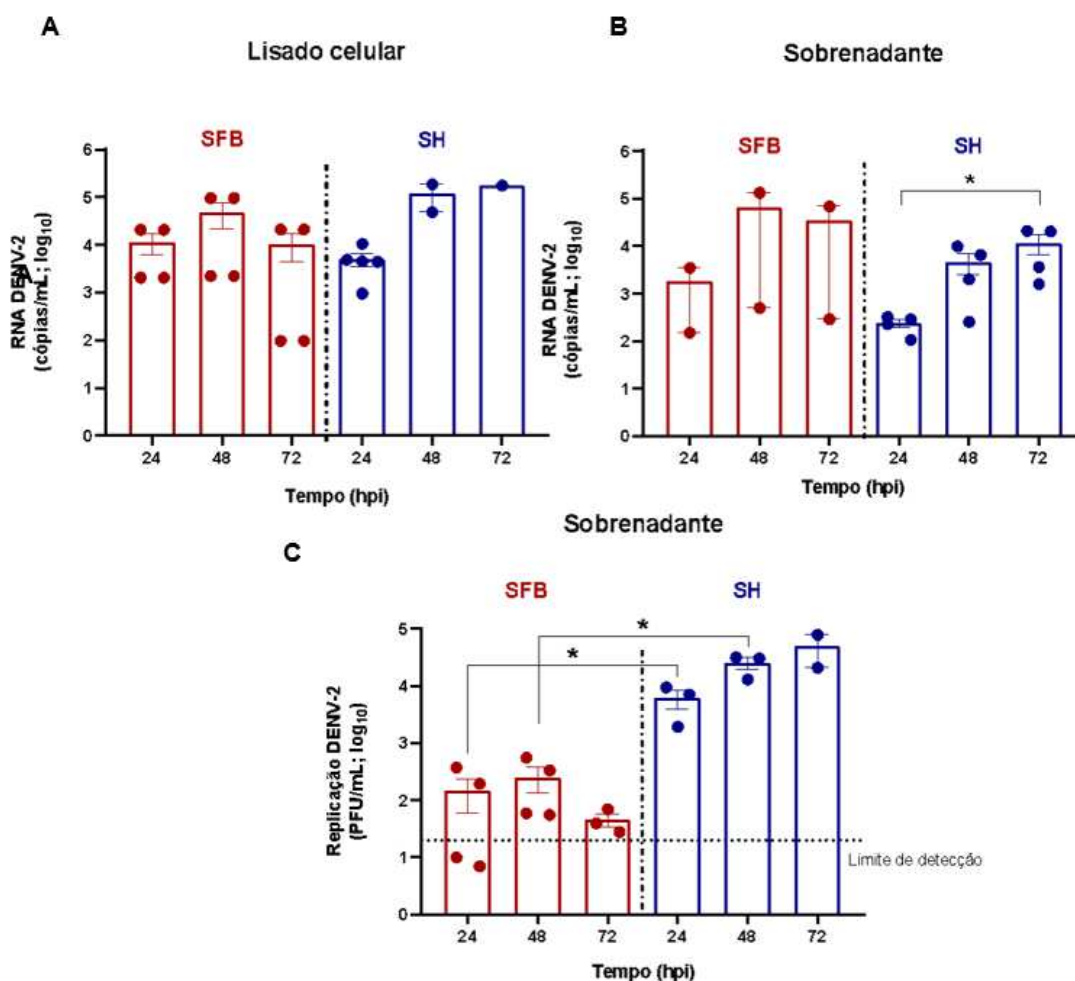
#### **4.8 Avaliação do perfil inflamatório a partir da secreção de citocinas na interação plaqueta-monócitos**

Quantificamos citocinas relacionadas ao perfil inflamatório e resposta imune antiviral nas plaquetas e monócitos infectados e nas coculturas tratadas ou não com inibidores dos receptores de dsRNA e seus controles. As citocinas avaliadas foram IL-8, MIF, IL-1 $\beta$ , MCP-1 e PF4 por kit de ELISA sanduíche segundo o protocolo do manual do fabricante (R&D systems). Foram dosadas as citocinas IL-1 $\beta$ , sem diluição da amostra e as amostras foram diluídas para a dosagem de MIF (2x), IL-8 (20x), PF4e MCP-1 (100 x).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Monócitos primários humanos mantidos em soro humano replicam o vírus da dengue e formam novas partículas virais infecciosas

Visto que os objetivos do nosso projeto visam avaliar a replicação do DENV em monócitos primários, e considerando que a literatura é divergente em relação a permissividade de monócitos a infecção pelo DENV e replicação produtiva do vírus na ausência de anticorpos amplificadores da infecção, especialmente se tratando de monócitos primários (DIAMOND *et al.*, 2000a; HSIEH *et al.*, 2020; HWANG *et al.*, 2022; TSAI *et al.*, 2014, 2017b), nós estabelecemos as melhores condições experimentais para nossas análises de replicação do DENV *in vitro* em monócitos isolados de sangue periférico humano. Para isso, nós inicialmente infectamos os monócitos com MOI de 1 do DENV-2 e os mantivemos em meio 199 suplementado com 10% de SFB ou 5% de SH. Após 24, 48 e 72 hpi, avaliamos a replicação do RNA viral por PCR em tempo real (RT-qPCR) na monocamada celular e no sobrenadante, e a produção de novas partículas virais infecciosas no sobrenadante por ensaio de placa (Figura 9). Dessa forma, nós observamos que na presença de SH a replicação do genoma viral aumenta de forma linear ao longo do tempo (Figura 9A). Com SFB esse aumento gradativo não é observado da mesma forma, pois há um ligeiro aumento da replicação do RNA viral até 48h, com declínio em 72h (Figura 9A). Esse mesmo padrão é observado quando o RNA viral é quantificado no sobrenadante dessas células (Figura 9B). Para investigar se a replicação do DENV em monócitos foi capaz de produzir novas partículas virais infecciosas, nós também realizamos ensaios de placa em células BHK-21 com os sobrenadantes dos monócitos infectados. Foi observado um título maior de vírus (entre 2 e 3 Log<sub>10</sub>) nos monócitos mantidos em SH quando comparados ao SFB, ainda seguindo o mesmo perfil linear de aumento da replicação viral ao longo do tempo (Figura 9C), indicando que há replicação produtiva em monócitos primários humanos quando os mesmos são cultivados com SH de forma mais eficiente do que com SFB.

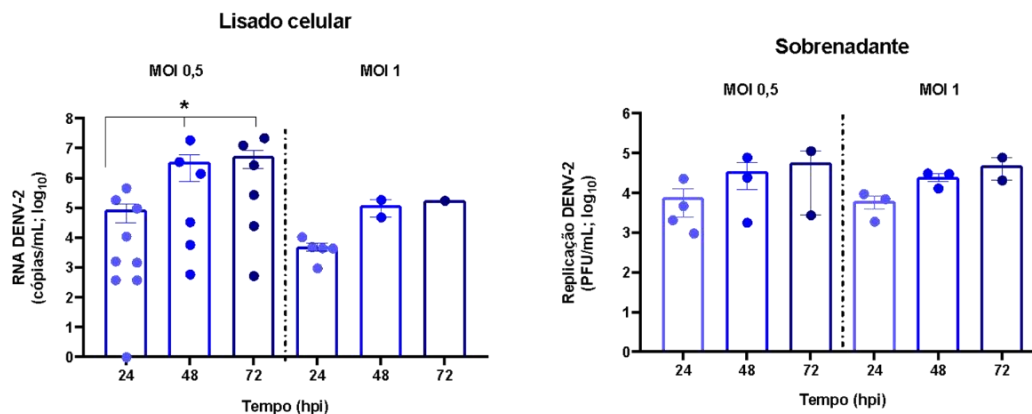


**Figura 9.** Replicação do DENV-2 em monócitos primários humanos cultivados em soro fetal bovino (SFB) ou soro humano (SH). Monócitos mantidos em 10% de SFB ou 5% de SH foram infectados com DENV-2 em MOI=1. (A-B) Quantificação do número de cópias de RNA viral (cópias/mL) no lisado da monocamada (A) ou no sobrenadante (B) dessas células nos tempos de 24, 48 e 72h. (C) Quantificação de novas partículas virais infecciosas no sobrenadante de monócitos infectados através de ensaio de formação de placas (PFU/mL) nos tempos de 24, 48 e 72h. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos com monócitos de doadores independentes. \* significa  $p < 0,05$  em relação ao tempo de 24h dentro do mesmo grupo. # significa  $p < 0,05$  entre SH e SFB no mesmo tempo pós infecção.

Ao observar que o cultivo de monócito com SH produzia maiores títulos virais em comparação ao SFB, infectamos os monócitos isolados e mantidos em SH com diferentes MOIs (0,5 e 1) de DENV-2 e quantificamos o RNA viral e a produção de partículas infecciosas por RT-PCR e ensaio de placa em 24, 48 ou 72 hpi (Figura 10). Com esses resultados fomos capazes de observar que não houve diferenças significativas nos níveis de RNA viral nos monócitos infectados com o MOI de 1 em comparação com o MOI de 0,5 (Figura 10A), assim como no título viral produzido



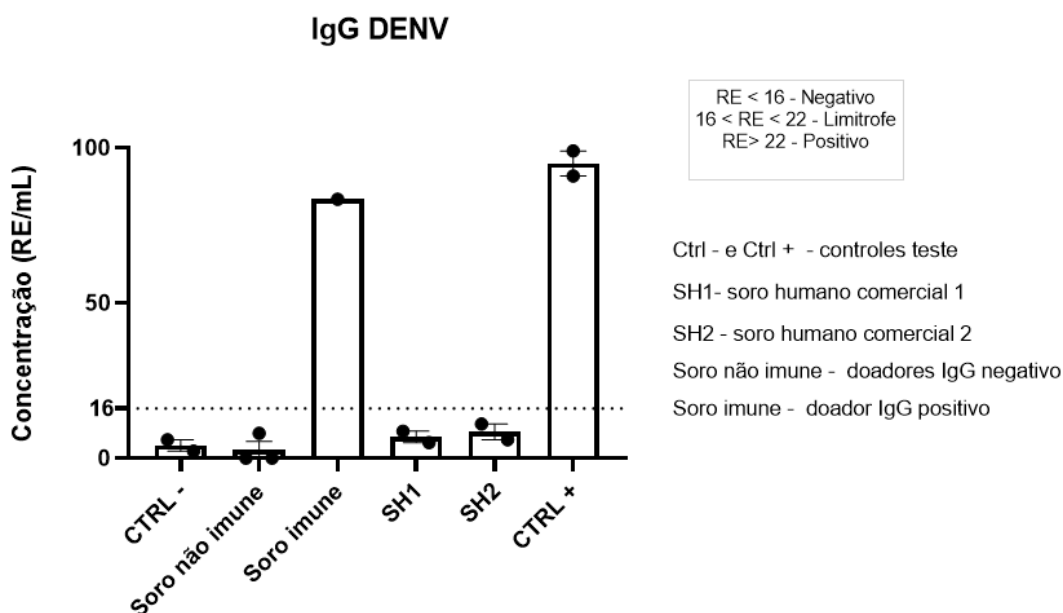
pelas células infectadas com os dois MOIs (Figura 10B). Portanto, adotamos o MOI 0,5 para os experimentos seguintes.



**Figura 10-** Comparação da infecção de monócitos com DENV em diferentes MOIs. Monócitos mantidos em 5% de soro humano (SH) foram infectados com DENV-2 utilizando diferentes MOIs (0,5; 1). **(A)** Quantificação do número de cópias de RNA viral por RT-PCR em tempo real e **(B)** Formação de novas partículas virais infecciosas quantificados por ensaio de formação de placas nos tempos de 24, 48 e 72h. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos com monócitos de doadores independentes. \* significa  $p < 0,05$  em relação ao tempo de 24h dentro do mesmo grupo.

## 5.2 Soro humano comercial utilizado para cultivar os monócitos primários não apresenta anticorpos IgG anti-DENV que facilitem a entrada do vírus

Visto que durante o estabelecimento da replicação viral em monócitos primários nós observamos um aumento de título de vírus produzido quando as células foram mantidas com SH em comparação com SFB, nós decidimos investigar se tal fenômeno envolve a presença de anticorpos anti-DENV no soro humano utilizado. Sabendo que a presença de anticorpos IgG anti-dengue sub-neutralizantes gerados a partir de uma infecção anterior por um dos sorotipos de DENV pode causar o fenômeno da amplificação dependente de anticorpos (ADE), nós dosamos IgG anti-dengue no soro humano comercial utilizado na cultura de monócitos. Nosso resultado preliminar indica que não há IgG DENV nos lotes de soro humano testados e que foram utilizados durante os experimentos (Figura 11).



S

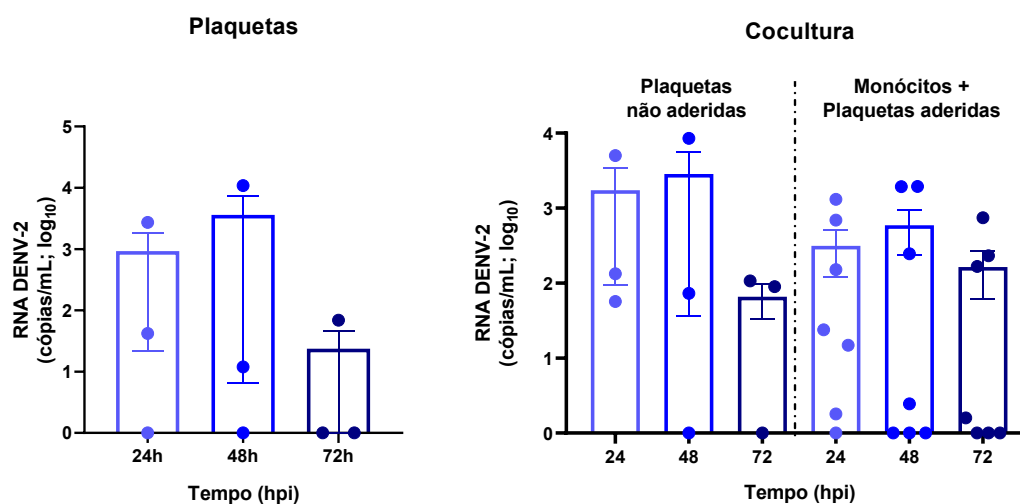
**Figura 11.** Quantificação de anticorpos IgG anti-DENV. Análise por ELISA dos soros humanos comerciais utilizados na cultura de monócitos primários humanos para quantificação de anticorpos IgG anti-DENV. Soro de voluntários saudáveis imunes ou não imunes foram testados como controles positivos e negativos.

### 5.3 Plaquetas infectadas com DENV *in vitro* são capazes de entregar o material genético viral recém-sintetizado aos monócitos

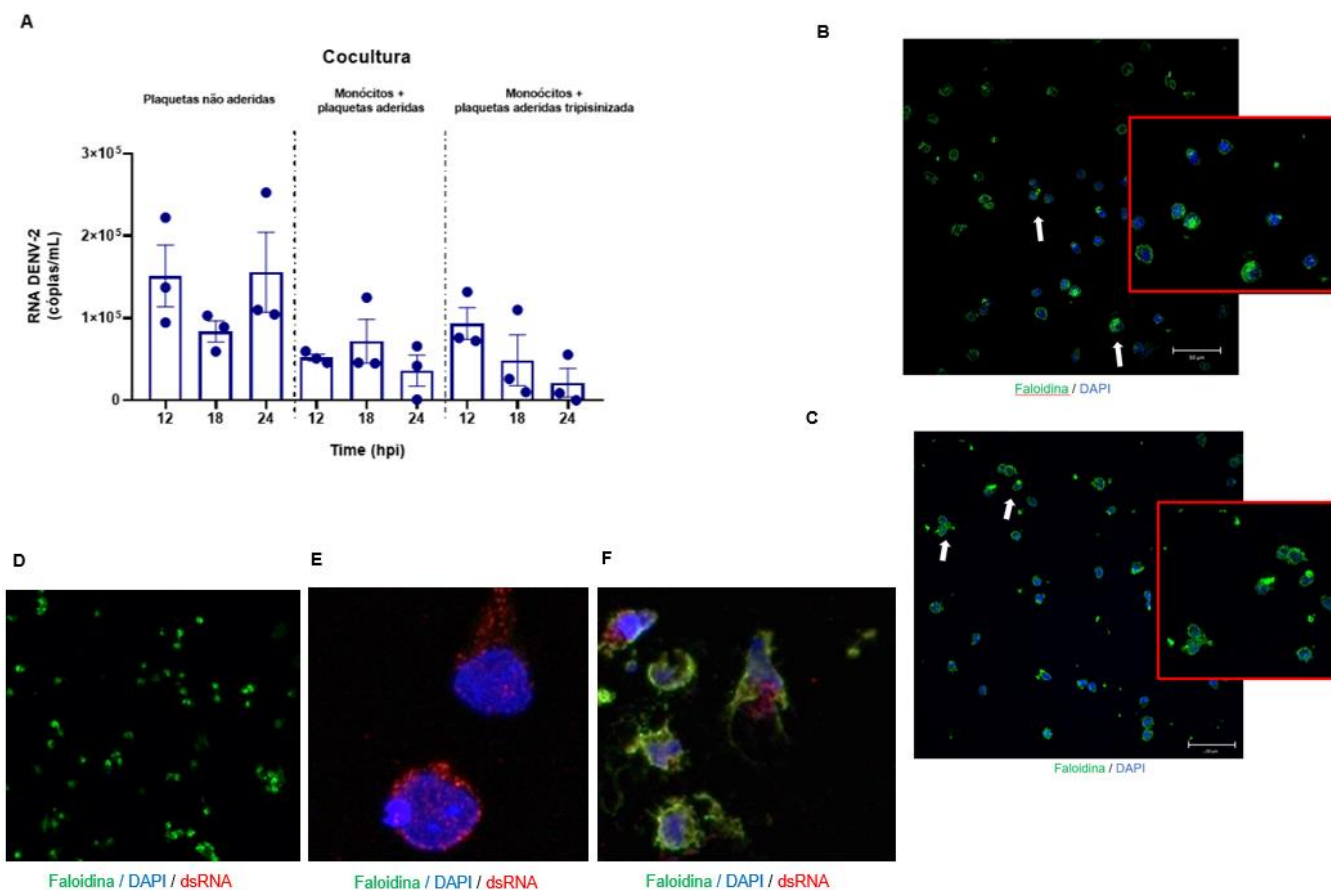
Estudos anteriores já demonstraram que monócitos, macrófagos ou linhagens celulares monocíticas humanas são capazes de replicar o DENV e sustentar uma replicação produtiva *in vitro* (HWANG *et al.*, 2022; OJHA *et al.*, 2019; TSAI *et al.*, 2017). Recentemente, nosso grupo e outros demonstraram que plaquetas também são capazes de reconhecer, internalizar e replicar o genoma do vírus da dengue (KAR *et al.*, 2017a; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015a). No entanto, essa replicação é abortiva visto que não são geradas novas partículas virais infecciosas (QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020; KAR *et al.*, 2017a). Dessa forma, nós investigamos se plaquetas infectadas com DENV-2 *in vitro* eram capazes de transferir o RNA viral para os monócitos primários em um modelo de cocultura estabelecido pelo nosso grupo (Figura 8).

Conforme já foi descrito anteriormente por nosso grupo, os níveis de RNA viral em plaquetas infectadas com o DENV aumentam gradativamente até 24h (QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020). Nós agora observamos resultados semelhantes, com detecção do RNA viral até 48 hpi. Após 72h, no entanto, há um decaimento no número de cópias do RNA viral (Figura 12A), indicando que as plaquetas não sustentam a replicação do genoma viral por muito tempo. Esse mesmo padrão de replicação, assim como os níveis de RNA viral, foi observado em plaquetas não aderidas presentes no sobrenadante da cocultura com monócitos (Figura 12B) – recolhido da cocultura e centrifugado para obter o pellet de plaquetas conforme descrito na Figura 8. Ao quantificarmos o RNA viral no lisado da monocamada de monócitos com plaquetas aderidas (monócitos + plaquetas aderidas) após cocultura com as plaquetas infectadas, apesar de observarmos o mesmo padrão de replicação do RNA ao longo do tempo, encontramos aproximadamente entre 5 e 50 vezes menos cópias de RNA viral quando comparado com o encontrado nas plaquetas infectadas sozinhas (Plaquetas) (Figura 12B). Esses dados sugerem que não há transferência de material genético viral entre plaquetas e monócitos em cocultura, pois caso houvesse transferência, esperaríamos encontrar maiores níveis de RNA viral nos monócitos + plaquetas aderidas em comparação com as plaquetas sozinhas e plaquetas não aderidas, e um aumento linear na replicação ao longo do tempo visto que os monócitos são permissivos ao DENV (conforme observado nas Figuras 9A e 10A).

Para verificar se o RNA viral quantificado no lisado de monócitos + plaquetas aderidas estava presente apenas nas plaquetas ou se houve transferência do genoma viral para os monócitos, que nessas condições não foram capazes de replicá-lo, nós adicionamos tripsina-EDTA (0,025%) por 1 minuto na monocamada de células para soltar as plaquetas aderidas aos monócitos. Nós testamos essa abordagem em tempos anteriores a 24h de interação plaqueta-monócito para validar se a tripsinização levaria a redução do RNA viral na monocamada de monócitos, caso a retirada de plaquetas por tripsinização tivesse sido eficiente. Nós testamos então tempos de 12h, 18h e 24h, no entanto, a tripsinização não levou a redução significativa do RNA viral (Figura 13A).



**Figura 12.** Plaquetas infectadas com DENV-2 não entregam o material genético do vírus aos monócitos em um modelo de cocultura plaqueta-monócito de forma que esses deem continuidade a replicação viral. Plaquetas infectadas com DENV-2 *in vitro* foram mantidas em cocultura com monócitos primários isolados dos mesmos voluntários saudáveis por 24, 48 e 72h. **(A)** Quantificação por RT-PCR do número de cópias de RNA viral no lisado celular de plaquetas infectadas e mantidas sozinhas em cultura em suspensão. **(B)** Número de cópias de RNA viral no lisado de plaquetas não aderidas que estavam em cocultura com a monocamada de monócitos e do lisado da monocamada de monócitos com plaquetas que permaneceram aderidas a eles após cocultura. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos com células de doadores independentes. # significa  $p < 0,05$  em relação ao mesmo tempo sem tripsina.



**Figura 13.** Tripsinização da cocultura plaquetas-monócitos e avaliação da presença de dsRNA nessas células em cocultura. Plaquetas infectadas com DENV-2 *in vitro* foram mantidas em cocultura com monócitos primários isolados dos mesmos voluntários saudáveis por 12, 18 e 24h. **(A)** Quantificação de cópias de RNA viral por RT-qPCR no lisado celular de coculturas tripsinizadas ou não às 12, 18 e 24h pós-infecção. Nesses tempos, a tripsinização não levou a uma redução significativa na quantificação do RNA viral. No entanto, os níveis de RNA viral na monocamada são reduzidos em comparação com as plaquetas infectadas contidas no sobrenadante das coculturas. **(B-C)** Imagens representativas da interação plaquetas-monócitos antes **(B)** e depois da tripsinização **(C)** no tempo de 24h pós-infecção. Plaquetas infectadas com DENV-2 *in vitro* foram mantidas isoladas ou em cocultura com monócitos primários por 24h. Monócitos infectados com DENV-2 foram utilizados como controle. As células foram coradas para dsRNA intracelular (vermelho), faloidina (verde) e núcleo (DAPI, azul) **(D)** Plaquetas, **(E)** Monócitos, **(F)** Cocultura.

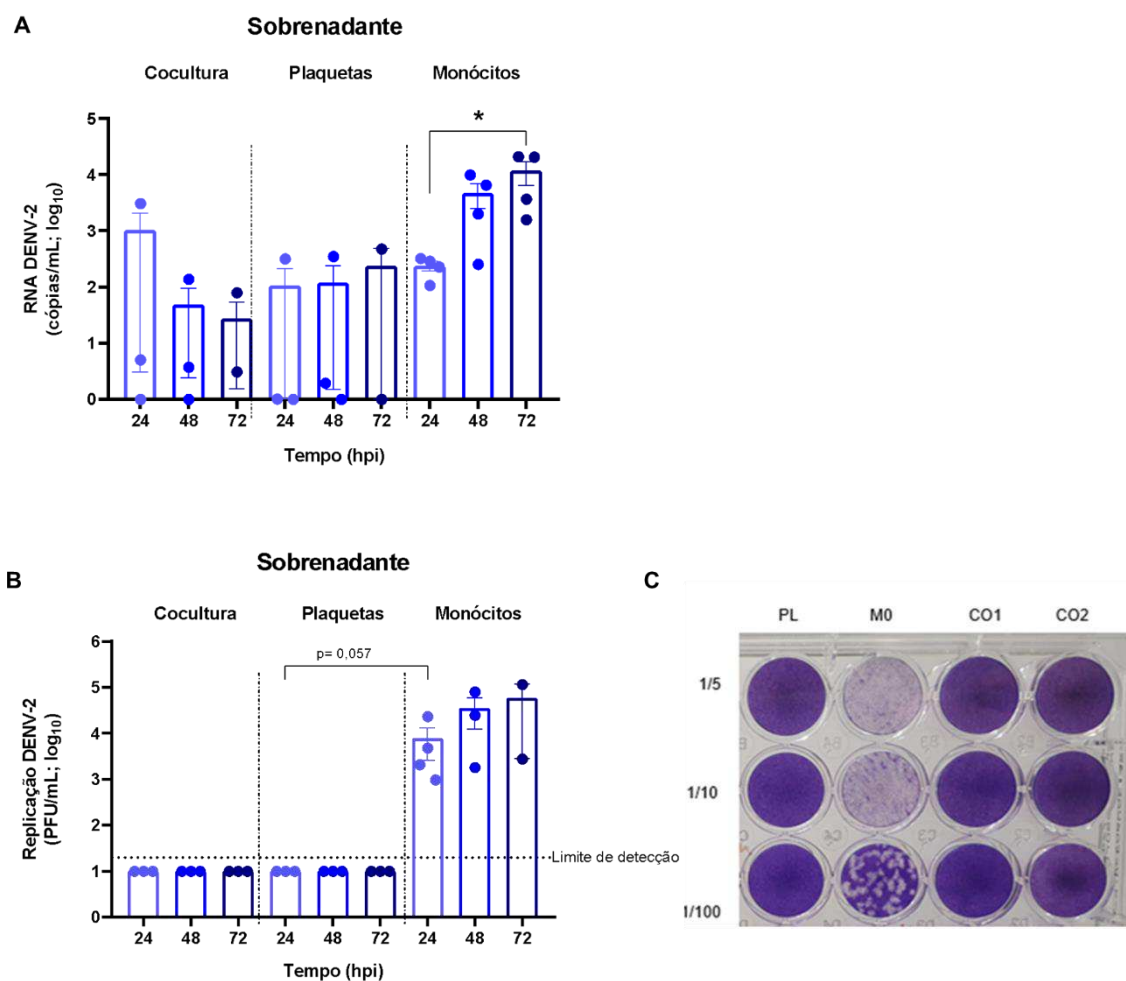
Adicionalmente, nós realizamos uma microscopia confocal de fluorescência com marcação do núcleo dos monócitos (DAPI) e do citoesqueleto (faloidina) de ambas as células (monócitos e plaquetas) para visualizar os agregados plaquetas-monócitos com e sem tripsinização. Nesse ensaio, nós observamos que de fato não há redução significativa da interação plaqueta-monócito, indicando que o RNA viral

detectado na monocamada de monócitos pode estar tanto nas plaquetas infectadas e aderidas aos monócitos, ou no próprio monócito (Figura 14B e C).

Para investigar se há transferência do RNA viral do DENV de plaquetas infectadas para monócitos, nós realizamos os experimentos de cocultura com em placas contendo lamínulas para aderir os monócitos e marcamos fita dupla de RNA (anticorpos J2- vermelho), um marcador de replicação viral ativa. Como esperado, os monócitos infectados diretamente com DENV-2 e utilizados como controle positivo apresentam replicação do RNA viral (Figura 13E). No entanto, não foi possível observar essa replicação do genoma viral em plaquetas sozinhas infectadas (Figura 13D). De forma interessante, nós observamos fita dupla de RNA no citoplasma de monócitos após a cocultura com plaquetas infectadas, o que sugere que há transferência do RNA viral das plaquetas para os monócitos (Figura 13F).

#### **5.4 Monócitos primários humanos em cocultura com plaquetas infectadas com DENV não são capazes de dar continuidade ao ciclo de replicação viral após transferência de RNA viral**

Para investigar a liberação de partículas virais para o meio extracelular, nós quantificamos o RNA viral por RT-qPCR (Figura 14A) e a produção de partículas infectantes através de ensaios de placa (Figura 14B e C) no sobrenadante das coculturas. Observamos a ausência de partículas infecciosas no sobrenadante da cocultura plaqueta-monócito ou de plaquetas infectadas sozinhas (Plaquetas), já que não foram observadas placas em células BHK-21 (Figura 14B e C). Esses dados confirmam que plaquetas infectadas apresentam replicação abortiva. Além disso, as plaquetas não transferem o genoma do DENV de maneira que os monócitos concluem o ciclo de replicação produtiva. Monócitos sozinhos infectados com o DENV, utilizados como controle positivo de replicação viral neste ensaio, mostraram uma infecção produtiva com aumento das partículas virais infecciosas ao longo do tempo de 24, 48, 72h (Figura 14). Em conjunto, estes resultados demonstram que plaquetas infectadas com DENV não são capazes de transferir o RNA viral para os monócitos durante um modelo de interação plaqueta-monócito de maneira eficiente e, portanto, não há formação de novas partículas virais infecciosas.



**Figura 14.** Plaquetas infectadas com DENV-2 transferem o RNA viral para monócitos em um modelo de cocultura, levando a uma replicação viral abortiva. **(A)** Quantificação do RNA viral no sobrenadante nos diferentes grupos (cocultura (CO), plaquetas (PL) e monócitos (M0)) **(B)** Quantificação da replicação viral por ensaio de formação de placas a partir dos sobrenadantes dos diferentes grupos **(C)** Imagem representativa dos ensaios de formação de placas realizadas em células BHK-21 a partir do sobrenadante de células infectadas de um doador. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos com células de doadores independentes. \* significa  $p < 0,05$  em relação ao tempo de 24h dentro do mesmo grupo.

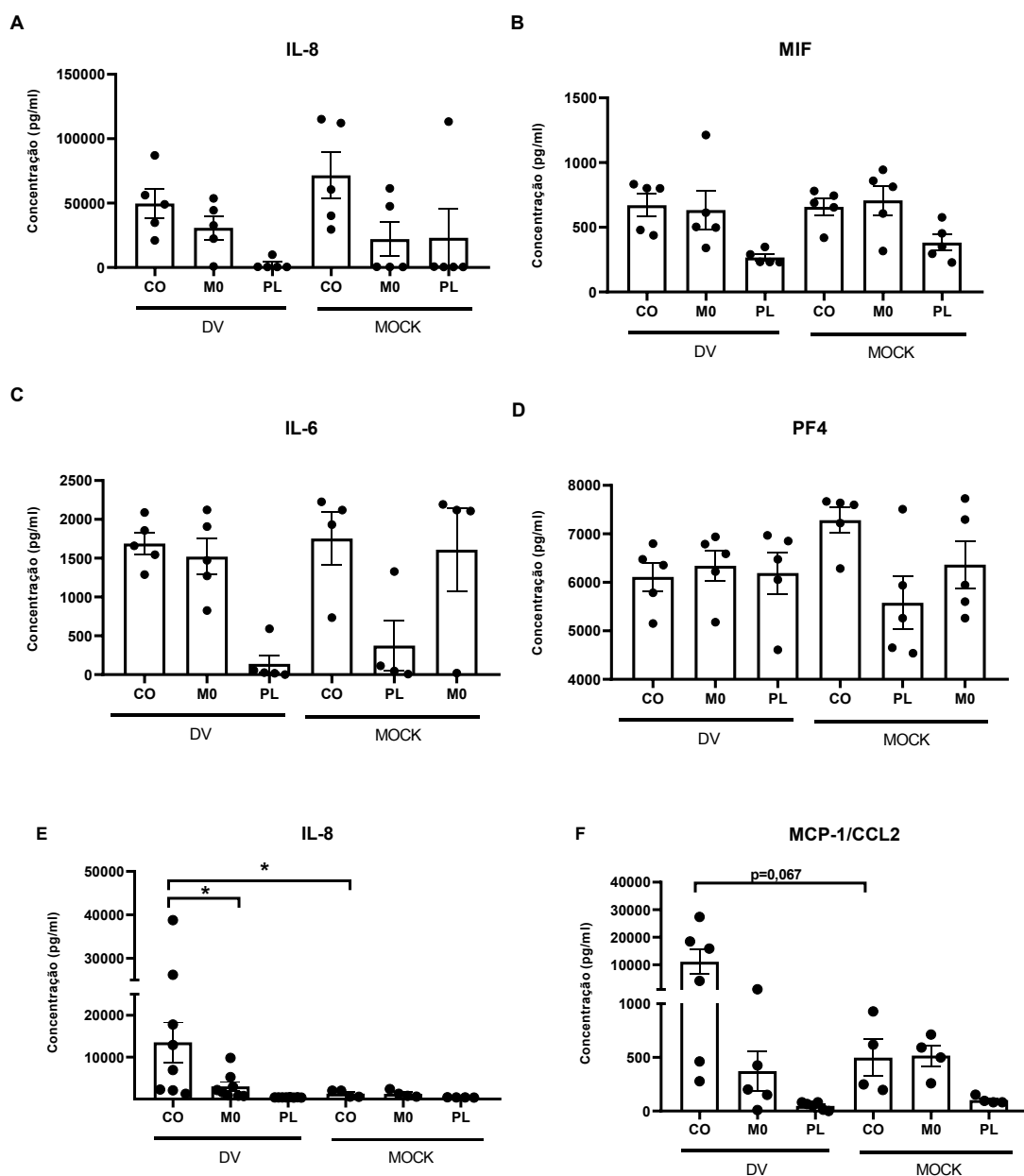
## 5.5 Interação plaqueta-monócito induz aumento da secreção de citocinas inflamatórias

Visto que na literatura foi observada uma modulação da resposta inflamatória em modelos de cocultura plaqueta-monócito, havendo diferenças entre plaqueta infectada com DENV ou não e interagindo com monócitos não infectados (BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020; HOTTZ *et al.*, 2020; OJHA *et al.*, 2019), nós avaliamos se isso também estava ocorrendo no nosso modelo. Para isso então nós quantificamos a secreção de citocinas inflamatórias como IL-8, MIF, IL-6 e PF4 no sobrenadante das coculturas infectadas (DENV) e controle (MOCK) (Figura 15). No entanto, não foi possível observar diferenças significativas entre as coculturas DENV e MOCK, assim como entre as coculturas e os monócitos sozinhos (Figura 15).

Adicionalmente, nós testamos a infecção das plaquetas e monócitos com MOI=1 para avaliar se nesse caso haveria modulação na secreção de citocinas inflamatórias, como já descrito anteriormente por nosso grupo (BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020). Observou-se então um aumento significativo na secreção de IL-8 no grupo de cocultura infectada quando comparadas com cocultura controle (Figura 15 E) é uma tendência de aumento para MCP-1 (Figura 15 F).

Esses resultados demonstram que a infecção das plaquetas com MOI=0,5 não foi suficiente para induzir diferenças na resposta inflamatória nesse modelo de cocultura plaqueta-monócito. No entanto, é possível observar modulação da resposta inflamatória nas coculturas com plaquetas infectadas com MOI=1. Além disso, os monócitos isolados por adesão apresentam uma quantidade considerável de plaquetas aderidas em sua superfície, levando também a indução da secreção de diversas citocinas inflamatórias, o que justifica não observamos diferenças significativas entre monócitos infectados e não infectados (Figura 15). A quantificação de PF4, uma quimiocina exclusiva de plaquetas e megacariócitos, em monócitos isolados por adesão, reforça ainda mais essa constatação (Figura 15 D).



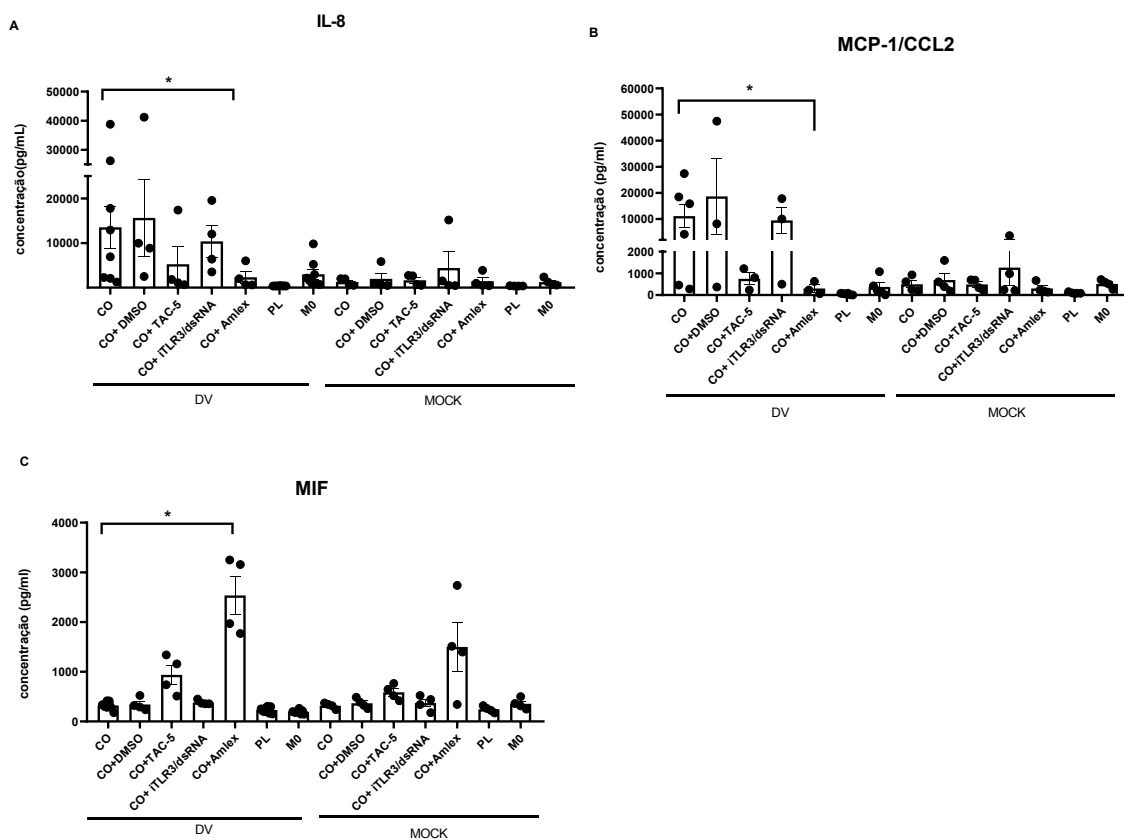


**Figura 15.** Plaquetas infectadas apenas com DENV MOI=1 foram capazes de induzir diferenças significativas na secreção de citocinas inflamatórias em cocultura com monócitos. Quantificação da secreção de IL-8 (A), MIF (B), IL-6 (C) e PF4 (D) em cocultura utilizando MOI=0,5. Quantificação da secreção de IL-8 (E), MCP-1 (F), em cocultura utilizando MOI=1. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos com células de doadores independentes.

## **5.6 Modulação da secreção de citocinas inflamatórias IL-8, MCP-1 e MIF através do reconhecimento de dsRNA por receptores da imunidade inata**

Visto que foi observado a transferência do RNA viral das plaquetas para os monócitos e modulação da resposta inflamatória quando plaquetas foram infectadas com MOI=1 e colocadas em cocultura com monócitos, nós avaliamos a regulação da secreção de mediadores inflamatórios a partir do reconhecimento de dsRNA por receptores endossomais como TLR3/7/9 e sensores citosólicos como RIG-I/MDA5. Para isso, nós tratamos monócitos primários antes de adicionarmos plaquetas à cocultura com um inibidor específico do complexo TLR3/dsRNA (iTLR3/dsRNA), um antagonista de TLRs endossomais (TAC-5) e inibidor de TBK1/IKK $\epsilon$ , que faz parte da via de sinalização downstream de RIG-I/MDA-5 e de TLR3 (Amlexanox). Nós então observamos que houve diferença significativa de redução da secreção de IL-8 e MCP-1 quando inibimos TBK1/IKK $\epsilon$ . Adicionalmente, houve uma tendência de redução da secreção dessas citocinas ao inibir TLRs endossomais, mas não ao utilizar o inibidor específico do complexo TLR3/dsRNA (Figura 15A e B).

Esses resultados sugerem que o TLR3 não apresenta um papel crucial no reconhecimento e modulação da resposta inflamatória durante a transferência do RNA viral do DENV da plaqueta infectada para o monócito, mas que não se pode excluir a participação de outros TLRs endossomais como 7/8/9. Ademais, esse dado demonstra que há a participação de RIG-I/MDA-5 visto que o Amlexanox atua nas vias downstream desse sensor citoplasmático. De forma interessante, também se observou que houve aumento da secreção de MIF após a inibição da via de TBK1/IKK $\epsilon$  (Amlexanox) nas coculturas (Figura 15C), mais uma vez demonstrando que vias associadas a RIG-I/MDA-5 participam da modulação da resposta inflamatória nesse modelo de interação plaqueta infectada-monócito. Essa modulação da resposta inflamatória a partir do reconhecimento em monócitos do RNA viral produzido por plaquetas pode ter um papel importante na patogênese da dengue.



**Figura 16.** Monócitos primários humanos em cocultura com plaquetas infectadas com DENV induzem resposta inflamatória através do reconhecimento do RNA viral. Quantificação da secreção de IL-8 **(A)**, MCP-1 **(B)**, MIF **(C)**. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos com células de doadores independentes. \* significa  $p < 0,05$  em relação a cocultura infectada.

## 6 DISCUSSÃO

O vírus da dengue pertence ao gênero dos flavivírus e possui 4 sorotipos distintos (DENV1-4) (WILDER-SMITH *et al.*, 2019). Seu material genético é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, a qual é traduzida em uma poliproteína, posteriormente clivada em proteínas estruturais e não estruturais (YAP *et al.*, 2017). O DENV é capaz de infectar uma ampla variedade de células humanas, dentre elas células sanguíneas como monócitos, macrófagos (DIAMOND *et al.*, 2000b; HSIEH *et al.*, 2020; TSAI *et al.*, 2014, 2017b) e plaquetas (CHAO *et al.*, 2019b; KAR *et al.*, 2017a; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020), sendo os monócitos considerados os principais disseminadores da infecção já que representam a maioria das células infectadas na corrente sanguínea (WONG *et al.*, 2012a). Ademais, os monócitos também possuem um papel importante na resposta imune contra a infecção (ANDRÉS *et al.*, 2019; BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020b; WONG *et al.*, 2012a).

A infecção pelo vírus da dengue está relacionada não só a susceptibilidade do tipo celular, mas também ao sorotipo e a cepa do DENV, e a presença de anticorpos específicos contra o vírus (fenômeno conhecido como ADE) (DIAMOND *et al.*, 2000a). TSAI *et al.* (2014, 2017) já demonstraram que a infecção de monócitos pelo DENV induz aumento da expressão de HSF-1 e produção de IL-10, o que facilita a replicação do vírus nessas células devido a redução da produção de interferon. Além disso, a senescência dos monócitos, seguida de uma maior produção de IL-10, aumenta a entrada e replicação do RNA viral do DENV por essas células (HSIEH *et al.*, 2020). Outro estudo ainda demonstrou que monócitos atuam como reservatórios do vírus, podendo transportá-los pela corrente sanguínea e levá-los até outros tecidos, contribuindo assim para a amplificação da infecção e patogênese da doença (HWANG *et al.*, 2022). Nesse mesmo estudo, macrófagos modulados para um perfil M2 apresentam maior susceptibilidade à entrada e replicação de DENV-1 do que células THP-1 (linhagem celular monocítica) (HWANG *et al.*, 2022). Muito embora nosso grupo e outros já tenham demonstrado que a interação com as plaquetas modula a produção de alguns desses mediadores facilitadores da infecção viral, como a IL-10 (HOTTZ *et al.*, 2014b) o papel das plaquetas em modular a permissividade dos monócitos ao DENV a partir deste mecanismo ainda não foi investigado.

Independente da interação com as plaquetas, diferentes condições de isolamento e cultivo dos monócitos, por si só, têm o potencial de influenciar a

permissividade ao DENV. A literatura é divergente quanto a produtividade da infecção de monócitos primários em relação a linhagens monocíticas como THP-1 e U937 *in vitro* (DIAMOND *et al.*, 2000a; HWANG *et al.*, 2022; OJHA *et al.*, 2019; TSAI *et al.*, 2017b). Esta divergência existe especialmente no que diz respeito ao título de vírus produzido, podendo não ser detectado, principalmente quando não há presença de anticorpos subneutralizantes anti-dengue (DIAMOND *et al.*, 2000a), ou variando entre  $10^1$  a  $10^4$  em PFU ou FFU por mL, quando são detectadas partículas virais infecciosas (DIAMOND *et al.*, 2000a; HWANG *et al.*, 2022; KOU *et al.*, 2011; OJHA *et al.*, 2019; TSAI *et al.*, 2014, 2017b). Além disso, também há variação nos MOIs de infecção utilizados (entre 1 e 10), além de diferentes protocolos para a avaliação da produção de partículas virais infecciosas, no qual a grande maioria varia de testes de ensaios de formação de placas em células BHK-21 (DIAMOND *et al.*, 2000a; TSAI *et al.*, 2014, 2017b) e ensaio imuno-histoquímica de formação de foco (FFU ou FFA) em células Vero E6 (HWANG *et al.*, 2022; KOU *et al.*, 2011; OJHA *et al.*, 2019). Majoritariamente nesses trabalhos, os monócitos derivados de PBMCs e as linhagens de THP-1 ou U937 são mantidos em cultura com meio RPMI ou DMEM e suplementados com 10% de SFB, e poucos utilizam SH para manter essas células antes e depois de infectá-las com DENV. Um aumento da replicação viral já foi descrito em um modelo *in vitro* de infecção com HIV em diferentes tipos celulares quando as células foram infectadas e mantidas em meio contendo concentrações crescentes de SH em comparação com soro de outros animais, inclusive SFB (PERDOMO *et al.*, 2012). Com isso, e no intuito de manter os monócitos em condições mais próximas à fisiologia do hospedeiro humano, nós inicialmente estabelecemos um protocolo para infecção dos monócitos com DENV *in vitro* e posterior titulação da produção viral por ensaio de formação de placa. Nós observamos que houve um aumento no número de cópias de RNA viral e do título de vírus produzidos a partir da infecção de monócitos primários cultivados em 5% de SH, quando comparados com os monócitos mantidos em 10% SFB.

Nós então hipotetizamos que essa diferença na susceptibilidade a infecção e replicação viral poderia estar ocorrendo devido a uma mudança no perfil inflamatório do monócito diante dos diferentes estímulos presentes no SH ou SFB, ou devido ao fenômeno conhecido como amplificação dependente de anticorpos (ADE – do inglês *Antibody-Dependent Enhancement*) (KOU *et al.*, 2011; KUCZERA *et al.*, 2018). Realizamos então uma análise da presença de anticorpos IgG anti-dengue no SH comercial utilizado para a cultura das células e nossos resultados indicam que o

aumento na replicação viral não ocorre devido ao fenômeno de ADE. Como próximos passos, iremos avaliar a modulação imunometabólica desses monócitos induzida pela suplementação com os diferentes soros.

O estabelecimento e caracterização da infecção de monócitos primários *in vitro* foi uma etapa importante para garantir um modelo capaz de avaliar se plaquetas infectadas com DENV-2 seriam capazes de transferir o genoma viral para monócitos que dessem continuidade ao ciclo de replicação viral. Nos experimentos subsequentes, nós adotamos essas condições (soro humano e MOI = 0,5) como ideais para os ensaios de interação plaqueta-monócito, e a infecção dos monócitos diretamente com o DENV como controle positivo para os experimentos de cocultura com plaquetas infectadas.

Estudos recentes do nosso grupo e de outros já demonstraram que plaquetas são capazes de internalizar e replicar o genoma viral do DENV levando a uma replicação abortiva (KAR *et al.*, 2017a; QUIRINO-TEIXEIRA *et al.*, 2020; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015). Além disso, plaquetas encontram-se ativadas e apoptóticas durante a dengue, com aumento significativo dos agregados plaqueta-monócito circulantes e da fagocitose de plaquetas mediada pelo reconhecimento da fosfatidilserina em plaquetas apoptóticas (HOTTZ *et al.*, 2014b). Um fenômeno semelhante foi descrito em infecções secundárias por DENV, levando a uma acelerada depuração de plaquetas infectadas por macrófagos através do reconhecimento de fosfatidilserina e fagocitose (ALONZO *et al.*, 2012). Em outras infecções virais, como por exemplo no HIV e HCV, plaquetas atuam como reservatórios de vírus que permanecem competentes para replicação (ARIEDE *et al.*, 2015; REAL *et al.*, 2020). No caso do HIV, plaquetas mostraram-se capazes de transferir o vírus para macrófagos e produzir novas partículas virais *in vitro* (REAL *et al.*, 2020). A partir disso, nós hipotetizamos que durante essas interações, plaquetas infectadas com DENV seriam capazes de entregar o RNA viral para os monócitos para que estes dessem continuidade ao ciclo de replicação do vírus, contribuindo para a disseminação viral e patogênese da dengue. Nossos resultados demonstram que no modelo *in vitro* de cocultura de plaquetas infectadas com DENV-2 e monócitos não infectados, há transferência do genoma viral para essas células, mas que não há aumento da quantidade de cópias de RNA viral no lisado de células e no sobrenadante da cocultura quando comparados com plaquetas sozinhas infectadas. A pequena quantidade de RNA viral detectado no lisado de monócitos + plaquetas aderidas da

cocultura se deve principalmente a presença de plaquetas infectadas que permanecem aderidas na superfície do monócito, mas foi possível observar presença de dsRNA em monócitos da cocultura com plaquetas infectadas, indicando a transferência do RNA viral.

A tripsina-EDTA é uma protease que atua catalisando a hidrólise de ligações peptídicas, o que leva a quebra dessas ligações em proteínas de adesão na membrana das células (LEE *et al.*, 2021). A solução de tripsina-EDTA a 0,25% é comumente utilizada em culturas para soltar as células aderidas em garrafas ou placas de plástico, desfazendo também o contato célula-célula (LAI *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2021) e em estudos anteriores foi utilizada em suspensão de células infectadas com DENV para remover vírus ligados a superfície dos monócitos (HWANG *et al.*, 2022). Nós então utilizamos tripsina mais diluída (0,025%) na monocamada de monócitos + plaquetas aderidas da cocultura em uma tentativa de soltar apenas as plaquetas aderidas aos monócitos sem desprender a monocamada de células da placa. No entanto, observamos que essa abordagem não foi suficiente para eliminar as plaquetas aderidas aos monócitos e para reduzir o RNA viral da monocamada de células. Além disso, não houve produção de novas partículas virais infecciosas no sobrenadante da cocultura. Esses dados, em conjunto com a marcação para dsRNA em monócitos da cocultura com plaquetas infectadas demonstram que de fato ocorreu transferência do RNA viral, o que ainda foi confirmado ao utilizar um inibidor da via de RIG-I/MDA-5 que reconhece dsRNA no citoplasma de células infectadas que levou a redução da secreção de citocinas inflamatórias.

Sabe-se que a ativação e apoptose plaquetária na dengue leva a modulação de vias imunometabólicas com indução da biogênese de corpúsculos lipídicos nos monócitos (BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020b), que são organelas indispensáveis para a replicação viral em células infectadas com DENV (BARBOSA- *et al.*, 2009). Além disso, a interação plaqueta-monócito leva a indução da secreção de mediadores inflamatórios (BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020b; DIB *et al.*, 2020; HOTTZ *et al.*, 2014b; OJHA *et al.*, 2019). Adicionalmente, o fator plaquetário 4 (PF4), uma quimiocina produzida exclusivamente por plaquetas e megacariócitos, inibe a ativação de vias de STAT2-IFN $\alpha$ , reduz a secreção de IFN- $\alpha$  por monócitos e aumenta a replicação do DENV nessas células (OJHA *et al.*, 2019). Nós então resolvemos dosar a secreção de citocinas inflamatórias no sobrenadante das coculturas para ver se reproduziam os resultados de outros estudos. Entretanto, no nosso modelo de interação plaqueta-

monócito não foi possível observar a modulação da resposta inflamatória comparando cocultura com monócitos sozinhos. Isso pode estar ocorrendo pois, nos demais estudos, houve seleção positiva de monócitos CD14+ por beads magnéticas, reduzindo ou eliminando totalmente as plaquetas da cultura dessas células (BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020; OJHA *et al.*, 2019). Já no nosso modelo, a seleção de monócitos por adesão a placas de plástico não foi capaz de eliminar as plaquetas aderidas aos monócitos já induzindo assim uma secreção basal alta de citocinas inflamatórias. Além disso, também não foi possível observar diferenças significativas entre cocultura infectada e não infectada, sugerindo que a infecção com MOI=0,5, apesar de levar a replicação do RNA viral e formação de novas partículas virais infecciosas em monócitos, não é suficiente para induzir diferenças significativas na secreção de citocinas inflamatórias nesse modelo. Ao infectar as plaquetas com MOI=1, observamos um aumento da secreção de IL-8 e MCP-1 nos monócitos. De forma semelhante, no trabalho de TSAI *et al.*(2009) onde células de linhagem monocíticas foram infectadas com DENV, só houve diferenças significativas na secreção de IL-8 e IL-6 quando foi utilizado um MOI=15. Outro estudo demonstrou que plaquetas infectadas com DENV MOI=1 induziu aumento da secreção de IL-8, IL-6 e MCP-1 em cocultura com monócitos após 18h (BARBOSA-LIMA *et al.*, 2020).

Como observamos a transferência de RNA viral da plaqueta para os monócitos nós hipotetizamos que haveria modulação da secreção de citocinas inflamatórias através do reconhecimento do RNA viral por monócitos. Nós então utilizamos inibidores de TLRs endossomais que reconhecem fita dupla de RNA viral e inibidor de TBK1/IKK $\epsilon$  que também está na via de reconhecimento de dsRNA downstream de RIG-I/MDA5 e TLR3. Observou-se então o aumento da secreção de citocinas como IL-8 e MCP-1 nas coculturas infectadas e uma redução quando as células foram tratadas com Amlexanox. Esperava-se que a ativação de monócitos por DENV ocorresse também através da ligação aos TLRs endossomais nesse modelo, visto que já foi demonstrado em células THP-1 e U937 que há aumento da secreção de citocinas inflamatórias e associadas a respostas antivirais durante a infecção por DENV por TLR3 e que o DENV colocaliza com TLRs 3/7/8 (TSAI *et al.*, 2009). No entanto, como isso não ocorreu e o Amlexanox foi eficiente em reduzir a secreção de IL-8 e MCP-1 nas coculturas plaqueta-monócito infectadas com DENV sugere-se que há participação da via de RIG-I/MDA5 que é um importante sensor citosólico de dsRNA.



## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados gerados no presente trabalho pode-se concluir que em nosso modelo de interação plaqueta-monócito, plaquetas infectadas com DENV não são capazes de transferir o genoma viral para os monócitos de maneira que esses deem continuidade ao ciclo de replicação. No entanto, a transferência de RNA viral para os monócitos leva ao aumento da secreção de citocinas inflamatórias como IL-8 e MCP-1 através da ativação de vias associadas a RIG-I/MDA-5. Esses resultados sugerem que plaquetas infectadas com DENV têm um papel importante na patogênese da dengue pela indução de um perfil mais inflamatório em monócitos apesar de não contribuírem para a propagação viral.

## 8 REFERÊNCIAS

ACOSTA, E. G.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R. **Revisiting dengue virus-host cell interaction: New insights into molecular and cellular virology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 88

AGUILAR-BRISEÑO, J. A. *et al.* TLR2 on blood monocytes senses dengue virus infection and its expression correlates with disease pathogenesis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

ALONZO, M. T. G. *et al.* Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 8, p. 1321–1329, 2012.

ANDRÉS, J. *et al.* Role of Monocytes in the Pathogenesis of Dengue. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 67, n. 1, p. 27–40, 2019.

ARIEDE, J. R. *et al.* Platelets can be a biological compartment for the Hepatitis C Virus. v. 629, p. 627–629, 2015.

BARBOSA-, G. *et al.* Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. v. 5, n. 10, 2009.

BARBOSA-LIMA, G. *et al.* Dengue virus-activated platelets modulate monocyte immunometabolic response through lipid droplet biogenesis and cytokine signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 4, p. 1293–1306, 2020a.

BARBOSA-LIMA, G. *et al.* Dengue virus-activated platelets modulate monocyte immunometabolic response through lipid droplet biogenesis and cytokine signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 4, p. 1293–1306, 2020b.

BEATTY, P. R. *et al.* Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, 2015.

BEZERRA, J. M. T. *et al.* Entry of dengue virus serotypes and their geographic distribution in Brazilian federative units: A systematic review. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, 2021.

BHATT, P. *et al.* Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 17–32, 2021.

BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.

BISWAS, S. *et al.* TLR2 Plays a Key Role in Platelet Hyperreactivity and Accelerated Thrombosis Associated With Hyperlipidemia. **Circulation research**, v. 121, n. 8, p. 951–962, set. 2017.

CHAO, C. *et al.* Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. p. 1–26, 2019a.

CHAO, C.-H. *et al.* Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007625, abr. 2019b.

CHEN, Y.-C.; WANG, S.-Y. Activation of Terminally Differentiated Human Monocytes/Macrophages by Dengue Virus: Productive Infection, Hierarchical Production of Innate Cytokines and Chemokines, and the Synergistic Effect of Lipopolysaccharide. **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p. 9877–9887, out. 2002.

CLARK, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nature medicine**, v. 13, n. 4, p. 463–9, abr. 2007.

CROZAT, K.; BEUTLER, B. **TLR7: A new sensor of viral infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, maio 2004.

DIAMOND, M. S. *et al.* Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strains. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 7814–7823, 2000a.

DIAMOND, M. S. *et al.* Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strains. v. 74, n. 17, p. 7814–7823, 2000b.

DIB, P. R. B. *et al.* Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 4, p. 1157–1182, 2020.

DICK, O. B. *et al.* **Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, out. 2012.

DWIVEDI, V. D. *et al.* Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. **Briefings in Functional Genomics**, v. 16, n. 4, p. 217–227, 2017.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2023. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>

FAN, J.; LIU, Y.; YUAN, Z. Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. **Virologica Sinica**, v. 29, n. 3, p. 162–169, 2014.

FLAUMENHAFT, R.; SHARDA, A. The life cycle of platelet granules. **F1000Research**, v. 7, n. 0, p. 1–12, 2018.

GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1739–1756, set. 2011.

HALLY, K. E. *et al.* Platelet Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated platelet activation in acute myocardial infarction. **Thrombosis Research**, v. 158, p. 8–15, 2017.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J.; ALLISON, A. C. **DENGUE VIRUSES AND MONONUCLEAR PHAGOCYTES II. Identity of Blood and Tissue Leukocytes Supporting In Vitro Infection\***. [s.l: s.n.].

HARAPAN, H. *et al.* Dengue: A minireview. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 1–35, 2020.

HARRISON, P.; MARTIN CRAMER, E. Platelet  $\alpha$ -granules. **Blood Reviews**, v. 7, n. 1, p. 52–62, 1993.

HOTTZ, E. D. *et al.* Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3405–3414, 2013a.

HOTTZ, E. D. *et al.* Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 11, n. 5, p. 951–62, maio 2013b.

HOTTZ, E. D. *et al.* Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 193, n. 4, p. 1864–72, ago. 2014a.

HOTTZ, E. D. *et al.* Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 193, n. 4, p. 1864–72, ago. 2014b.

HOTTZ, E. D. *et al.* Platelet function in HIV plus dengue coinfection associates with reduced inflammation and milder dengue illness. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

HOTTZ, E. D. *et al.* Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. **Blood**, v. 136, n. 11, p. 1330–1341, 2020.

HSIEH, T. *et al.* Senescence in Monocytes Facilitates Dengue Virus Infection by Increasing Infectivity. v. 10, n. July, p. 1–9, 2020.

HWANG, E. *et al.* Monocytes as suitable carriers for dissemination of dengue viral infection. **Heliyon**, v. 8, n. May, p. e11212, 2022.

KAR, M. *et al.* Dengue virus entry and replication does not lead to productive infection in platelets. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 1–5, 2017a.

KAR, M. *et al.* Dengue Virus Entry and Replication Does Not Lead to Productive Infection in Platelets. p. 1–6, 2017b.

KATZELNICK, L. C. *et al.* Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 929–932, 2017.

KOU, Z. *et al.* Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 1, p. 134–146, jan. 2008.

KOU, Z. *et al.* Human antibodies against dengue enhance dengue viral infectivity without suppressing type I interferon secretion in primary human monocytes. **Virology**, v. 410, n. 1, p. 240–247, 2011.

KOUPENOVA, M. *et al.* Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. **Blood**, v. 124, n. 5, p. 791–802, jul. 2014.

KUCZERA, D. *et al.* Highlights for Dengue Immunopathogenesis: Antibody-Dependent Enhancement, Cytokine Storm, and beyond. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 38, n. 2, p. 69–80, 2018.

KUHN, R. J. *et al.* **Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion.** [s.l.: s.n.].

LAI, T. Y. *et al.* Different methods of detaching adherent cells and their effects on the cell surface expression of Fas receptor and Fas ligand. **Scientific Reports**, p. 1–8, 2022.

LEE, T. *et al.* Alternative method for trypsin-based cell dissociation using poly ( amino ester ) coating and pH 6 . 0 PBS. 2021.

LIANG, Z. *et al.* Activation of toll-like receptor 3 impairs the dengue virus serotype 2 replication through induction of IFN- $\beta$  in cultured hepatoma cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

MACHLUS, K. R.; JR, J. E. I. The incredible journey : From megakaryocyte development to platelet formation. v. 201, n. 6, p. 785–796, 2013.

MAHESHWARI, D. *et al.* Contrasting behavior between the three human monocyte subsets in dengue pathophysiology. **iScience**, v. 25, n. 6, 17 jun. 2022.

MARTÍNEZ-VEGA, R. A. *et al.* ADE and dengue vaccination. **Vaccine**, v. 35, n. 32, p. 3910–3912, 2017.

MODHIRAN, N. *et al.* Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. **Immunology and Cell Biology**, v. 95, n. 5, p. 491–495, 2017.

MONGKOLSAPAYA, J. *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 921–927, 2003.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. **A structural perspective of the Flavivirus life cycle.** **Nature Reviews Microbiology**, jan. 2005.

MURUGESAN, A.; MANOHARAN, M. Dengue virus. Em: **Emerging and Reemerging Viral Pathogens: Volume 1: Fundamental and Basic Virology Aspects of Human, Animal and Plant Pathogens**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 281–359.

NANAWARE, N. *et al.* **Dengue virus infection: A tale of viral exploitations and host responses**. *Viruses* MDPI, , 1 out. 2021.

NASAR, S.; RASHID, N.; IFTIKHAR, S. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n. 8, p. 941–955, 2020.

NASIRUDEEN, A. M. A. *et al.* RIG-i, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 1, 2011.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. **Innate immune responses to dengue virus**. *Archives of Medical Research*, set. 2005.

NEVES-SOUZA, P. C. F. *et al.* Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infectious Diseases*, v. 5, 18 ago. 2005.

NOGUEIRA, R. M. *et al.* **Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes**. [s.l.: s.n.].

NOGUEIRA, R. M.; ZAGNER, S. DENGUE HAEMORRAHAGIC FEVER/DENGUE SHOCK SYNDROME (DHF/DSS) CAUSED BY SEROTYPE 2 IN BRAZIL. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 86, 1991.

NUNES, P. C. G. *et al.* **30 years of fatal dengue cases in Brazil: A review**. *BMC Public Health* BioMed Central Ltd., , 21 mar. 2019.

OJHA, A. *et al.* Platelet factor 4 promotes rapid replication and propagation of Dengue and Japanese encephalitis viruses. *EBioMedicine*, v. 39, p. 332–347, 2019.

PERDOMO, M. F. *et al.* Human serum protein enhances HIV-1 replication and up-regulates the transcription factor AP-1. v. 109, n. 43, p. 17639–17644, 2012.

PINHEIRO, M. B. *et al.* Dengue induces iNOS expression and nitric oxide synthesis in platelets through IL-1R. n. December, p. 1–14, 2022.

PUC, I. *et al.* Cytokine signature of dengue patients at different severity of the disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 6, p. 1–15, 2 mar. 2021.

QUIRINO-TEIXEIRA, A. C. *et al.* Inflammatory signaling in dengue-infected platelets requires translation and secretion of nonstructural protein 1. *Blood Advances*, v. 4, n. 9, p. 2018–2031, 2020.

QUIRINO-TEIXEIRA, A. C. *et al.* Platelets in dengue infection: more than a numbers game. *Platelets*, n. May, 2021.

REAL, F. *et al.* Platelets from HIV-infected individuals on antiretroviral drug therapy with poor CD4 + T cell recovery can harbor replication-competent HIV despite viral suppression. v. 6263, n. March, p. 1–12, 2020.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, 2010.

ROTHMAN, A. L. **Immunity to dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms.** **Nature Reviews Immunology**, ago. 2011.

SALLES, T. S. *et al.* **History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review.** **Parasites and Vectors** BioMed Central Ltd., , 24 abr. 2018.

SEMERARO, F. *et al.* Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1952–61, ago. 2011.

SIMON, A. Y.; SUTHERLAND, M. R.; PRYZDIAL, E. L. G. Dengue virus binding and replication by platelets. v. 126, n. 3, p. 378–386, 2015.

SRIKIATKHACHORN, A.; MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. **Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue.** **Seminars in Immunopathology** Springer Verlag, , 1 jul. 2017.

SUNG, P. S.; HUANG, T. F.; HSIEH, S. L. Extracellular vesicles from CLEC2-activated platelets enhance dengue virus-induced lethality via CLEC5A/TLR2. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.

TRUGILHO, M. R. DE O. *et al.* Platelet proteome reveals novel pathways of platelet activation and platelet-mediated immunoregulation in dengue. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006385, maio 2017.

TSAI, J.-J. *et al.* Transient Monocytosis Subjugates Low Platelet Count in Adult Dengue Patients. **Biomedicine Hub**, v. 2, n. 1, p. 1–16, 3 mar. 2017a.

TSAI, T. T. *et al.* Antibody-Dependent Enhancement Infection Facilitates Dengue Virus-Regulated Signaling of IL-10 Production in Monocytes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

TSAI, T. T. *et al.* Targeting heat shock factor 1 as an antiviral strategy against dengue virus replication in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 145, p. 44–53, 2017b.

TSAI, Y. T. *et al.* Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 604–615, 2009.

WAN, S. W. *et al.* **The monocyte-macrophage-mast cell axis in dengue pathogenesis.** *Journal of Biomedical Science* BioMed Central Ltd., , 8 nov. 2018.

WANG, W.-H. *et al.* Dengue hemorrhagic fever - A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, p. 963–978, 2020.

WHO AND SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Em: **World Health Organization**. [s.l: s.n.]. p. 1–144.

WILDER-SMITH, A. *et al.* Dengue. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 2019.

WONG, K. L. *et al.* Susceptibility and Response of Human Blood Monocyte Subsets to Primary Dengue Virus Infection. v. 7, n. 5, 2012a.

WONG, K. L. *et al.* Susceptibility and response of human blood monocyte subsets to primary dengue virus infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 4 maio 2012b.

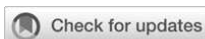
YAP, S. S. L. *et al.* Dengue virus glycosylation: What do we know? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–16, 2017.

ZHANG, S. *et al.* Nucleotide-binding oligomerization domain 2 receptor is expressed in platelets and enhances platelet activation and thrombosis. **Circulation**, v. 131, n. 13, p. 1160–1170, 2015.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. **Original antigenic sin in dengue revisited.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28 maio 2013.



## ANEXO I



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Ilaria Canobbio,  
University of Pavia, Italy

REVIEWED BY  
Brandon Beddingfield,  
Tulane University, United States  
Juan C. Hernandez,  
Cooperative University of  
Colombia, Colombia  
Thawornchai Limjindaporn,  
Mahidol University, Thailand  
Andre Van Der Ven,  
Radboud University, Netherlands

\*CORRESPONDENCE  
Eugenio D. Hottz  
eugeniohottz@gmail.com

†These authors have contributed  
equally to this work and share  
first authorship

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Cytokines and Soluble  
Mediators in Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 26 August 2022  
ACCEPTED 09 November 2022  
PUBLISHED 07 December 2022

CITATION  
Pinheiro MBM, Rozini SV, Quirino-  
Teixeira AC, Barbosa-Lima G,  
Lopes JF, Sacramento CQ, Bozza FA,  
Bozza PT and Hottz ED (2022) Dengue  
induces iNOS expression and nitric  
oxide synthesis in platelets  
through IL-1R.  
*Front. Immunol.* 13:1029213.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.1029213

COPYRIGHT  
© 2022 Pinheiro, Rozini, Quirino-  
Teixeira, Barbosa-Lima, Lopes,  
Sacramento, Bozza, Bozza and Hottz.  
This is an open-access article  
distributed under the terms of the  
Creative Commons Attribution License  
(CC BY). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Dengue induces iNOS expression and nitric oxide synthesis in platelets through IL-1R

Mariana Brandi Mendonça Pinheiro<sup>1†</sup>,  
Stephane Vicente Rozini<sup>1†</sup>, Anna Cecília Quirino-Teixeira<sup>1</sup>,  
Giselle Barbosa-Lima<sup>2</sup>, Juliana F. Lopes<sup>2</sup>,  
Carolina Q. Sacramento<sup>2,3</sup>, Fernando A. Bozza<sup>4,5</sup>,  
Patrícia T. Bozza<sup>2</sup> and Eugenio D. Hottz<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunothrombosis, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, <sup>2</sup>Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup>National Institute for Science and Technology on Innovation in Diseases of Neglected Populations (INCT/IDPN), Center for Technological Development in Health (CDTS), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>4</sup>National Institute of Infectious Disease Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>5</sup>D'Or Institute for Research and Education, Rio de Janeiro, Brazil

**Introduction:** Dengue is an arthropod-borne disease caused by dengue virus (DENV), that may manifest as a mild illness or severe form, characterized by hemorrhagic fever and shock. Nitric oxide (NO) is a vasodilator signaling molecule and an inhibitor of platelet aggregation known to be increased in platelets from dengue patients. However, the mechanisms underlying NO synthesis by platelets during dengue are not yet elucidated. IL-1 $\beta$  is a pro-inflammatory cytokine able to induce iNOS expression in leukocytes and present in dengue patients at high levels. Nevertheless, the role of IL-1 $\beta$  in platelet activation, especially regarding iNOS expression, are not clear.

**Methods:** We prospectively followed a cohort of 28 dengue-infected patients to study NO synthesis in platelets and its relationship with disease outcomes. We used in vitro infection and stimulation models to gain insights on the mechanisms.

**Results and Discussion:** We confirmed that platelets from dengue patients express iNOS and produce higher levels of NO during the acute phase compared to healthy volunteers, returning to normal levels after recovery. Platelet NO production during acute dengue infection was associated with the presence of warning signs, hypoalbuminemia and hemorrhagic manifestations, suggesting a role in dengue pathophysiology. By investigating the mechanisms, we evidenced increased iNOS expression in platelets stimulated with dengue patients' plasma, indicating induction by circulating inflammatory mediators. We then investigated possible factors able to induce platelet iNOS expression and observed higher levels of IL-1 $\beta$  in plasma from patients with dengue, which were correlated with NO production by platelets. Since platelets can synthesize

and respond to IL-1 $\beta$ , we investigated whether IL-1 $\beta$  induces iNOS expression and NO synthesis in platelets. We observed that recombinant human IL-1 $\beta$  enhanced iNOS expression and dose-dependently increased NO synthesis by platelets. Finally, platelet infection with DENV in vitro induced iNOS expression and NO production, besides the secretion of both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Importantly, treatment with IL-1 receptor antagonist or a combination of anti-IL-1 $\alpha$  and anti-IL-1 $\beta$  antibodies prevented DENV-induced iNOS expression and NO synthesis. Our data show that DENV induces iNOS expression and NO production in platelets through mechanisms depending on IL-1 receptor signaling.

#### KEYWORDS

platelets, nitric oxide, iNOS, IL-1R, dengue

## Introduction

Dengue is a disease caused by dengue virus (DENV) and transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes. The disease affects mainly the tropical and subtropical regions and has become a serious health issue worldwide with almost 400 million new infections each year (1, 2). Dengue usually manifests as a mild illness characterized by a self-limiting infection. It might also present with warning signs including mucosal bleeding, fluid accumulation and rapid thrombocytopenia that can evolve to severe dengue, characterized by plasma leakage, hemodynamic instability, hemorrhagic fever, and shock (3). After the incubation period, the disease starts with the initial febrile phase with typical symptoms including high-grade fever, dehydration, and increased hematocrit. After the defervescence, patients may follow with a critical phase characterized by increased vascular permeability and plasma leakage that might lead to increased risk of severe dengue. The complications associated with severe dengue include severe bleeding, shock, and organ impairment, that may lead to death (3, 4).

Inflammation plays a major role in dengue pathogenesis and disease severity. It has been demonstrated that the upregulation of inflammatory mediators that synergize to amplify the inflammatory response contributes to vascular dysfunction and organ impairment (5, 6). Cytokines as IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  are elevated in severe dengue patients and associate with the degree of thrombocytopenia, hemodynamic instability, and disease severity (7). Among these cytokines, IL-1 $\beta$  is a potent pro-inflammatory cytokine related to the induction of fever and a trigger of nitric oxide (NO) production in many cells (8–11). NO is a vasodilator signalling molecule regulating vascular function, cell recruitment, and platelet aggregation. It is generated upon oxidation of L-arginine, catalyzed by nitric oxide synthase (NOS) enzymes and it is rapidly converted into nitrite and nitrate (12, 13). Enhanced NO bioavailability and nitrite levels are associated with

vascular dysfunction and hemorrhage in dengue patients, and increased L-arginine transport and NOS activity in platelets have been associated with platelet dysfunction in dengue (14–17).

Platelet dysfunction and thrombocytopenia are hallmarks of dengue. Platelets are known mainly by their role in thrombosis and hemostasis, but they also play important roles in modulating immune response through mechanisms involving interaction with leukocytes and secretion of inflammatory mediators (18). Platelet secretion involves the translocation of granules containing stored factors such as cytokines and chemokines, and also newly synthesized mediators such as eicosanoids and NO (19–21). Platelets secrete NO through the expression of different NOS enzymes, including endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) isoforms (12, 15). Besides immune and inflammatory response, platelets also play important roles in maintaining vascular stability and in pathological vascular inflammation and dysfunction (22–25). During dengue, patients present increased platelet activation and emerging evidence highlights the participation of platelets in dengue pathogenesis, including in inflammatory amplification and increased vascular permeability (18, 22, 25–31). However, the mechanism underlying platelet NO synthesis and its contributions to dengue pathogenesis remains poorly elucidated. In this study, we aimed to evaluate the mechanisms of iNOS expression and NO production in platelets during dengue.

## Material and methods

### Human subjects

We prospectively followed a cohort of 28 serologically and/or molecularly confirmed DENV-infected patients from the



Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil, during the dengue outbreaks of 2011-2013. Peripheral vein blood samples were obtained from all patients during the acute phase. The average day of sample collection after the onset of illness was  $5 \pm 1.9$  days and the day of defervescence was  $6 \pm 1.8$  days. All patients were followed until the discharge and a second sample was obtained from 12 patients at the recovery phase. The cohort was comprised of patients with mild to severe dengue. Specifically, 18 (64,3%) patients evolved with warning signs, of which 3 (10,7%) progressed to severe dengue syndrome. The levels of immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) specific to DENV E protein were measured using a standard capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions (E-Den01M and E-Den01G; PanBio) and the IgM/IgG antibody ratio  $> 1.2$  was used to distinguish between primary and secondary infections as previously reported (32, 33) and shown in Table 1. Virus typing and quantification were performed using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) as previously described (34, 35). All patients had dengue confirmed diagnostic through RT-PCR, IgM and/or nonstructural protein 1 (NS1) positivity in blood. Peripheral vein blood was also collected from 23 age- and sex-

matched healthy subjects that were included in parallel to dengue patients. The characteristics of dengue patients and control participants are presented in Table 1. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas #016/2010), and the experiments were performed in compliance with this protocol. Written informed consent was obtained from all volunteers prior to any study-related procedure, according to the Declaration of Helsinki.

## Platelet isolation

Platelet isolation was performed as previously described (29). Peripheral blood samples were drawn into acid-citrate-dextrose (ACD) and centrifuged at 200 x g for 20 min. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained and recentrifuged (500 X g, 20 min) in the presence of 100 nM of prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>; Cayman 1303) to pellet the platelets. Platelet pellets were resuspended in 25 ml of PSG (5 mM PIPES, 145 mM 35 NaCl, 4 mM KCl, 50 μM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5,5 mM glucose; pH 6,8) containing 100 nM PGE<sub>1</sub>. The platelet suspension was centrifuged again at 500 X g for 20 min and the platelet pellet was resuspended in medium 199 (M199)

TABLE 1 Characteristics of dengue-infected patients and healthy volunteers.

	Control (23)	Dengue (28)	Reference values
Age, years	27 (26–35)	36 (22 – 44)	–
Gender, male	12 (52%)	14 (50%)	–
Day of sampling after symptoms onset	–	5 (4 – 6)	–
Day of defervescence	–	6 (5 – 7)	–
Platelet count, x1,000/mm <sup>3</sup>	–	95 (42 – 130)	150 – 450
Hematocrit, %	–	41 (39 – 45)	36 – 52
Albumin, g/dL	–	3.4 (3.0 – 3.7)	3.6 – 5.5
TGO/AST, IU/L	–	65 (43 – 128)	15 – 37
TGP/ALT, IU/L	–	68 (47 – 105)	12 – 78
Warning Signs <sup>1</sup>	–	18 (64.3%)	–
Severe Dengue <sup>2</sup>	–	3 (10.7%)	–
Signs of increased vascular permeability <sup>3</sup>	–	17 (60.7%)	–
Thrombocytopenia (< 100,000/mm <sup>3</sup> )	–	14 (50%)	–
Hemorrhagic manifestations <sup>4</sup>	–	7 (25%)	–
Secondary dengue infection	–	16 (57%)	–
PCR positive (DENV-1)	0 (0%)	22 (78.5%)	–
IgM positive	0 (0%)	27 (96.4%)	–
NS1 positive	0 (0%)	5 (18%)	–
IgM positive NS1 negative	0 (0%)	23 (82%)	–
NS1 positive IgM negative	0 (0%)	1 (3.5%)	–
IgM positive NS1 positive	0 (0%)	4 (14%)	–

Data are expressed as median (interquartile range) or number (%). Laboratorial data correspond to the lower (platelet count and albumin) or the higher (hematocrit, TGO/AST, and TGP/ALT) level each patient achieved in the course of the disease. <sup>1</sup> Abdominal pain or tenderness, persistent vomiting, clinical fluid accumulation, mucosal bleeding, and/or increased hematocrit concurrent with a rapid decrease in platelet count. <sup>2</sup> Severe plasma leakage, fluid accumulation, ascites, and/or massive bleeding. <sup>3</sup> According to WHO guidelines (2009). <sup>4</sup> Increase in hematocrit  $>20\%$ , hypoalbuminemia ( $< 3.6$  g/dL), postural hypotension, ascites, and/or oliguria. <sup>5</sup> Gingival bleed, vaginal bleed, gastrointestinal bleed, petechiae, and exanthema.

containing 25 mM of HEPES to the concentration of  $1 \times 10^9$ /mL. The platelet viability in dengue patients and healthy volunteers in the present study has been previously reported (26). The viability of platelets used for *in vitro* experiments was above 95% of live platelets.

## Platelet exposure to DENV *in vitro*

DENV2 strain 16881 was propagated in C6/36 *Aedes albopictus* cells and titrated by plaque assay, as previously described (36). Supernatant from uninfected cell cultures produced in the same conditions was used as negative control (Mock). Platelets from healthy volunteers were incubated in M199 with DENV2 in a multiplicity of infection of 1 virus per platelet (MOI = 1) or incubated with the same amount of Mock for 6 hours at 37°C. After stimuli, samples were centrifuged at 900 X g for 15 minutes for supernatant harvesting and cell preparation for flow cytometry or Western blot. To investigate the mechanisms involved in platelet iNOS expression and NO production, platelets were incubated with DENV-2 in the presence or absence of IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), anti-IL-1 $\alpha$  (R&D 840201) or anti-IL-1 $\beta$  (R&D 840168) or isotype-matched control antibody.

## Platelet *in vitro* stimulation

Platelet-poor plasma (PPP) was collected and centrifuged at 2500 x g for 20 min, aliquoted, and stored at -80°C until use. Platelets from healthy volunteers were stimulated with 10% or 100% of plasma from 3-11 dengue patients or heterologous healthy volunteers for 4 hours at 37°C. The average day of sample collection after the onset of illness in patients whose plasma was used for *ex vivo* platelet stimulation was  $4 \pm 2.6$  days. Platelets from healthy volunteers were also stimulated with 1 to 1000 pg/ml of recombinant human IL-1 $\beta$  (R&D 840170) for 4 hours at 37°C. After stimuli, platelets were centrifuged at 900 x g for 15 minutes for supernatant harvesting and cell preparation for flow cytometry.

## Nitrite quantification

Washed platelets ( $1 \times 10^9$ /mL) isolated from seven healthy volunteers, 24 dengue-infected patients at the acute phase, and 12 recovered patients were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 4 hours. After incubation, platelets were pelleted and the supernatants were harvested. Supernatants from platelets from patients or from *in vitro* infection model were used for nitrite quantification by Griess method as previously described (37, 38). Briefly, nitrite was quantified by reaction with 0.5% sulfanilamide and 0.05% N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, while a standard curve was prepared by serial

dilution of sodium nitrite (Sigma-Aldrich). Sample absorbances after Griess reaction were determined by SpectraMax microplate reader at 595nm.

## Western blot analysis

Platelets samples were lysed (NaCl 0.15 M, Tris 10 mM pH 8, EDTA 0.1 mM, Triton X-100 1%, and protease inhibitor cocktail (ROCHE)) and protein quantification was performed using BCA kit (Thermo Scientific). Protein extracts (10  $\mu$ g) from platelets from 4 patients and 4 healthy volunteers were prepared with sample buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol, separated in 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred into nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) supplemented with 0.1% Tween 20 (TBS-T) plus 5% milk for 1 hour and incubated with primary antibodies mouse anti-iNOS (BD610333) and mouse anti-human  $\beta$ -actin (Sigma A1978).

## Cytokine and chemokine measurement

Cytokine and chemokine levels (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, IL-1 $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ ) were quantified in dengue patient's plasma or supernatant from *in vitro* stimulated platelets using Multiplex assay kit (Bioplex, BioRad) or ELISA kit (R&D systems) according to manufacturer's instructions.

## Flow cytometry

Platelet NO synthesis was assessed using the fluorescent probe DAF-FM diacetate as per the manufacturer's instructions (Invitrogen, D23844) in freshly isolated platelets from patients and healthy volunteers. Intracellular labeling of iNOS was also assessed in platelets infected with DENV *in vitro*. Platelets were fixed in PBS containing paraformaldehyde 4% for 10 min, permeabilized with PBS containing 0,1% TRITON for 10 minutes, and washed with PBS. Platelet pellet was resuspended in PBS and incubated with anti-iNOS primary antibody (NBP222119) overnight at 4°C. Platelets were washed again and incubated with PE-conjugated anti-mouse IgG (e-Bioscience 12-4012-87) for 30 min, washed again and labeled with APC-conjugated anti-CD41 antibody (BD555466). Platelets were gated according to their characteristic forward and side scattering and positivity to CD41. Platelet samples (10,000 gated events) were acquired in the flow cytometer BD FACSVerser or BD FACSCalibur and analyzed using FlowJo software.



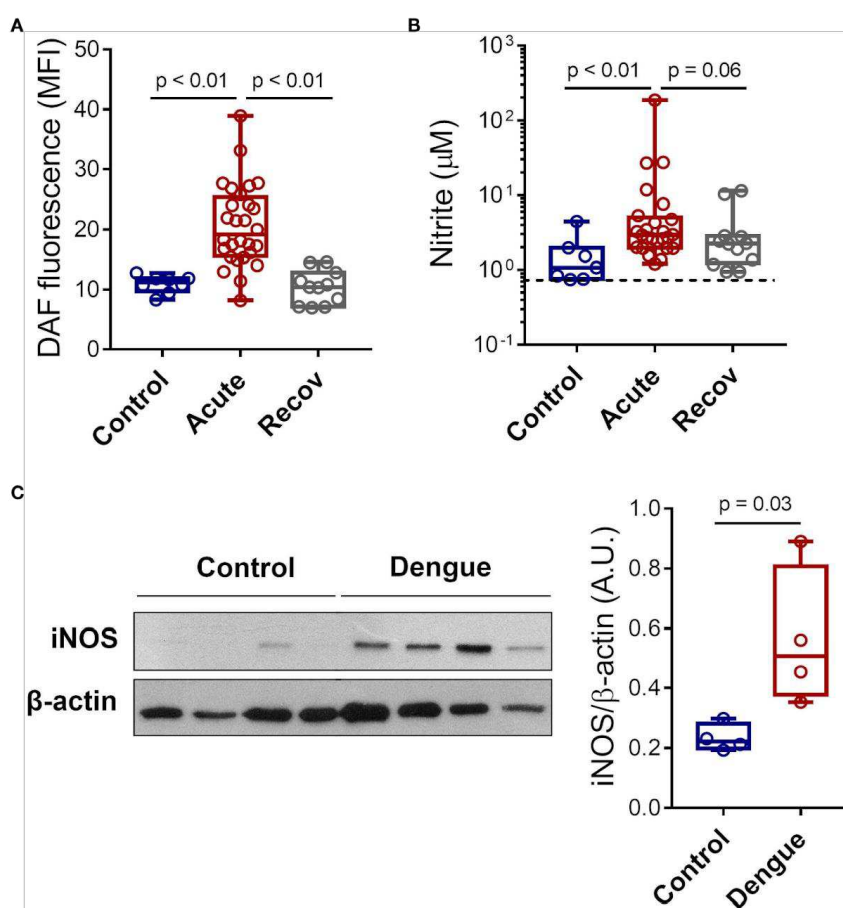
## Statistical analysis

All statistics were performed with GraphPad Prism 7 software. The Shapiro-Wilk test was used to analyze whether numerical variables followed a normal distribution. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare  $\geq 3$  groups and the locations of the differences were identified by Tukey's *post hoc* test. Comparisons between 2 groups were performed with the Mann-Whitney U test for nonparametric distributions or the Student T-test for parametric distributions using Welch's T-test for unpaired samples or paired T-test for *in vitro* experiments with platelets from the same donor exposed to different stimuli. The correlations were performed using Pearson's correlation test for parametric distributions and Spearman correlation test for nonparametric distributions.

## Results

### Dengue induces iNOS expression and NO synthesis by platelets

To confirm NO synthesis by platelets during Dengue infection, we quantified NO production in platelets from patients with acute dengue, healthy volunteers, and recovered patients using DAF-FM diacetate probe fluorescence (Figure 1A). Our data show increased NO production in platelets from patients with acute dengue compared to healthy volunteers or patients at the recovery phase (Figure 1A). In addition, we quantified nitrite, a product of NO metabolism, in the supernatant of platelets from patients or healthy volunteers. We found increased levels of nitrite in platelets from dengue



**FIGURE 1**

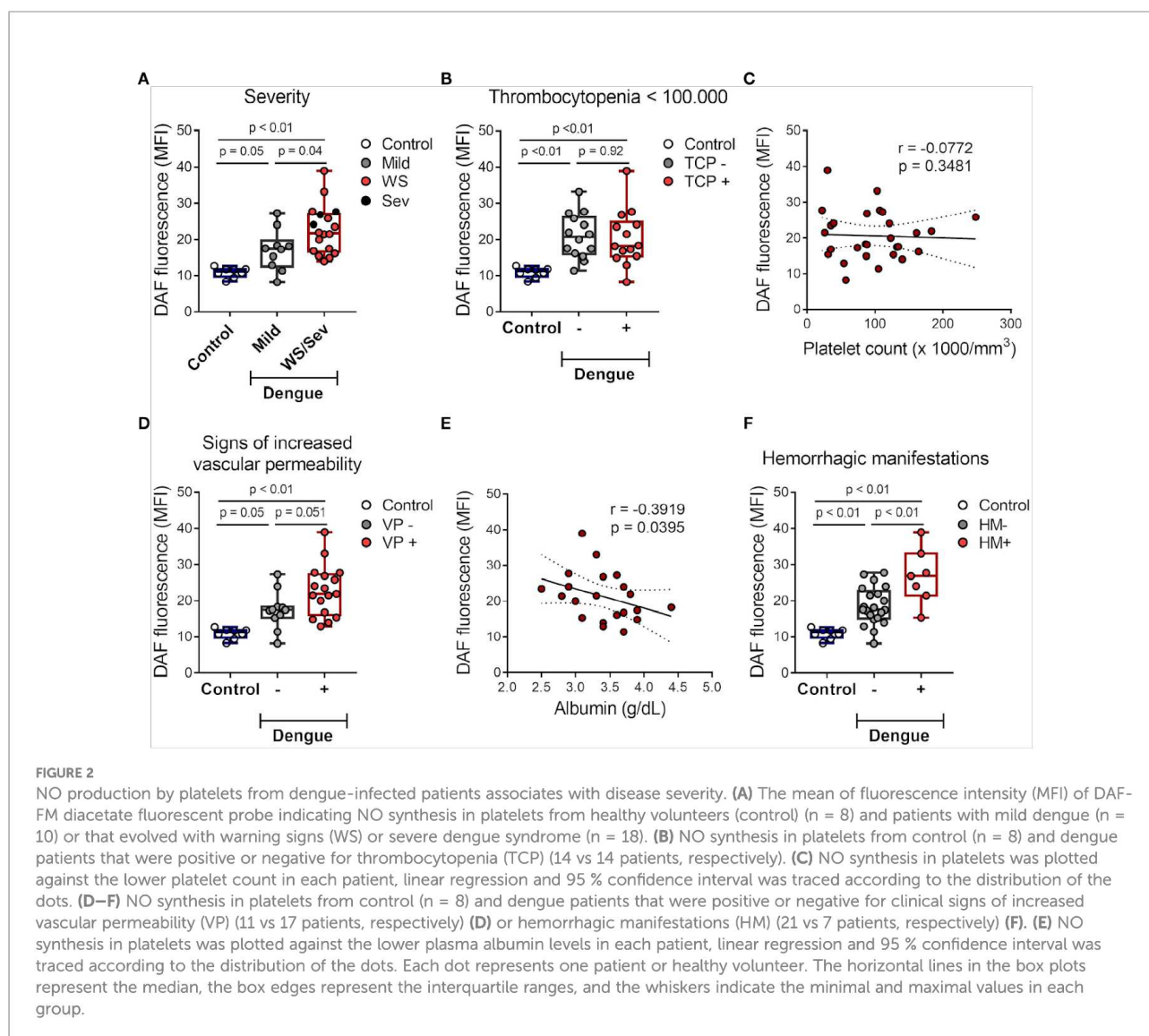
Dengue induces iNOS expression and NO synthesis in platelets. (A) The mean fluorescence intensity (MFI) of DAF-FM diacetate fluorescent probe indicating NO synthesis in platelets from 8 healthy volunteers (control), 28 patients with dengue at the acute phase, and 12 patients at the recovery phase. (B) Platelets from 7 healthy volunteers, 25 dengue-infected patients in the acute phase, and 12 patients in the recovery phase were isolated and incubated for 4 hours at 37°C and nitrite production was quantified in platelets supernatants by Griess reaction. The dotted line indicates the lower detection limit of the protocol. (C) Expression of iNOS in platelets lysates from 4 healthy volunteers and 4 dengue-infected patients was analyzed by western blot.  $\beta$ -actin was used as load control. Band densitometry of iNOS expression corrected by  $\beta$ -actin expression is shown (A.U., arbitrary units). Each dot represents one patient or healthy volunteer. The horizontal lines in the box plots represent the median, the box edges represent the interquartile ranges, and the whiskers indicate the minimal and maximal values in each group.

patients at the acute phase compared to control (Figure 1B). We then investigated whether platelets from dengue patients express inducible NOS (iNOS or NOS2). We analyzed iNOS expression in platelets from four DENV-infected patients and four age- and sex-matched healthy volunteers by western blot. As shown in Figure 1C, platelets from patients with dengue express higher levels of iNOS compared to healthy volunteers.

## Platelet NO production is associated with dengue disease outcome

Next, we investigated whether NO synthesis by platelets at the acute phase is associated with dengue disease outcomes. Platelets from patients that have evolved with warning signs and/or severe dengue syndrome showed increased NO production compared to mild illness (Figure 2A). Using the lowest platelet

count of each patient, dengue patients were classified as thrombocytopenic ( $< 100,000/\text{mm}^3$ ) or nonthrombocytopenic. Based on this grouping, 50% of the patients were thrombocytopenic (Table 1). We did not find any association between platelet NO production and thrombocytopenia (Figures 2B, C). We have also classified the patients as positive or negative for clinical signs of increased vascular permeability according to the presence of one or more of the following signs: increased hematocrit greater than 20%, hypoalbuminemia, postural hypotension, ascites, and/or oliguria. Patients presenting clinical signs of increased vascular permeability showed a trend towards increased NO production by platelets (Figure 2D). Importantly, the relationship between platelet NO production and increased vascular permeability in patients was confirmed by the negative correlation between platelet NO synthesis and plasma albumin levels (Figure 2E), a laboratorial marker of plasma leakage. Finally, dengue patients were





classified according to the presence or absence of hemorrhagic manifestations (gingival bleeding, vaginal bleeding, gastrointestinal bleeding, petechiae, and/or exanthema). We observed significantly higher NO production in platelets from patients that evolved with haemorrhagic manifestations (Figure 2F). Together, these results indicate that platelet NO production is higher in patients with warning signs and/or severe dengue, especially correlating with hypoalbuminemia and hemorrhage.

### Plasma from dengue patients induces iNOS expression and NO synthesis in platelets

We then investigated whether inflammatory mediators in plasma from patients with dengue contribute to platelet iNOS expression and NO synthesis. Platelets from healthy volunteers were incubated with 10% or 100% plasma from dengue patients or heterologous healthy volunteers. We observed higher iNOS expression in platelets incubated with whole plasma (100%) from dengue patients compared to control (Figures 3A, B). In addition, we observed increased NO production in platelets exposed to 100% plasma of dengue patients compared with control plasma (Figure 3C). Altogether, these data show that soluble factors produced during dengue infection are at least in part responsible for the induction of iNOS expression and NO production in platelets.

### NO synthesis in platelets associates with increased IL-1 $\beta$ in Dengue

Different proinflammatory cytokines and chemokines are known to induce iNOS expression and NO production in leukocytes and endothelial cells (8, 39–42). Hence, we quantified proinflammatory cytokines in plasma from dengue patients at acute phase. Our results demonstrate increased levels of TNF- $\alpha$  and MCP-1/CCL2 in patients that evolved with either mild dengue or warning signs and severe dengue syndromes, while higher levels of IFN- $\gamma$ , RANTES/CCL5 and IL-1 $\beta$  were observed only in plasma from patients presenting warning signs and severe dengue (Figures 4A–E). Moreover, IL-1 $\beta$  concentration in plasma positively correlated with NO production in platelets (Figure 4F), suggesting a possible participation of IL-1 $\beta$  in platelet nitric oxide synthesis during dengue.

### IL-1 $\beta$ induces iNOS expression and NO synthesis in platelets

Since platelets express IL-1 receptor (IL-1R) and are capable to respond to IL-1 $\beta$  (43–46), we investigated whether IL-1 $\beta$

induces NO production in platelets. Nitrite quantification was performed in supernatants of platelets stimulated with increasing concentrations of recombinant human IL-1 $\beta$ , and enhanced nitrite production was observed in platelets stimulated with 100 pg/ml and 1000 pg/ml of IL-1 $\beta$  (Figure 5A). Moreover, assessment of intracellular iNOS expression by flow cytometry revealed augmented protein expression in platelets stimulated with recombinant IL-1 $\beta$  (1000 pg/ml) (Figures 5B, C).

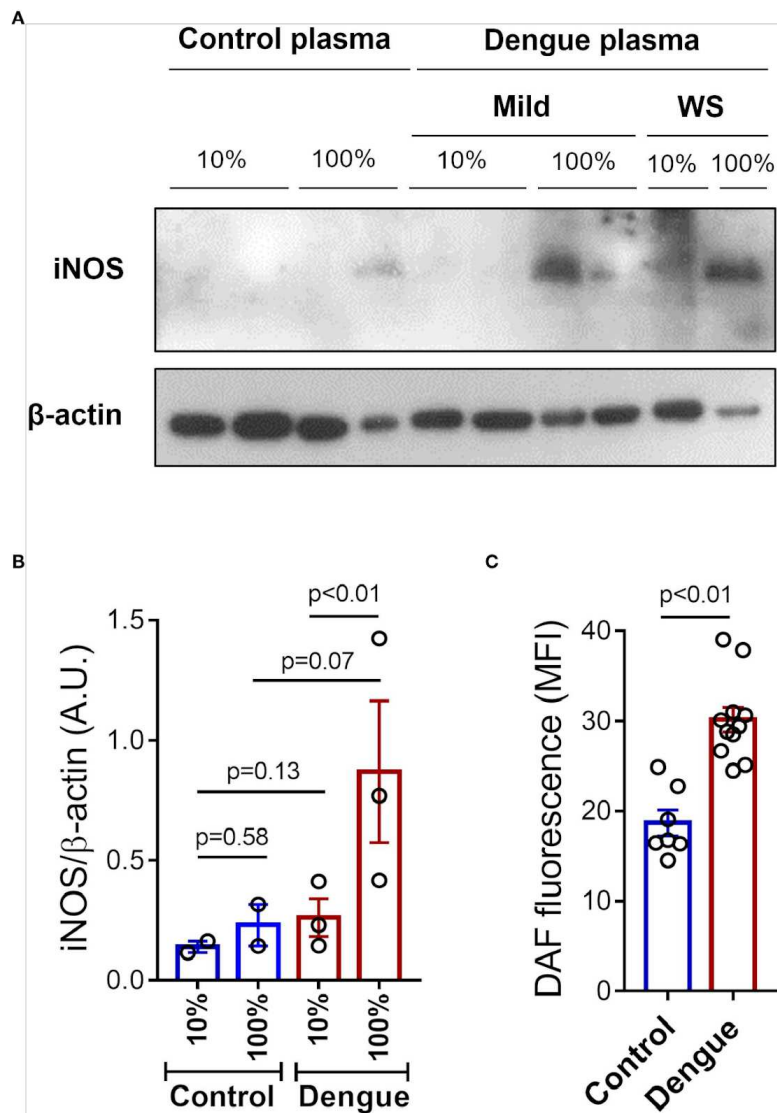
### DENV induces platelet iNOS expression and NO production through IL-1R

To verify if exposure to DENV *in vitro* reproduces NO synthesis as observed in platelets from patients, we incubated platelets from healthy donors with DENV-2 (MOI = 1) and evaluated iNOS expression and nitrite production. We observed that platelets exposed to DENV *in vitro* expressed higher amounts of iNOS and secreted higher levels of nitrite (Figures 6A, B). Importantly, platelet exposure to DENV also induced the secretion of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Figures 6C, D).

We then investigated whether platelet IL-1-IL-1R signaling through an autocrine loop (43, 45) is involved in iNOS expression and NO synthesis in infected platelets. To gain insights in the relative roles of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  to NO synthesis in infected platelets, we stimulated platelets with DENV in the presence of neutralizing antibodies against IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  separately and in combination. As shown in Figure 6E, only the blocking of both cytokines combined was able to reduce NO synthesis in platelets exposed to DENV, although only a trend towards statistical significance was observed (Figure 6E). To confirm the role of IL-1-IL-1R signaling, we stimulated platelets with DENV in the presence or absence of IL-1R antagonist (IL-1RA). IL-1R blocking with IL-1RA significantly prevented iNOS expression and NO production induced by DENV (Figures 6F, G), confirming the role of IL-1-IL-1R signaling in DENV-mediated NO synthesis in platelets.

## Discussion

It is known that platelets participate in the immune and inflammatory responses during dengue infection through interaction with leukocytes and secretion of inflammatory mediators (18, 28–31, 47, 48), including the production of NO (12, 15, 49). In the present study, we confirmed augmented production of NO by platelets during dengue infection. Even though a previous study was not able to demonstrate significant changes in NOS expression in platelets from dengue patients (12), our results show increased iNOS expression in platelets during dengue illness. Previous studies have shown NO as an



**FIGURE 3**

Plasma from dengue patients induces iNOS expression and NO synthesis in platelets. Platelets from healthy volunteers were incubated with 10% or 100% of plasma from patients with mild dengue or dengue with warning signs (WS), or heterologous healthy volunteers (control) for 4 hours at 37°C. **(A)** Expression of iNOS in platelet lysates were analyzed by western blot. β-actin was used as load control. **(B)** Band densitometry of iNOS expression corrected by β-actin expression is shown (A.U., arbitrary units). **(C)** NO production was measured by DAF in platelets incubated with 100% of plasma from control (n = 7) or dengue patients (n = 11). Each dot represents one patient or healthy volunteer. The bars represent the mean ± standard error of the mean of a representative experiment with platelets from one healthy volunteer stimulated with control or dengue patients' plasma.

inflammatory mediator with antiplatelet and anticoagulant actions and involved in endothelial dysfunction in dengue (12, 15, 17, 50). Here we show that platelet NO production in dengue correlates with disease severity markers, especially with hypoalbuminemia and haemorrhage, but not with thrombocytopenia. Our data is in agreement with higher levels of NO in association with vascular and platelet dysfunction in dengue culminating in plasma leakage and haemorrhage (14–17), and suggests platelets as a source of NO in dengue.

Here we show that soluble factors in the plasma of dengue patients contribute to the induction of iNOS and NO in platelets, and evaluated the levels of proinflammatory cytokines in patients' plasma. Interestingly, iNOS expression was induced only by dengue patients' plasma at higher concentration, suggesting that the mediators involved in this process have lower thresholds, since the 10-fold dilution of the plasma prevented iNOS induction. Our data show that IL-1β plasma levels was positively correlated with NO production by platelets,



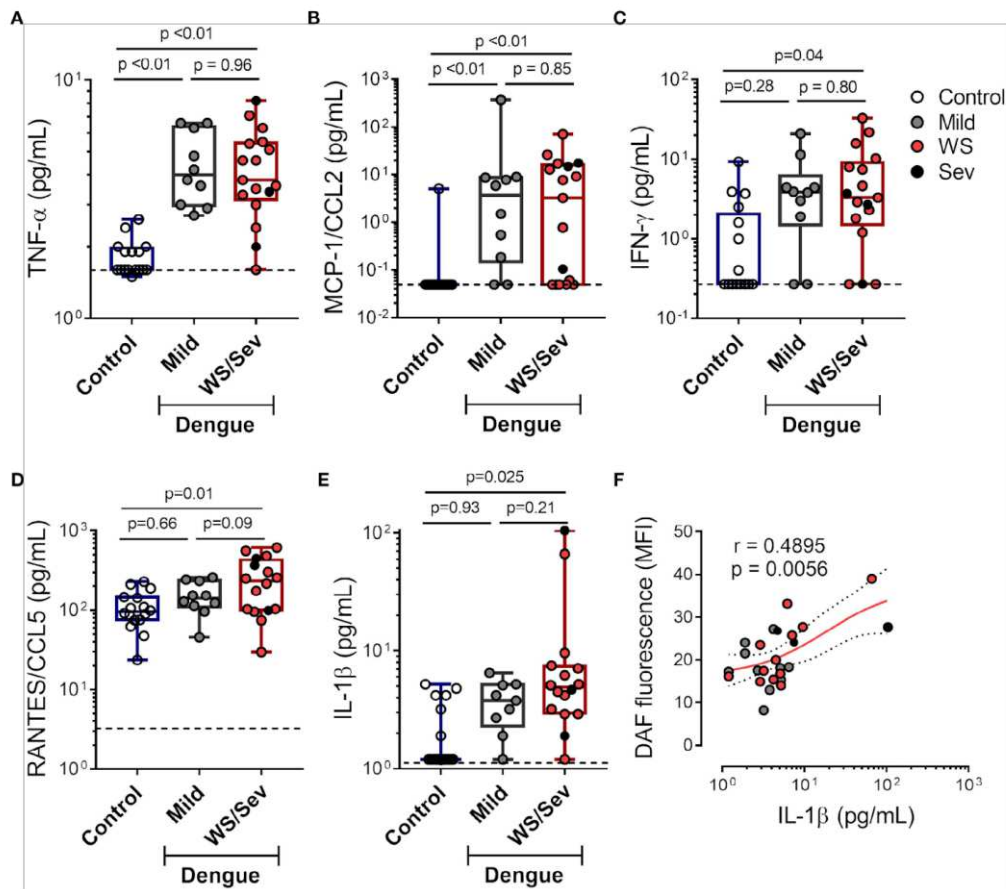


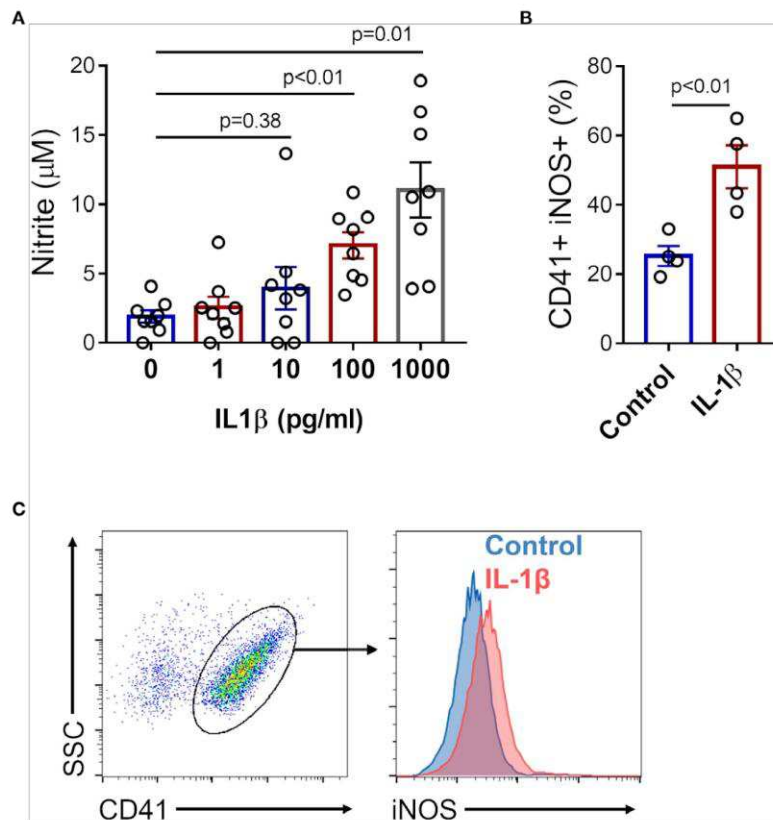
FIGURE 4

Increased levels of pro-inflammatory cytokines in plasma from dengue patients. The concentrations of (A) TNF- $\alpha$  (B) MCP-1/CCL2 (C) IFN- $\gamma$  (D) RANTES/CCL5 and (E) IL-1 $\beta$  were quantified in plasma from dengue-infected patients with mild ( $n = 10$ ) or that presented warning signs or severe dengue ( $n = 18$ ). Each dot represents one patient or healthy volunteer. The horizontal lines in the box plots represent the median, the box edges represent the interquartile ranges, and the whiskers indicate the minimal and maximal values in each group. The dotted lines indicate the lower detection limit of each protocol. (F) NO synthesis in platelets was plotted against the IL-1 $\beta$  concentration in plasma of each dengue patient. Nonlinear regression was calculated according to the distribution of the dots.

similarly to what has been found in macrophages from obese individuals (51). Besides IL-1 $\beta$ , we have also quantified IL-1 $\alpha$ , but all patient samples presented concentrations below the detection limit (data not shown). Plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were increased in plasma from dengue patients in the present report. Despite their low levels, these cytokines are potent proinflammatory cytokines and are known to act in synergism, potentiating each other response (52, 53). Consistently, only the inhibition of IL1- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  together resulted in lower NO production in our *in vitro* infection model. Proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-1 $\beta$  are widely known to induce NO synthesis in different cells, including macrophages, epithelial and endothelial cells (8, 41, 42). Platelets express cytokine and chemokine receptors and respond to many of these mediators (18). TNF- $\alpha$  leads to platelet activation and adhesion, and contributes to

the production of hyperactive platelets in a model of aging (54). Type I and type II IFNs have major roles in megakaryocyte signalling that modulate platelet production leading to thrombocytopenia and anti-viral platelet responses in many viral infections (55–58). Moreover, IL-1 $\beta$  stimulation changes the clotting profile and causes platelet hyperactivity (44, 46). These evidences reveal the participation of cytokines and chemokines in platelet regulation and reprogramming of immune responses.

Recent studies have demonstrated important roles of IL-1 $\beta$  in dengue pathogenesis including in tissue injury, vascular permeability and infiltration of inflammatory cells (25, 59–61). Our group has previously demonstrated that platelet activation in dengue induces NLRP3 inflammasome activation and increased IL-1 $\beta$  secretion, which contributes to increased endothelial permeability (25). Furthermore, it is known that



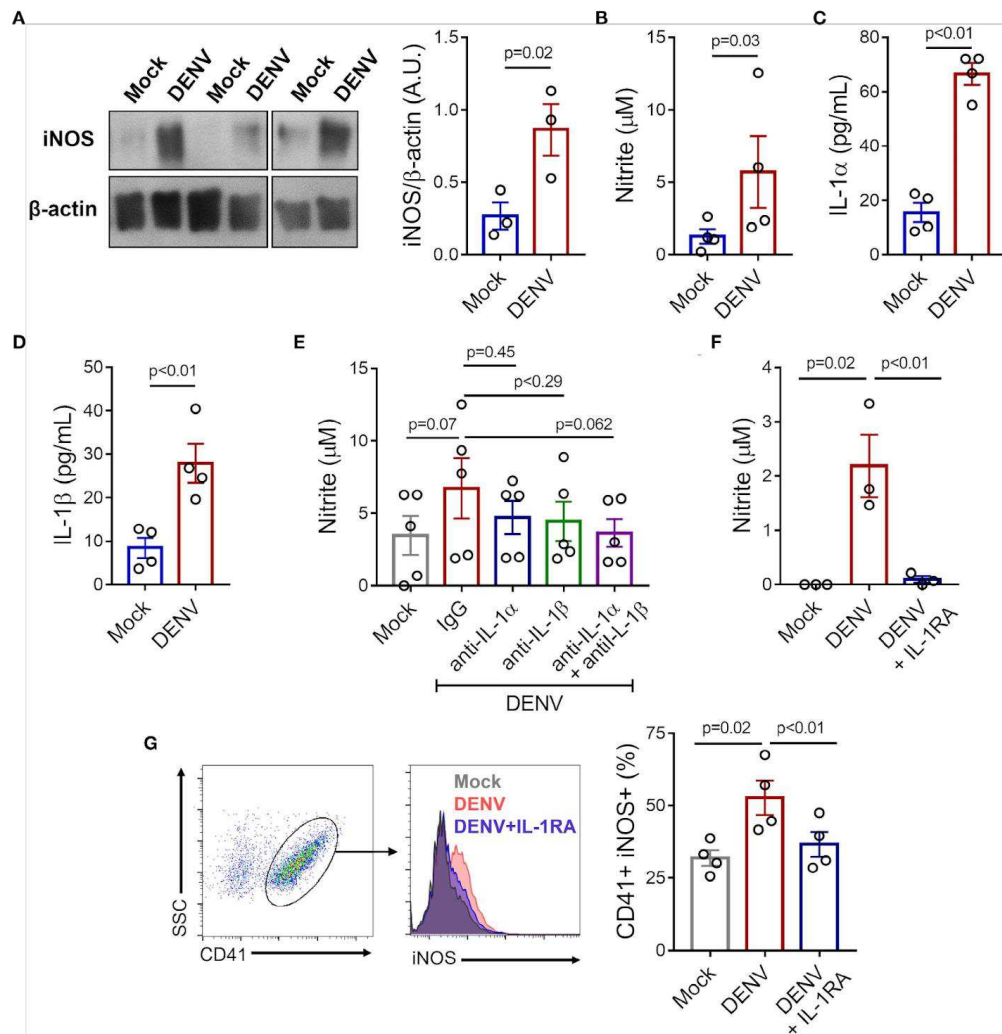
**FIGURE 5**

IL-1 $\beta$  induces iNOS expression and NO production in platelets. Platelets from healthy volunteers were stimulated with 1, 10, 100, and 1000 pg/ml of recombinant human IL-1 $\beta$ . **(A)** The nitrite concentration in the supernatant of platelet in each condition is shown. **(B)** The percent of intracellular iNOS expression in platelets stimulated with 1000 pg/ml of recombinant human IL-1 $\beta$ . The bars represent the mean  $\pm$  SEM of 8 **(A)** or 4 **(B)** independent experiments with platelets from different healthy volunteers. **(C)** Gate strategy and representative histogram of one experiment is shown.

platelets express functional IL-1R (43, 44). However, whether the mechanisms regulating iNOS expression and NO synthesis by platelets involve IL-1 were not clear. Here we show that IL-1 $\beta$  was able to induce iNOS expression and NO production in platelets, and inhibition of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1R significantly reduced virus-induced NO synthesis *in vitro*. Similarly, autocrine signaling of IL-1R has been previously shown in platelets under infectious and pro-coagulant stimulation, amplifying IL-1 $\beta$  secretion and integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 outside-in signaling (43, 45). Our data show that mechanisms involving platelet IL-1 secretion and engagement to IL-1R are also involved in the regulation of platelet function in dengue.

Neves-Souza and colleagues have previously shown DENV infection and iNOS expression in monocytes from dengue patients or from DENV infection *in vitro* (62). Whether platelets are susceptible and permissive to viral infection remains a matter of controversy (63–66). A previous study has demonstrated the presence of DENV RNA and DENV-like structures within platelets from patients (67), suggesting

DENV entry in platelets. Our group and others have confirmed platelets' susceptibility to DENV infection by demonstrating that platelets can bind, internalize and support DENV genome replication and translation into viral proteins, as the number of viral RNA copies and viral proteins accumulate within platelets (29, 65, 66). However, platelets are not able to secrete new viral particles, characterizing an abortive replication (29, 68). Hence, even though platelets are susceptible to DENV infection, they are not permissive to viral replication. Although platelets cannot produce new viral particles, platelets respond to DENV infection promoting platelet activation, aggregation, and secretion of inflammatory mediators, including IL-1 $\beta$  (29, 66, 68). Here we confirm IL-1 $\beta$  and show IL-1 $\alpha$  secretion by platelets in response to DENV *in vitro*. We also show that exposure to DENV induced iNOS expression and NO production by platelets, and highlight mechanisms of regulated iNOS expression through an IL-1-IL-1R autocrine loop. When extrapolating these results to complex systems and *in vivo* disease models we can not exclude the role of paracrine



**FIGURE 6**

DENV induces iNOS expression and NO production in platelets through IL-1R. Platelets from healthy volunteers were stimulated with DENV-2 (MOI= 1) or Mock for 6 hours. **(A)** Expression of iNOS was analyzed by western blot in platelet lysates.  $\beta$ -actin was used as load control. Band densitometry of iNOS expression corrected by  $\beta$ -actin expression is shown (A.U., arbitrary units). **(B-D)** Quantification of **(B)** nitrite **(C)** IL-1 $\alpha$  and **(D)** IL-1 $\beta$  in the supernatant of platelet in each condition. **(E-G)** Platelets from healthy volunteers were infected with DENV-2 in the presence or absence of IL-1RA, anti-IL-1 $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , or isotype-matched control antibody. **(E, F)** Nitrite concentration in the supernatant is shown for each condition. **(G)** The percentage of platelets with intracellular labeling for iNOS after infection with DENV in the presence or absence of IL-1RA. Representative histograms are shown. The bars represent mean  $\pm$  SEM of 3 (panels **(A, F)**), 4 (panels **(B-D, G)**), or 5 (panel **(E)**) independent experiments with platelets from different healthy volunteers.

signaling in this process, since mediators present in plasma from dengue patients were also able to induce iNOS expression and NO synthesis in platelets.

This study has limitations. Since DAF-FM probe may label other nitrogen species besides NO, nitrite present in patient plasma might have influenced platelet labeling in the plasma stimulation assay. However, exposure to dengue plasma also induced iNOS expression in platelets, highlighting the role of signaling molecules in induction of iNOS expression and NO synthesis. In our *in vitro* infection model, DENV induced platelet NO synthesis through IL-1-IL-1R engagement. Despite

compelling evidence generated through pharmacological and immunological approaches, further studies using genetic models will be useful to clarify the importance of these cytokine signaling pathways in regulated expression of iNOS in platelets during dengue. Besides, considering that viremia is correlated with disease severity in dengue, titration of platelet responses to DENV *in vitro* from lower to higher MOI will be useful to better characterize platelet-DENV interaction in the future. Even though we show the contribution of platelets as a source of NO in dengue, we cannot exclude the participation of other cells such as leukocytes and endothelial cells, as well as the



participation of platelet-leukocyte and platelet-endothelial cell interactions in the modulation of NO production. Hence, further studies are required to understand the importance of platelets and other components of the immune system in pathophysiological mechanisms of dengue.

In summary, we describe novel mechanisms of platelet activation in dengue involving IL-1R-mediated NO production. Platelets from dengue patients present increased iNOS expression and NO production, which correlates with disease severity markers including hemorrhage and markers of plasma leakage. While soluble factors present in plasma are able to induce iNOS in platelets, IL-1 $\beta$  levels correlated with NO production by platelets in infected individuals, and IL-1 $\beta$  stimulation reproduced such platelet response *in vitro*. Finally, the blocking of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1R prevented DENV-induced iNOS expression and NO production, demonstrating the role of an autocrine loop through IL-1R signaling in infected platelets. All these cellular events and signaling molecules are potentially involved in NO-dependent pathogenic mechanisms in dengue.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

MP and SR performed most of the experiments, data analyses, and manuscript drafting; AQ-T and JL performed part of the experiments and data analyses; GB-L and CS

performed viral propagation; FB performed clinical study design, patient inclusion, and clinical classification; PB performed clinical study design, experimental design and reviewed the manuscript; and EH performed experimental design, patient inclusion, data analysis, revised the manuscript writing and directed all aspects of the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Instituto Serrapilheira.

## Acknowledgments

The authors thank the Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) from the Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCBio/UFJF) multiuser platform, the multiuser facility in Flow Cytometry at Embrapa Gado de Leite and Wanessa Araújo Carvalho for technical assistance.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

1. World Health O. *Dengue and severe dengue* (2022). Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (Accessed July 27, 2022).
2. Thisyakorn U, Thisyakorn C. DENGUE: GLOBAL THREAT. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (2015) 46 Suppl 1:3–10.
3. Geneva: World Health Organization. *Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: New edition* (2009). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143157/%0A> (Accessed July 27, 2022).
4. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet* (2015) 385(9966):453–65. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9
5. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LCS, et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One* (2012) 7(12):e52215. doi: 10.1371/journal.pone.0052215
6. Zhao L, Huang X, Hong W, Qiu S, Wang J, Yu L, et al. Slow resolution of inflammation in severe adult dengue patients. *BMC Infect Dis* (2016) 16(1):291. doi: 10.1186/s12879-016-1596-x

7. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SMO, Azeredo EL, Nogueira RMR, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* (2008) 8(1):86. doi: 10.1186/1471-2334-8-86
8. Philipp D, Suhr L, Wahlers T, Choi Y-H, Paunel-Görgülü A. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells highly strengthens their potential to promote IL-6-dependent M2b polarization. *Stem Cell Res Ther* (2018) 9(1):286. doi: 10.1186/s13287-018-1039-2
9. Kacimi R, Long CS, Karliner JS. Chronic hypoxia modulates the interleukin-1beta-stimulated inducible nitric oxide synthase pathway in cardiac myocytes. *Circulation* (1997) 96(6):1937-43. doi: 10.1161/01.CIR.96.6.1937
10. Lavnikova N, Laskin DL. Unique patterns of regulation of nitric oxide production in fibroblasts. *J Leukoc Biol* (1995) 58(4):451-8. doi: 10.1002/jlb.58.4.451
11. Geller DA, de Vera ME, Russel DA, Shapiro RA, Nussler AK, Simmons RL, et al. A central role for IL-1 beta in the *in vitro* and *in vivo* regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. *IL-1 beta induces hepatic Nitric Oxide synthesis - PubMed. J Immunol* (1995) 155(10):4890-8. doi: 10.4049/jimmunol.155.10.4890
12. Matsuura C, Moraes TL, Barbosa JB, Moss MB, Siqueira MAS, Mann GE, et al. Nitric oxide activity in platelets of dengue haemorrhagic fever patients: the apparent paradoxical role of ADMA and L-NMMA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2012) 106(3):174-9. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.10.009
13. Marjanovic JA, Stojanovic A, Brovkovich VM, Skidgel RA, Du X. Signaling-mediated functional activation of inducible nitric-oxide synthase and its role in stimulating platelet activation. *J Biol Chem* (2008) 283(43):28827-34. doi: 10.1074/jbc.M801646200
14. Valero N, Espina LM, Añez G, Torres E, Mosquera JA. Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. *Am J Trop Med Hyg* (2002) 66(6):762-4. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.762
15. Mendes-Ribeiro AC, Moss MB, Siqueira MA, Moraes TL, Ellory JC, Mann GE, et al. Dengue fever activates the L-arginine-nitric oxide pathway: an explanation for reduced aggregation of human platelets. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2008) 35(10):1143-6. doi: 10.1111/j.1440-1681.2008.04970.x
16. Thein T-L, Wong J, Leo Y-S, Ooi E-E, Lye D, Yeo TW. Association between increased vascular nitric oxide bioavailability and progression to dengue hemorrhagic fever in adults. *J Infect Dis* (2015) 212(5):711-4. doi: 10.1093/infdis/jiv122
17. Yacoub S, Lam PK, Huynh TT, Nguyen Ho HH, Dong Thi HT, Van NT, et al. Endothelial nitric oxide pathways in the pathophysiology of dengue: A prospective observational study. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am* (2017) 65(9):1453-61. doi: 10.1093/cid/cix567
18. Dib PRB, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Andrade FB, et al. Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. *J Leukocyte Biol* (2020) Vol. 108:1157-82. doi: 10.1002/JLB.4MR0620-701R
19. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* (2001) 12(5):261-73. doi: 10.1080/09537100120068170
20. Gerrard JM, White JG, Rao GH, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am J Pathol* (1976) 83(2):283-98. doi: 10.1016/S0002-9440(14)00477-5
21. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* (1990) 101(2):325-8. doi: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb12709.x
22. Michels M, Alisjahbana B, De Groot PG, Indrati AR, Fijnheer R, Puspita M, et al. Platelet function alterations in dengue are associated with plasma leakage. *Thromb Haemost.* (2014) 112(2):352-62. doi: 10.1160/TH14-01-0056
23. Cloutier N, Paré A, Farndale RW, Schumacher HR, Nigrovic PA, Lacroix S, et al. Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* (2012) 120(6):1334-43. doi: 10.1182/blood-2012-02-413047
24. Zhang Y, Ma KL, Gong YX, Wang GH, Hu ZB, Liu L, et al. Platelet microparticles mediate glomerular endothelial injury in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* (2018) 29(11):2671-95. doi: 10.1681/ASN.2018040368
25. Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* (2013) 122(20):3405-14. doi: 10.1182/blood-2013-05-504449
26. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost.* (2013) 11(5):951-62. doi: 10.1111/jth.12178
27. Ojha A, Nandi D, Batra H, Singhal R, Annarapu GK, Bhattacharyya S, et al. Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Sci Rep* (2017) 7(1):41697. doi: 10.1038/srep41697
28. Trugilho MR de O, Hottz ED, Brunoro GVF, Teixeira-Ferreira A, Carvalho PC, Salazar GA, et al. Platelet proteome reveals novel pathways of platelet activation and platelet-mediated immunoregulation in dengue. Kuhn RJ, editor. *PLoS Pathog* (2017) 13(5):e1006385. doi: 10.1371/journal.ppat.1006385
29. Quirino-Teixeira AC, Rozini SV, Barbosa-Lima G, Coelho DR, Carneiro PH, Mohana-Borges R, et al. Inflammatory signaling in dengue-infected platelets requires translation and secretion of nonstructural protein 1. *Blood Adv* (2020) 4(9):2018-31. doi: 10.1182/bloodadvances.2019001169
30. Sung P-S, Huang T-F, Hsieh S-L. Extracellular vesicles from CLEC2-activated platelets enhance dengue virus-induced lethality via CLEC5A/TLR2. *Nat Commun* (2019) 10(1):2402. doi: 10.1038/s41467-019-10360-4
31. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, de Assis EF, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol* (2014) 193(4):1864-72. doi: 10.4049/jimmunol.1400091
32. Falconar AKI, de Plata E, Romero-Vivas CME. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin m (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccine Immunol* (2006) 13(9):1044-51. doi: 10.1128/CVI.00105-06
33. Shu P-Y, Chen L-K, Chang S-F, Yueh Y-Y, Chow L, Chien L-J, et al. Comparison of capture immunoglobulin m (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* (2003) 10(4):622-30. doi: 10.1128/CDLI.10.4.622-630.2003
34. 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. *J Clin Microbiol* (1992) 30(3):545-51. doi: 10.1128/jcm.30.3.545-551.1992
35. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* (2005) 43(10):4977-83. doi: 10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005
36. Conceição TM, El-Bacha T, Villas-Bôas CSA, Coello G, Ramirez J, Montero-Lomeli M, et al. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect* (2010) 60(1):65-75. doi: 10.1016/j.jinf.2009.10.003
37. Weissman BA, Gross SS. Measurement of NO and NO synthase. *Curr Protoc Neurosci* (1998) 5(1):7.13.1-7.13.22. doi: 10.1002/0471142301.ns0713s05
38. Daibert RM de P, de Biagi Junior CAO, Vieira F de O, da Silva MVGB, Hottz ED, Mendonça Pinheiro MB, et al. Lipopolysaccharide triggers different transcriptional signatures in taurine and indicine cattle macrophages: Reactive oxygen species and potential outcomes to the development of immune response to infections. *PLoS One* (2020) 15(11):e0241861. doi: 10.1371/journal.pone.0241861
39. Gomes RN, Teixeira-Cunha MGA, Figueiredo RT, Almeida PE, Alves SC, Bozza PT, et al. Bacterial clearance in septic mice is modulated by MCP-1/CCL2 and nitric oxide. *Shock* (2013) 39(1) 63-9. doi: 10.1097/SHK.0b013e31827802b5
40. Zhang L, Emu Q, Zhang H, Wang L, Wei Y, Wang H, et al. Goat CCL5 promotes cell viability and inflammatory factors production in lung fibroblasts and macrophages. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* (2022) 259:109389. doi: 10.1016/j.cbpc.2022.109389
41. Yen Y-T, Chen H-C, Lin Y-D, Shieh C-C, Wu-Hsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol* (2008) 82(24):12312-24. doi: 10.1128/JVI.00968-08
42. He D, Kou X, Luo Q, Yang R, Liu D, Wang X, et al. Enhanced M1/M2 macrophage ratio promotes orthodontic root resorption. *J Dent Res* (2015) 94(1):129-39. doi: 10.1177/0022034514553817
43. Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1β autocrine loop. *J Immunol* (2013) 191(10):5196-203. doi: 10.4049/jimmunol.1300354
44. Beaulieu LM, Lin E, Mick E, Koupenova M, Weinberg EO, Kramer CD, et al. Interleukin 1 receptor 1 and interleukin 1β regulate megakaryocyte maturation, platelet activation, and transcript profile during inflammation in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2014) 34(3):552-64. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302700
45. Qiao J, Wu X, Luo Q, Wei G, Xu M, Wu Y, et al. NLRP3 regulates platelet integrin αIIbβ3 outside-in signaling, hemostasis and arterial thrombosis. *Haematologica* (2018) 103(9):1568-76. doi: 10.3324/haematol.2018.191700
46. Bester J, Pretorius E. Effects of IL-1β, IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. *Sci Rep* (2016) 6(August):1-10. doi: 10.1038/srep32188
47. Hottz ED, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Bozza FA, et al. Platelet-leukocyte interactions in the pathogenesis of viral infections. *Platelets* (2022) 33(2):200-7. doi: 10.1080/09537104.2021.1952179



48. Tsai J-J, Jen Y-H, Chang J-S, Hsiao H-M, Noisakran S, Perng GC. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun* (2011) 3(5):530–40. doi: 10.1159/000322904
49. Hottz ED, Quirino-Teixeira AC, Valls-de-Souza R, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelet function in HIV plus dengue coinfection associates with reduced inflammation and milder dengue illness. *Sci Rep* (2019) 9(1):7096. doi: 10.1038/s41598-019-43275-7
50. Lin C-F, Lei H-Y, Shiau A-L, Liu H-S, Yeh T-M, Chen S-H, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol* (2002) 169(2):657–64. doi: 10.4049/jimmunol.169.2.657
51. He W, Yuan T, Maedler K. Macrophage-associated pro-inflammatory state in human islets from obese individuals. *Nutr Diabetes*. (2019) 9(1):36. doi: 10.1038/s41387-019-0103-z
52. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. *Cell* (2021) 184(1):149–68. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.025
53. Burke-Gaffney A, Keenan AK. Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 alpha/beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunopharmacology* (1993) 25(1):1–9. doi: 10.1038/srep32188
54. Davizon-Castillo P, McMahon B, Aguila S, Bark D, Ashworth K, Allawzi A, et al. TNF- $\alpha$ -driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging. *Blood* (2019) 134(9):727–40. doi: 10.1182/blood.2019000200
55. Yamane A, Nakamura T, Suzuki H, Ito M, Ohnishi Y, Ikeda Y, et al. Interferon- $\alpha$ 2b - induced thrombocytopenia is caused by inhibition of platelet production but not proliferation and endomitosis in human megakaryocytes. *Blood* (2008) 112(3):542–50. doi: 10.1182/blood-2007-12-125906
56. Campbell RA, Schwertz H, Hottz ED, Rowley JW, Manne BK, Washington AV, et al. Human megakaryocytes possess intrinsic antiviral immunity through regulated induction of IFITM3. *Blood* (2019) 133(19):2013–26. doi: 10.1182/blood-2018-09-873984
57. Negrotto S, De Giusti CJ, Lapponi MJ, Etulain J, Rivadeneyra L, Pozner RG, et al. Expression and functionality of type I interferon receptor in the megakaryocytic lineage. *J Thromb Haemost*. (2011) 9(12):2477–85. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04530.x
58. Li L, Han DK, Lu J. Interferon-alpha induced severe thrombocytopenia: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* (2010) 16(11):1414–7. doi: 10.3748/wjg.v16.i11.1414
59. Pan P, Zhang Q, Liu W, Wang W, Yu Z, Lao Z, et al. Dengue virus infection activates interleukin-1 $\beta$  to induce tissue injury and vascular leakage. *Front Microbiol* (2019) Vol. 10:2637. doi: 10.3389/fmicb.2019.02637
60. Sa-Ngasang A, Ohashi J, Naka I, Anantapreecha S, Sawanpanyalert P, Patarapotikul J. Association of IL1B -31C/T and IL1RA variable number of an 86-bp tandem repeat with dengue shock syndrome in Thailand. *J Infect Dis* (2014) 210(1):138–45. doi: 10.1093/infdis/jiu042
61. Lien T-S, Sun D-S, Wu C-Y, Chang H-H. Exposure to dengue envelope protein domain III induces Nlrp3 inflammasome-dependent endothelial dysfunction and hemorrhage in mice. *Front Immunol* (2021) Vol. 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.617251
62. Neves-Souza PCF, Azeredo EL, Zagne SMO, Valls-de-Souza R, Reis SRNI, Cerqueira DIS, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute dengue fever in patients and during *in vitro* infection. *BMC Infect Dis* (2005) 5(1):64. doi: 10.1186/1471-2334-5-64
63. Quirino-Teixeira AC, Andrade FB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Hottz ED. Platelets in dengue infection: more than a numbers game. *Platelets* (2022) 33(2):176–83. doi: 10.1080/09537104.2021.1921722
64. Hottz ED, Bozza FA, Bozza PT. Platelets in immune response to virus and immunopathology of viral infections. *Front Med* (2018) 5:121. doi: 10.3389/fmed.2018.00121
65. Simon AY, Sutherland MR, Prydzial ELG. Dengue virus binding and replication by platelets. *Blood* (2015) 126(3):378–85. doi: 10.1182/blood-2014-09-598029
66. Kar M, Singla M, Chandele A, Kabra SK, Lodha R, Medigeshi GR. Dengue virus entry and replication does not lead to productive infection in platelets. *Open Forum Infect Dis* (2017) 4(2):ofx051. doi: 10.1093/ofid/ofx051
67. Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (2009) 40(2):253–62.
68. Chao C-H, Wu W-C, Lai Y-C, Tsai P-J, Perng G-C, Lin Y-S, et al. Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *Kuhn RJ editor. PloS Pathog* (2019) 15(4):e1007625. doi: 10.1371/journal.ppat.1007625

## ANEXO II

## Inflammatory signaling in dengue-infected platelets requires translation

REGULAR ARTICLE



## and secretion of nonstructural protein 1

Anna Cecília Quirino-Teixeira,<sup>1,2</sup> Stephane Vicente Rozini,<sup>1,2</sup> Giselle Barbosa-Lima,<sup>3</sup>Diego Rodrigues Coelho,<sup>4</sup> Pedro Henrique Carneiro,<sup>4</sup>Ronaldo Mohana-Borges,<sup>4</sup> Patrícia T. Bozza,<sup>3</sup> and Eugenio D. Hottz<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Laboratory of Immunothrombosis and <sup>2</sup>Laboratory of Glycoconjugates Analysis, Department of Biochemistry, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brazil;<sup>3</sup>Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; and <sup>4</sup>Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## Key Points

- Recombinant DENV NS1 activates platelets, partially reproducing the inflammatory pathways of DENV-infected platelets.
- DENV-induced platelet activation requires viral genome translation and engagement of NS1 through an autocrine loop.

Emerging evidence identifies major contributions of platelets to inflammatory amplification in dengue, but the mechanisms of infection-driven platelet activation are not completely understood. Dengue virus nonstructural protein-1 (DENV NS1) is a viral protein secreted by infected cells with recognized roles in dengue pathogenesis, but it remains unknown whether NS1 contributes to the inflammatory phenotype of infected platelets. This study shows that recombinant DENV NS1 activated platelets toward an inflammatory phenotype that partially reproduced DENV infection. NS1 stimulation induced translocation of  $\alpha$ -granules and release of stored factors, but not of newly synthesized interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Even though both NS1 and DENV were able to induce pro-IL-1 $\beta$  synthesis, only DENV infection triggered caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  release by platelets. A more complete thromboinflammatory phenotype was achieved by synergistic activation of NS1 with classic platelet agonists, enhancing  $\alpha$ -granule translocation and inducing thromboxane A<sub>2</sub> synthesis (thrombin and platelet-activating factor), or activating caspase-1 for IL-1 $\beta$  processing and secretion (adenosine triphosphate). Also, platelet activation by NS1 partially depended on toll-like receptor-4 (TLR-4), but not TLR-



2/6. Finally, the platelets sustained viral genome translation and replication, but did not support the release of viral progeny to the extracellular milieu, characterizing an abortive viral infection. Although DENV infection was not productive, translation of the DENV genome led to NS1 expression and release by platelets, contributing to the activation of infected platelets through an autocrine loop. These data reveal distinct, new mechanisms for platelet activation in dengue, involving DENV genome translation and NS1-induced platelet activation via platelet TLR4.

## Introduction

Dengue is an arthropod-borne viral disease transmitted by *Aedes* mosquitoes and caused by 1 of 4 dengue virus serotypes (dengue virus-1 [DENV-1] to DENV-4).<sup>1,2</sup> Dengue has become a serious health issue worldwide because of its rapid dissemination, high incidence, and severity.<sup>1</sup> According to the World Health Organization,<sup>3</sup> half of the world's population is at risk of contracting dengue. DENV-infected individuals may manifest as asymptomatic infections or progress to a mild or severe dengue syndrome.<sup>4</sup> Although dengue is self-limiting, patients with severe dengue present life-threatening manifestations including severe vascular leakage, hemorrhage, organ failure, and shock.<sup>4</sup> Thrombocytopenia is a hallmark of dengue, and its prevalence and severity are higher in severe cases.<sup>5</sup>

---

Submitted 30 October 2019; accepted 6 April 2020; published online 11 May 2020. The full-text version of this article contains a data supplement.  
DOI 10.1182/bloodadvances.2019001169. © 2020 by The American Society of Hematology  
For original data, please contact the corresponding author.

12 MAY 2020 x VOLUME 4, NUMBER 9

Even though the precise mechanisms leading to severe dengue are not fully elucidated, proinflammatory cytokines and chemokines contribute to hemodynamic instability and disease severity.<sup>6-8</sup> Platelets from patients with dengue present features of increased activation, which are greater in severe dengue.<sup>9,10</sup> A previous study by our group has

shown that activated platelets from dengue-infected patients or platelets infected with DENV *in vitro* assemble the nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat, and pyrin domain containing-3 (NLRP3)-inflammasome complex, leading to increased secretion of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).<sup>11</sup> In that study, IL-1 $\beta$  synthesis and secretion by platelets correlated with increased vascular permeability, and DENV-infected platelets increased endothelial permeability *in vitro* through the interleukin-1 receptor.<sup>11</sup> Furthermore, platelets from patients with dengue or platelets infected with DENV *in vitro* also express P-selectin and release granule-stored chemokines, amplifying inflammation in dengue.<sup>9,12-16</sup> Nevertheless, infection-triggered inflammatory pathways in platelets are not completely understood.

Recent studies have demonstrated that DENV-infected platelets can replicate the viral genome and to translate it into proteins, including DENV nonstructural protein-1 (NS1).<sup>17,18</sup> NS1 is a glycoprotein that comprises the DENV replication complex together with other NS proteins.<sup>19</sup> Moreover, NS1 is the only NS protein that is secreted into the extracellular milieu.<sup>20</sup> Serum levels of secreted NS1 in patients correlate with severe dengue.<sup>21</sup> Recently, it has been reported that DENV NS1 acts as a viral pathogen-associated molecular pattern that activates toll-like receptor 4 (TLR4) on leukocytes and endothelial cells leading to inflammation and endothelial dysfunction.<sup>22-24</sup> A

recent study has demonstrated that NS1 can also activate platelets, thus initiating prothrombotic responses.<sup>25</sup> However, it remains unknown whether NS1 triggers inflammatory responses in platelets and whether its synthesis and secretion are necessary for the inflammatory phenotype of infected platelets. Our study showed that platelet NS1 translation and secretion drive inflammatory amplification in DENV infection and revealed the mechanisms involved in cytokine synthesis and secretion by DENV- or NS1-activated platelets.

## Material and methods

### Human subjects

Peripheral vein blood was obtained from healthy volunteers, as approved by the Institutional Review Board of Federal University of Juiz de Fora (HU-UFJF, 2.223.542). All participants volunteered by written informed consent before any experimental procedure.

### Platelet isolation

Platelets were isolated as previously described.<sup>11</sup> Blood samples were drawn into acid-citrate-dextrose and centrifuged (200g, 20 minutes) at room temperature. Platelet-rich plasma was recovered, 100 nM of prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>; Cayman 13010) was added, and the platelet-rich plasma was recentrifuged (500g, 20 minutes) to pellet the platelets. Platelets were resuspended in 2.5 mL of phosphatebuffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4)

containing 2 mM EDTA, 0.5% human serum albumin, and 100 nM PGE<sub>1</sub>, and incubated with anti-CD45 tetramers (1:200, 10 minutes), followed by dextran-coated magnetic beads (1:100, 15 minutes) for removal of leukocytes in a magnetic field (human CD45<sup>1</sup> depletion kit; 18259; StemCell). Leukocyte-depleted platelets were resuspended in 25 mL of PSG (5 mM PIPES, 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O, and 5.5 mM glucose; pH 6.8), containing 100 nM PGE<sub>1</sub>, and centrifuged (500g, 20 minutes) at room temperature. Platelets were resuspended in medium 199 (M199; 12-117F; Lonza; or 1155735; Gibco) supplemented with N-2-hydroxyethylpiperazine-N9-2-ethanesulfonic acid (15630-080; Gibco), and the concentration of platelets was adjusted to 10<sup>9</sup>/mL.

### **In vitro platelet stimulation**

Platelets were stimulated with the indicated concentrations of DENV2 NS1 produced in *Escherichia coli* expression system,<sup>26</sup> in SF9 insect cells transfected by using the BaculoDirect expression system (10359-016; Invitrogen), or commercially available NS1 produced in HEK293 cells (ab191866; Abcam), for 1.5 to 3 hours, at 37°C. To eliminate the possibility of LPS contamination, platelets were stimulated with NS1 or LPS (L3129; Sigma) in the presence of polymyxin B (Invivogen).

To investigate the receptors involved in NS1-induced platelet activation, platelets were pretreated (30 minutes) with neutralizing

antibodies (20 mg/mL) against TLR4 (169917-82; eBioscience), TLR2 (6C2; Thermo Fisher), TLR6 (sc-5662; Santa Cruz Biotechnology), TLR4/MD2 (169924-81; eBioscience) or isotypematched IgG, or with TLR6 binding peptide (sc-5662P; Santa Cruz Biotechnology) before NS1 stimulation.

We investigated whether DENV2 NS1 synergizes with classic agonists by stimulating platelets, treated or not with aspirin (100 mM; A5376; Sigma), with NS1 for 2.5 hours and further with suboptimal concentrations of thrombin (0.05 U/mL), platelet activating factor (PAF; 40 nM), oxLDL (5 mg/mL), epinephrine (10 mM), or adenosine triphosphate (ATP; 2 mM) for 30 minutes at 37°C. To evaluate IL-1b secretion by NS1-stimulated platelets, the classic inflammasome trigger ATP (5 mM) was used in addition to NS1.

### **DENV production and purification**

DENV2 strain 16881 was propagated in C6/36 *Aedes albopictus* cells and titrated by plaque assay, as previously reported.<sup>27</sup> DENV2 was purified between 50% and 20% (weight to weight) sucrose

gradient in phosphate-buffered saline, as previously described<sup>28,29</sup> and detailed in the supplemental Methods (supplemental Figure 1).

#### **Platelet infection with DENV2**

Platelets were infected with DENV2 in a multiplicity of infection of 1 (MOI 5 1) and incubated at 37°C. One hour and 30 minutes after infection, platelets were washed 3 times

with M199 to remove unbound viruses. At 3, 6, 12, and 24 hours after infection, platelet pellets and supernatants were recovered for analysis of DENV2 RNA replication, synthesis and secretion of NS1, and platelet activation. To investigate the participation of ATP from dense granules in DENV-induced caspase-1 activation, platelets were treated with 5 mM of the P2X7 antagonist Brilliant Blue G (BBG, B0770; Sigma).

### Flow cytometric analysis

The platelets were labeled with allophycocyanin-, or fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD41, and phycoerythrinconjugated anti-CD62P or anti-CD63 antibodies (BD Pharmingen) and fixed with 4% paraformaldehyde. Isotype-matched IgG conjugated with the same fluorochromes were used as the negative control.

To determine caspase-1 activation, we labeled the platelets with a fluorescent inhibitor of caspase-1 (FAM-YVAD), centrifuged the cells (1000g for 10 minutes), washed the cells 3 times in the supplier's washing buffer, labeled them with anti-CD41 as above, and fixed them according to the manufacturer's instructions (ImmunoChemistry Technologies). Flow cytometer (BD FACSCanto II, BD FACSCalibur, or BD FACSVerse) was used to acquire 10 000 CD41<sup>+</sup> events. Data were further analyzed with FlowJo software.

### Fluorescent LPS competition assay

In order to evaluate NS1 binding to TLR4, platelets were labeled with FITC-conjugated LPS (5 mg/mL) in the presence of NS1 at increasing concentrations (0-50 mg/mL) for 5 minutes at room temperature. A control competition assay was performed between LPS-FITC (5-10 mg/mL) and unconjugated LPS (0-10 mg/mL). Fluorescence was analyzed by flow cytometry.

### 9.2 Western blot analysis

Platelets were subjected to lysis in the presence of a protease inhibitor cocktail (ROCHE), and proteins from cell lysates or platelet supernatants were analyzed through western blot as detailed in the supplemental Material. Primary antibodies used in this study were rabbit anti-NS1 (Invitrogen PA5-32207), rabbit anti-IL-1b (Santa Cruz sc-7884), mouse anti- $\beta$ -actin (Sigma), and rabbit anti-capsid, obtained as previously reported.<sup>30</sup>

### Viral RNA quantification

The DENV-2 RNA was extracted from supernatants or platelet lysates by using QIAamp Viral RNA Mini-Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Quantitative reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with the QuantiNova Probe RT-PCR Kit (Qiagen) on a PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems), as described in the supplemental Methods.

## Statistical analysis

All statistics were performed with GraphPad Prism 7 software. The Shapiro-Wilk test was used to analyze whether numerical variables followed a normal distribution. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare 3 groups and Dunnett's multiple comparison test was used to analyze the differences between the groups. The effect of polymyxin B over the effect of NS1 or LPS was assessed using 2-way ANOVA, and the locations of the differences were identified by Fisher's exact test. Comparisons between 2 groups were performed with the Mann-Whitney U test, for nonparametric distributions, or the Student t test, for parametric distributions.

## Results

### NS1 activates platelets inducing the secretion of stored mediators

To investigate whether DENV NS1 activates platelets, we analyzed P-selectin surface translocation on platelets exposed to recombinant DENV2 NS1 derived from an E coli expression system.<sup>26</sup> Our results showed a significant increase in P-selectin surface expression after 1.5- to 3-hour stimulation (Figure 1A-B). Polymyxin B, an LPS chelator, did not prevent NS1-induced platelet activation (Figure 1C), but did inhibit platelet activation by LPS (Figure 1D).

These data exclude possible activation by contaminating LPS and support NS1-induced platelet activation.

Depending on the stimulus, activated platelets release a wide range of stored or newly synthesized factors.<sup>31-35</sup> Among them, platelet-derived cytokines and chemokines have been linked to vasculopathy and severity in dengue.<sup>8,9,11</sup> Hence, we wanted to investigate the secretory pathways activated in NS1-stimulated platelets. Our results demonstrate that NS1 increased the secretion of the granule-stored chemokines PF4/CXCL4 and RANTES/CCL5 (Figure 2A-B) and the stored inflammatory cytokine MIF (Figure 2C), but not the newly synthesized cytokine IL-1b (Figure 2D). As previously reported,<sup>11</sup> DENV infection induced IL-1b secretion by platelets (Figure 2D). Polymyxin B did not inhibit platelet secretion after NS1 stimulation, but did inhibit LPS-induced PF4/CXCL4 secretion (supplemental Figure 2). Taken together, these results show that DENV2 NS1 activates platelets and induces the secretion of stored chemokines and cytokines.

### NS1 from insect or mammalian cells activates platelets

We showed that recombinant DENV2 NS1 produced in bacteria activates platelets. Moreover, it was recently shown that NS1 expressed by insect cells also induces platelet activation.<sup>25</sup> Considering that the high levels of

NS1 in patients' blood derive from viral replication in host (mammalian) cells, we sought to investigate whether DENV NS1, expressed and folded by mammalian cells, also activates platelets. Therefore, we compared platelets stimulated by E coli-derived NS1 with NS1 produced by insect SF9 or mammalian HEK293 cells. Likewise, NS1 secreted by insect or mammalian cells significantly increased P-selectin surface translocation (Figure 3A). Similarly, platelet stimulation with mammal- or arthropod-derived NS1 increased the secretion of RANTES/ CCL5 and MIF (Figure 3B-C), but not newly synthesized IL-1b (Figure 3D). Infection with DENV activated platelet secretory pathways with release of both stored and newly synthesized cytokines (Figure 3B-D). These data demonstrate that stimulation with NS1 partially reproduces the phenotype of DENV-infected platelets, inducing the release of stored factors, but not newly synthesized IL-1b.

### NS1 induces pro-IL-1b synthesis, but not caspase-1-dependent IL-1b release

As NS1 did not induce IL-1b secretion by platelets, we sought to investigate whether DENV NS1 induces pro-IL-1b synthesis and whether a second signal is necessary for its secretion. To that end, we analyzed IL-1b expression in platelet lysates and supernatants. NS1 induced pro-IL-1b synthesis, even though no increase was observed in IL-1b secretion (Figure 3E-G). To learn whether a second signal

induces IL-1b secretion after NS1 stimulation, we stimulated platelets with NS1 and/or ATP, a classic NLRP3 inflammasome activator.<sup>36,37</sup> Stimulation with NS1+ATP induced IL-1b release by platelets (Figure 3F-G). To confirm inflammasome activation in this condition, we analyzed caspase-1 activity. We observed increased caspase-1 activation in platelets stimulated with ATP, NS1+ATP, or DENV, but not in platelets stimulated with NS1 alone (Figure 3H). These data show that NS1 induces pro-IL1b synthesis in platelets but does not induce caspase-1 activation for IL-1b processing and secretion, whereas DENV infection

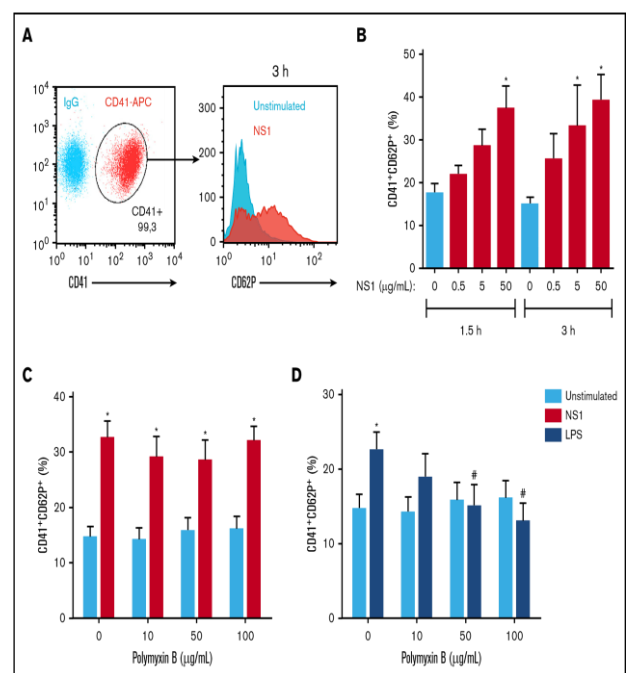


Figure 1. DENV NS1 activates platelets. (A) Gating strategy for analysis of P-selectin (CD62P) expression. Platelets were incubated with 0, 0.5, 5, and 50 mg/mL of NS1 for 1.5 or 3 hours. (C-D) Platelets were stimulated in the presence of 0, 10, 50, or 100 mg/mL polymyxin B. Bars represent mean  $\pm$  standard error of the mean of the unstimulated platelets in the same time frame; #P, .05 between platelets treated or not with polymyxin B. NS1 provides all necessary signals for IL-1b synthesis, caspase-1 activation, and IL-1b release (Figure 3G-H).

We then investigated whether ATP released from dense granules is essential for inflammasome activation in DENV-infected platelets. Labeling of CD63 surface expression, a marker of dense granules release, showed no increase in translocation of dense granules upon DENV infection (Figure 3I). Consistently, pretreatment with the P2X7 inhibitor BBG did not decrease caspase-1 activity in DENV-infected platelets (Figure 3J), excluding ATP-dependent caspase-1 activation.

### DENV NS1 amplifies thromboinflammatory responses induced by classic agonists

We then investigated whether NS1 sensitizes platelets to activation by subthreshold concentrations of classic agonists. As already described, stimulation with NS1 significantly increased platelet activation (Figure 4A). Furthermore, preexposure to NS1 potentiated P-selectin surface translocation after PAF, thrombin, or epinephrine, but not after oxLDL or ATP stimulation (Figure 4A). Similarly, the secretion of MIF was induced by NS1 or classic agonists alone, whereas a synergistic effect was observed with PAF, thrombin, and epinephrine, but not oxLDL (Figure 4B). Similar results were obtained for P-selectin, PF4/CXCL4, and MIF in platelets preexposed to bacteria-derived NS1 (supplemental Figure 3).

To inquire whether DENV NS1 also activates pathways associated with platelet procoagulant responses, we measured thromboxane B<sub>2</sub>

(TXB<sub>2</sub>), a stable metabolite from the prothrombotic eicosanoid TXA<sub>2</sub>. Treatment with NS1 alone did not induce platelet production of TXA<sub>2</sub>, but preexposure to NS1 increased TXA<sub>2</sub> secretion by PAF or thrombin-activated platelets (Figure 4C). We then investigated whether TXA<sub>2</sub> secretion mediates the synergistic action of NS1 with classic agonists. However, treatment with aspirin did not affect platelet activation after NS1 plus thrombin or PAF stimulation, excluding the participation of TXA<sub>2</sub> in this synergistic response. Altogether, these results demonstrate that DENV NS1 potentiates thromboinflammatory responses to classic agonists, increasing platelet secretion of granule-stored factors and TXA<sub>2</sub> synthesis.

### NS1 activates platelets partially depending on TLR4

It has already been demonstrated that DENV

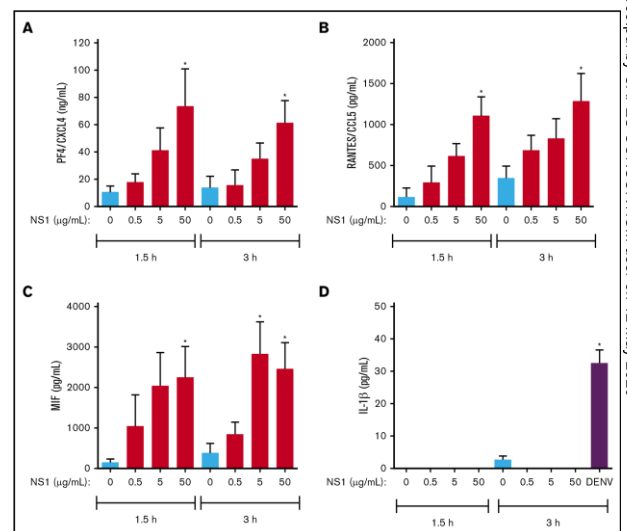


Figure 2. NS1 induces the secretion of granule-stored mediators but not newly synthesized IL-1β. Platelets were stimulated with NS1 (0, 0.5, 5, 50 μg/mL) for 1.5 or 3 hours. Concentrations of the chemokines PF4/CXCL4 (A) and RANTES/CCL5 (B) in platelet supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay. Platelets stimulated with DENV (50 mg/mL) for 3 hours. Bars represent mean ± standard error of the mean of 5 independent experiments. \*P < .05 compared to control.

NS1 activates TLR4 on endothelial cells and leukocytes.<sup>38</sup> Recently, insect cell-derived NS1

was shown to activate platelet TLR4.<sup>25</sup> We therefore investigated whether NS1 from mammalian cells interacts with TLR4 on platelets. We performed a competition assay in which platelets were labeled with fluorescent LPS in the presence of increasing concentrations of mammalian cell-derived NS1. The competition assay showed a decrease in fluorescent LPS binding to platelets incubated with higher concentrations of NS1 (Figure 5A). Similar results were observed in the competition between fluorescent LPS and unlabeled LPS, used as the positive control (Figure 5B). These results demonstrate that DENV NS1 competes with LPS, indicating a strong affinity for TLR4 on platelets.

We then investigated whether NS1 from mammalian cells activates platelets through TLR4 engagement. Blocking TLR4 with neutralizing antibodies partially reduced NS1-induced platelet activation when compared with isotype-matched IgG (Figure 5C). As expected, LPS-induced platelet activation was totally prevented by the same concentration of anti-TLR4 (Figure 5D). The partial inhibition achieved by blocking TLR4 on NS1-activated platelets suggests that NS1 activates additional receptors. It has been demonstrated that DENV NS1 activates leukocytes through TLR2/6 heterodimers.<sup>39</sup> We then investigated whether TLR2 and/or TLR6 participates in NS1-induced platelet activation. Neither TLR2 nor TLR6 neutralizing antibodies or TLR6 blocking

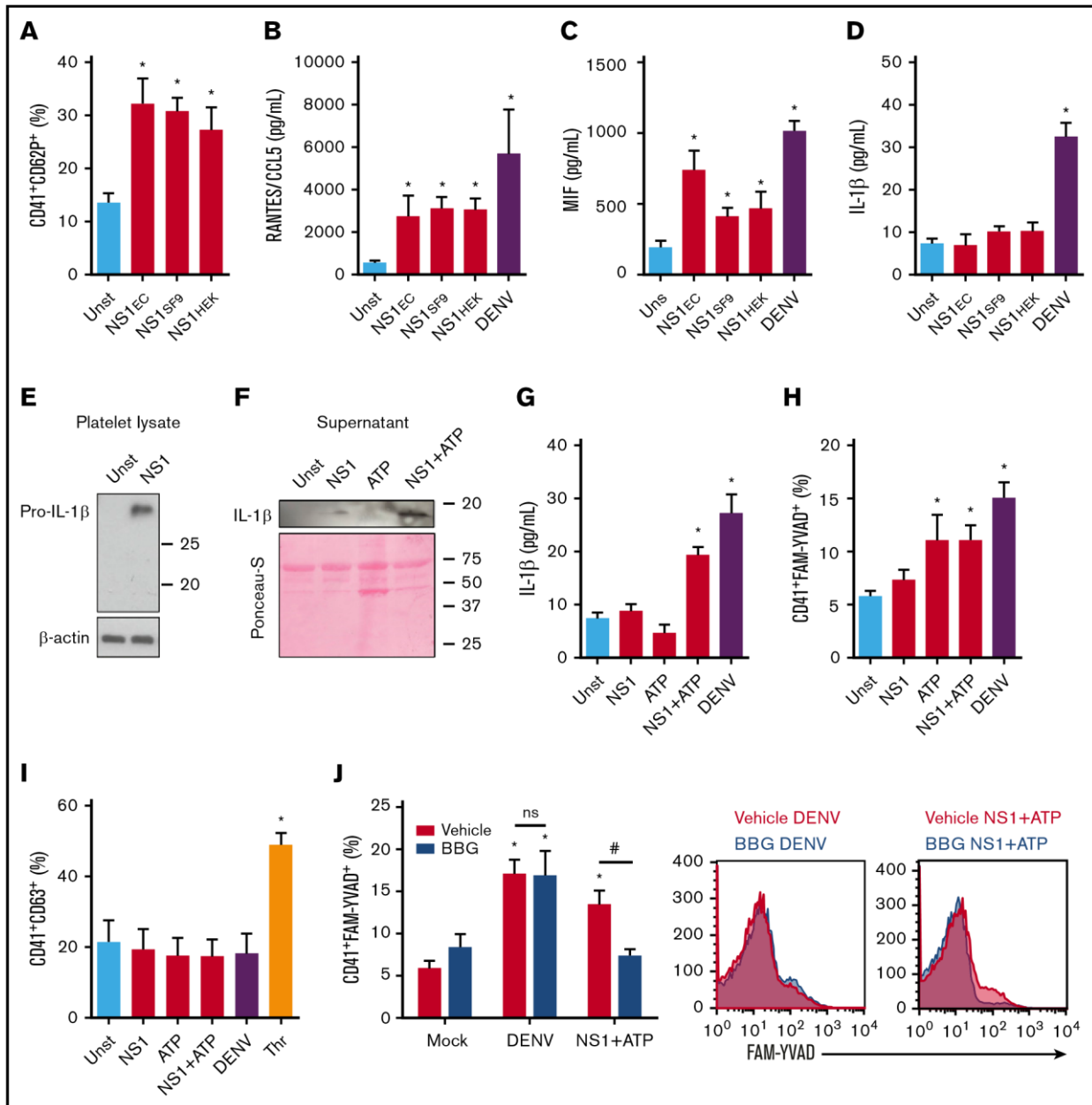
peptide prevented NS1 from activating platelets (Figure 5E-G). Platelet TLR4 activation by LPS is amplified in the presence of serum factors, such as sCD14 and MD2.<sup>31,34,40,41</sup> Similarly, platelet stimulation with NS1 in the presence of autologous serum significantly increased NS1-induced platelet activation (Figure 5H), suggesting the participation of serum factors. We then used antibodies against TLR4/MD2 complex, which inhibits LPS-induced platelet activation.<sup>40</sup> Similar to anti-TLR4 (Figure 5C), anti-TLR4/MD2 partially inhibited NS1-induced platelet activation (Figure 5I). Altogether, these results indicate that NS1 binds and activates platelet TLR4, which is partially responsible for NS1-induced activation.

#### **DENV-infected platelets are activated through an NS1 autocrine loop**

DENV-infected platelets can replicate the DENV genome and translate it into proteins.<sup>17,18</sup> However, even though DENV RNA



Figure



Stimulation with NS1 partially reproduces the inflammatory pathways of DENV-infected platelets. (A-D) Platelets from healthy volunteers were kept unstimulated (Unst) or stimulated with NS1 (5 mg/mL) produced by transfected *E. coli* (NS1<sub>EC</sub>), mammalian HEK cells (NS1<sub>HEK</sub>), or insect SF9 cells (NS1<sub>SF9</sub>) or were infected with DENV (MOI 5 1) for 3 hours. (A) The percentage of P-selectin (CD62P) surface expression on platelets; and the concentrations of RANTES/CCL5 (B), MIF (C), and IL-1β (D) in platelet supernatants were evaluated. (E-I) Platelets were stimulated with NS1 produced in SF9 cells (5 mg/mL) and/or ATP (5 mM) or infected with DENV (MOI 5 1) for 3 hours. The expression of pro-IL-1b and b-actin in platelet lysates (E); the expression of IL-1b in platelet supernatants (F); the concentration of IL-1b in platelet supernatants (G); labeling of active caspase-1 in intact platelets (H); and the percent of platelet CD63 surface expression (I) were evaluated in each condition. Platelets stimulated with thrombin

(Thr, 0.5 U/mL) were used as the positive control for CD63 expression. (J) Platelets were infected with DENV or stimulated with NS1+ATP in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO; vehicle) or BGG. Caspase-1 activity was evaluated in each condition. Bars represent mean ± standard error of the mean of 4 to 10 independent experiments. \**P* < .05 compared with unstimulated; #*P* < .05 between platelets treated with vehicle or BGG. ns, nonsignificant.

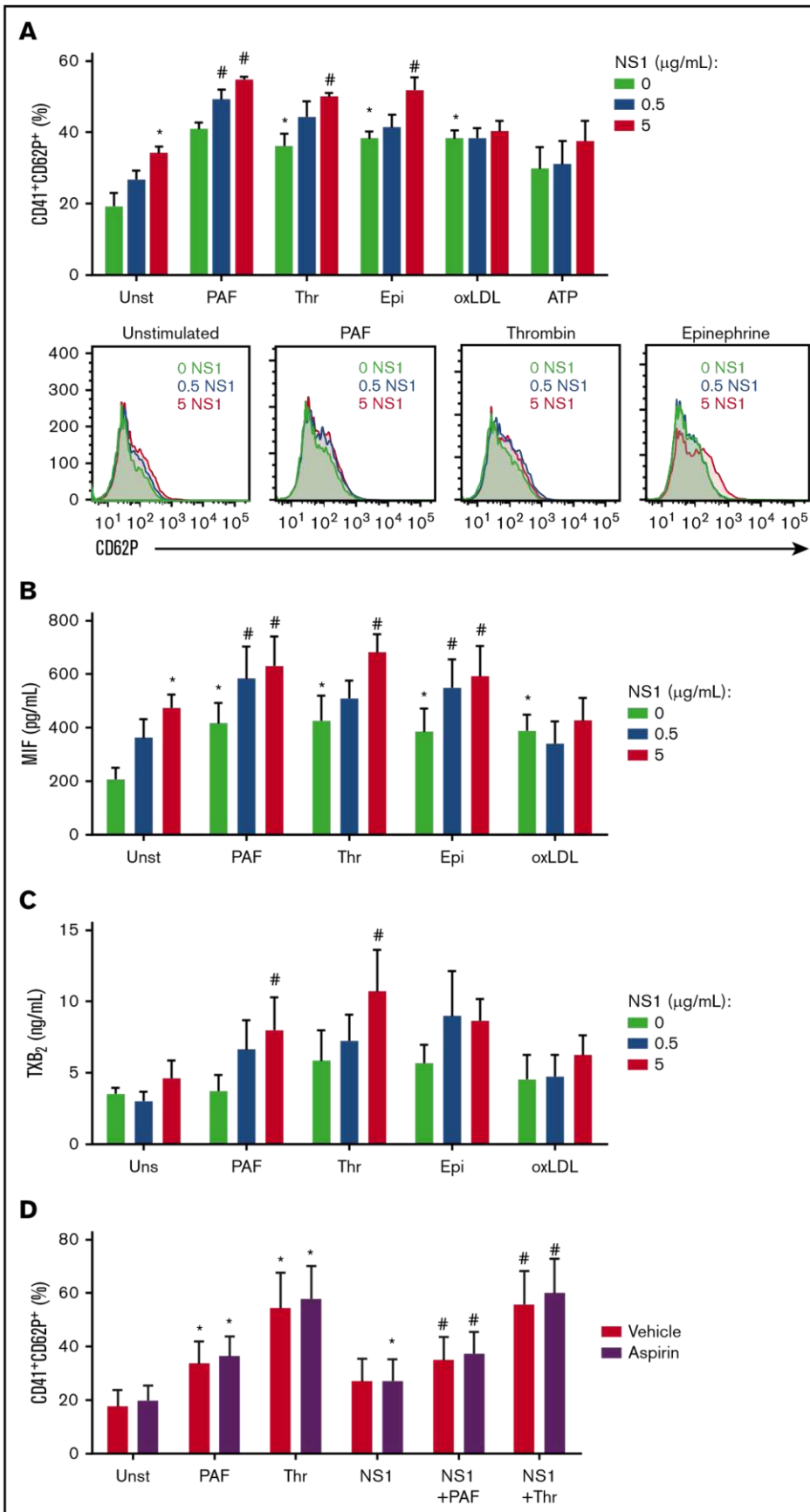
and NS1 accumulate in infected platelets over time, infectious viral particles do not,<sup>17,18</sup> suggesting that platelets sustain an abortive DENV infection. We hypothesized that viral genome translation with secretion of NS1 stimulates infected platelets autocrinally. To

avoid platelet activation by exogenous NS1 in DENV-containing mosquito cell supernatants, we purified DENV particles through a sucrose gradient (supplemental Figure 1). Similar to previous reports,<sup>17,18</sup> our data demonstrate a significant increase in DENV-2 RNA replication

3.

and NS1 protein synthesis in infected platelets over 24 hours of infection (Figure 6A-B). However, we did not detect any increase in viral

RNA in supernatants from infected platelets (Figure 6A), confirming that platelets abortively replicate the virus.



**Figure 4. Preexposure to NS1 amplifies platelet activation by suboptimal concentrations of procoagulant agonists.** Platelets were stimulated with NS1 (0, 0.5, or 5 μg/mL) produced in SF9 cells for 2.5 hours and restimulated with thrombin (0.05 U/mL), PAF (40 nM), oxLDL (5 μg/mL), epinephrine (10 μM), or ATP (2mM) for 30 minutes. (A) The percentage of platelets expressing surface P-selectin (CD62P); and the concentrations of MIF (B) and TXB<sub>2</sub> (C) in platelet supernatants were evaluated. (D) Platelets were pretreated for 30 minutes with aspirin (100 μM) or vehicle, stimulated for 2.5 hours with 5 μg/mL of NS1 produced in SF9 cells, and restimulated for 30 minutes with thrombin (0.05 U/mL) or PAF (40 nM). The percentage of platelets expressing surface P-selectin was evaluated. Bars represent mean ± standard error of the mean of 5 independent experiments. \**P* < .05 compared with unstimulated platelets; #*P* < .05 compared with procoagulant agonists or NS1 alone.





from in vitro–stimulated endothelial cells and intradermally injected mice have evidenced NS1-induced endothelial dysfunction through mechanisms that are both dependent on and independent of cytokines.<sup>24,42,45</sup> NS1 has been shown to induce synthesis of proinflammatory cytokines in leukocytes<sup>38,39,46</sup> and to increase DENV replication in dendritic cells.<sup>46</sup> We extended the evidence that DENV NS1 activates platelets<sup>25</sup> by identifying and analyzing key thromboinflammatory responses in platelets exposed to DENV or NS1. We defined a novel NS1-dependent autocrine signaling mechanism by which DENV genome translation, NS1 secretion, and TLR4 engagement participate in platelet activation and amplify the secretion of proinflammatory mediators.

A recent study reported that insect cell–derived NS1 activates platelets in vitro, increasing aggregation and adhesion.<sup>25</sup> In that study, NS1 depletion from DENV inoculum significantly reduced hemorrhage and thrombocytopenia in infected mice.<sup>25</sup> Even though NS1 from insect cells inoculated into the skin alongside the virus is unlikely to contact and activate platelets in the circulation, it has been proposed that the presence of NS1 in the inoculum enhances DENV spreading and systemic infection.<sup>25,44,47</sup> In mosquitoes, NS1 acquired in a blood meal enhances DENV infection by promoting barrier dysfunction in the midgut.<sup>47</sup> Similarly, NS1 in mosquito saliva may break dermal endothelial barrier integrity, thus increasing DENV spreading and replication in mammal hosts.<sup>44,48</sup>

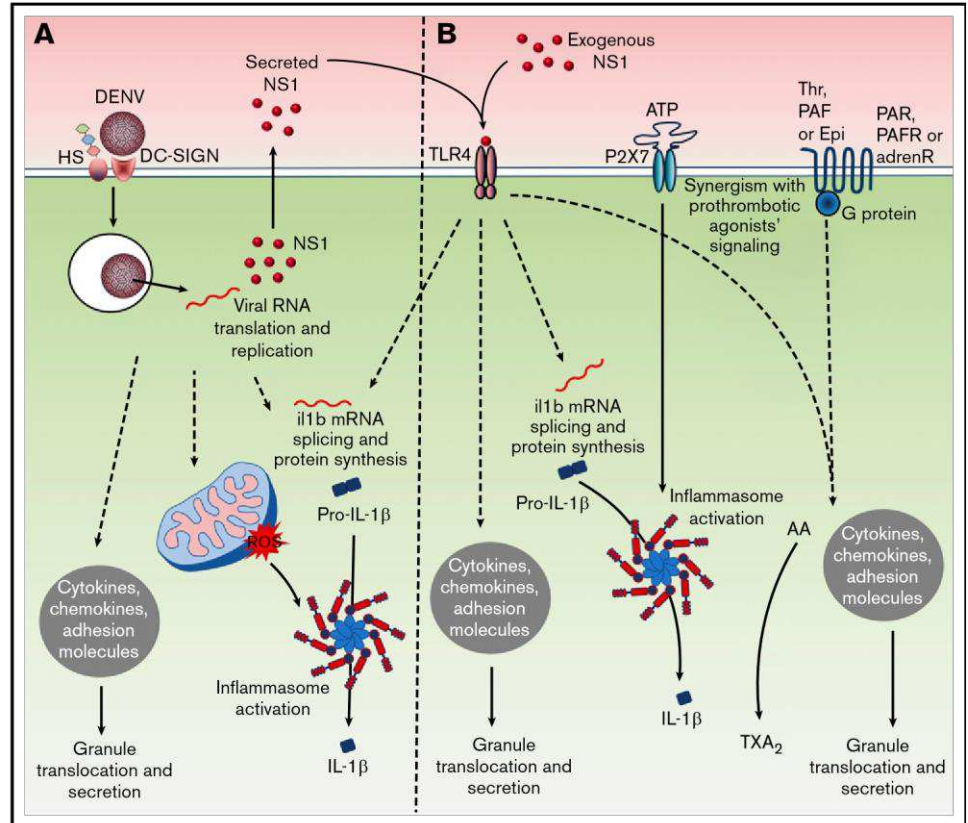
Consistently, immunodepletion of NS1 from DENV inoculum reduces host-derived NS1 antigenemia.<sup>25</sup> Anti-NS1 antibodies generated by platelet activation. In agreement, DENV genome copies in platelets correlate positively with platelet activation in acute dengue infection.<sup>49</sup> A possible mechanism is the recognition of viral RNA by TLR3 or TLR7, which have already been reported in platelets.<sup>51-53</sup> Even though infected platelets translated and replicated the viral genome, they did not release mature viral particles, as evidenced in this and other reports.<sup>17,18</sup> However, we now demonstrate that infected platelets secrete newly synthesized NS1, contributing to platelet activation and inflammatory amplification. We further NS1-



activated platelets, are associated with increased vascular permeability,<sup>6,8,11,59</sup> coagulopathy,<sup>60,61</sup> and mortality<sup>8,62</sup> in dengue.

**Figure 7. Schematic of inflammatory signaling in platelets upon DENV infection and NS1 stimulation.**

(A) DENV infection activates platelets inducing the translocation of granule-stored factors, pro-IL-1 $\beta$  synthesis, and inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  secretion. Platelets support viral genome replication and translation, releasing NS1 to the extracellular space. Secreted NS1 amplifies degranulation and IL-1 $\beta$  synthesis in infected platelets through an autocrine loop. (B) Exogenous NS1 activates platelets through TLR4, leading to translocation and release of stored factors, and to pro-IL-1 $\beta$  synthesis. Synergism with procoagulant agonists potentiates NS1-induced platelet activation, increasing granule secretion (thrombin, PAF, or epinephrine), inducing the synthesis of TXA<sub>2</sub> (thrombin or PAF), or activating inflammasome to trigger IL-1 $\beta$  processing and release (ATP).



NS1 vaccination also reduce viremia in a subsequent DENV challenge.<sup>47</sup> Thus, insect-derived NS1 may lead to increased viremia, NS1 antigenemia, and pathophysiological host responses. In this scenario, higher levels of both DENV and NS1 may contribute to platelet activation and platelet-mediated thromboinflammatory responses, as platelets can be activated by DENV and NS1, independently, as we demonstrated in this study.

We and others have shown increased platelet activation by DENV in vitro.<sup>9-11,18,49,50</sup> Using purified virus, we now confirm DENV-induced platelet activation in the absence of exogenous NS1. Although recent studies have identified the mechanisms of DENV binding and viral protein synthesis in platelets,<sup>17,18</sup> it has remained unknown whether DENV genome translation is essential for DENV-induced platelet activation. We now show that activation of infected platelets involves translation and secretion of NS1. However, blocking secreted NS1 only partially inhibited platelet activation, indicating the existence of additional activating signals. These additional mechanisms may also require viral genome translation, since translational inhibition completely blocked DENV-induced Considering that multiple inflammatory signals coexist during dengue infection in humans, the

synergism between NS1 and classic platelet agonists may be of particular importance. We provide evidence that preexposure to NS1 enhances platelet activation by thrombin, PAF, and epinephrine. Similarly, NS1 was recently

postulate that platelet-derived NS1 activates other immune and vascular cells in dengue.

When compared with DENV infection, NS1 stimulation induces a partial inflammatory phenotype in platelets. Similar to infected platelets, NS1-stimulated platelets release the stored factors PF4, RANTES, and MIF but, in contrast, they do not secrete IL-1 $\beta$ . As in nucleated cells, platelet secretion of IL-1 $\beta$  requires the activation of inflammasome complexes.<sup>11,54-57</sup> As previously shown,<sup>11</sup> DENV infection provides all signals for pro-IL-1 $\beta$  synthesis and secretion in platelets. Considering that other TLR4 agonists, such as LPS, can induce platelet synthesis of IL-1 $\beta$ ,<sup>34,57,58</sup> we hypothesized that NS1 induces pro-IL-1 $\beta$  synthesis and a second signal may promote its secretion. As proof of principle, costimulation with ATP, a classic trigger of NLRP3-inflammasome, induced IL-1 $\beta$  secretion by NS1-activated platelets. Even though NS1 alone did not induce IL-1 $\beta$  secretion, we concluded that it is a major trigger of IL-1 $\beta$  synthesis in DENV-infected platelets, because NS1 neutralization almost completely blocked DENV-induced IL-1 $\beta$  release. IL-1 $\beta$  and MIF, proinflammatory cytokines synthesized and secreted by reported to enhance platelet aggregation by a subthreshold concentration of adenosine

diphosphate.<sup>25</sup> Of note, the agonists that synergized with NS1 by increasing  $\alpha$ -granule release in our experiments were those that activate G protein-coupled receptors. TXA<sub>2</sub> synthesis was also induced by the synergistic action of NS1 with thrombin and PAF, but the release of TXA<sub>2</sub> was not necessary for the amplification of  $\alpha$ -granule release in this model. Patients with dengue present evidence of increased thrombin generation.<sup>60,63-66</sup> Analysis of infected patients, together with in vitro and in vivo experiments, have also evidenced increased production of PAF in dengue.<sup>67-70</sup> As observed with NS1, increased PAF and thrombin generation are associated with severe dengue syndrome.<sup>21,42,64,65,67</sup> We therefore propose that the thromboinflammatory phenotype in platelets from patients with dengue involves a complex set of signals including DENV infection, NS1-TLR4 engagement, and activation by classic prothrombotic agonists.

It is well established that TLR4 participates in recognition and response to NS1 in immune and endothelial cells.<sup>24,25,38,71</sup> A previous publication also reported that NS1 induces leukocyte activation through TLR2/6,<sup>39</sup> but this finding remains controversial.<sup>38,71</sup> In our experiments, NS1-induced platelet activation was partially dependent on TLR4, but did not involve TLR2/6. Another group has also observed a partial effect of TLR4 inhibition on NS1-induced platelet activation.<sup>25</sup> Altogether, these studies indicate that NS1 can activate cellular responses

through other receptors beyond TLR4 that remain to be identified. Consistently, TLR4 knockout mice were not protected from a local increase in vascular permeability after intradermal NS1 injection,<sup>45</sup> even though treatment with a TLR4 antagonist prevented plasma leakage in DENV-infected mice in another study.<sup>38</sup> The latter raises the possibility that other TLR4 agonists participate in dengue pathogenesis, among which circulating cell-free histones<sup>9</sup> and LPS from microbial translocation<sup>72</sup> have already been reported. Additional studies are needed to further elucidate the role of TLR4 in systemic NS1 endotoxemia.

In summary, we describe new mechanisms of platelet activation by DENV involving platelet infection, translation, and secretion of the viral toxin NS1 (Figure 7). DENV-infected platelets support an abortive viral infection, in that they translate and replicate the viral genome but do not release viral replicates. Platelets respond to the infection by translocating and secreting stored factors and also synthesizing IL-1 $\beta$ , which is released through caspase-1-mediated processing. All those infection-driven responses are amplified by a secreted NS1 autocrine loop (Figure 7A). Platelets also respond to exogenous NS1 through TLR4 signaling, leading to granule

## References

1. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453-465.



translocation and IL-1b synthesis, but not inflammasome-mediated IL-1b secretion, which can be achieved by a second signal, such as ATP (Figure 7B). Finally, NS1 synergizes with classic platelet agonists enhancing prothrombotic and proinflammatory platelet responses (Figure 7B). These data provide an integrated view of platelet responses to pathogen- and host-derived agonists. All these cellular events are potentially involved in platelet-mediated inflammation and cytokine-induced pathogenesis in dengue.

## Acknowledgments

The authors thank Guy A. Zimmerman and Matthew T. Rondina for critical review of the manuscript; the multiuser facility in Flow Cytometry at the Jose Henrique Bruschi experimental campus; Embrapa Gado de Leite and Wanessa Araujo Carvalho for technical assistance; and the Laboratorio Integrado de Pesquisa (LIP) from the Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCBio/UFJF) multiuser platform.

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (E.D.H.).

## Authorship

Contribution: A.C.Q.-T. performed most of the experiments, data analyses, and manuscript drafting; S.V.R. performed part of the experiments and data analyses; G.B.-L performed viral propagation, DENV genome quantification, and data analyses; D.R.C. and P.H.C. performed E coli and SF9 cell transformation and NS1 expression and purification; R.M.-B. designed the experiments and reviewed the manuscript; P.T.B. designed the experiments and reviewed the manuscript; and E.D.H. designed the experiments, analyzed the data, wrote the manuscript, and directed all aspects of the study.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: A.C.Q.-T., 0000-0002-4220-3215; S.V.R., 0000-0003-3856-5210; R.M.-B., 0000-0002-1796-475X; P.T.B., 0000-0001-8349-9529; E.D.H., 0000-0002-2201-1742.

Correspondence: Eugenio D. Hottz, Federal University of Juiz de Fora, Institute of Biological Sciences, Department of Biochemistry, Rua Jose Lourenço Kelmer, São Pedro, Juiz de Fora 36036-900,

Brazil; e-mail: eugenio.hottz@icb.ufjf.br.

2. Thisyakorn U, Thisyakorn C. Dengue: global threat. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2015;46(suppl 1):3-10.
3. World Health Organization. Dengue control: what is dengue? <https://www.who.int/denguecontrol/disease/en>. Accessed 18 July 2018.

4. World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Tropical Diseases. Dengue case classification. In: *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. New edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009:10-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762963>. Accessed 1 August 2019.
5. Chaloeuwong J, Tantiworawit A, Rattanathamthee T, et al. Useful clinical features and hematological parameters for the diagnosis of dengue infection in patients with acute febrile illness: a retrospective study. *BMC Hematol*. 2018;18(1):20.
6. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SMO, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*. 2008;8(1):86.
7. Zhao L, Huang X, Hong W, et al. Slow resolution of inflammation in severe adult dengue patients. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):291.
8. Assunção-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J*. 2010;24(1):218-228.
9. de Oliveira Trugilho MR, Hottz ED, Brunoro GVF, et al. Platelet proteome reveals novel pathways of platelet activation and platelet-mediated immunoregulation in dengue. *PLoS Pathog*. 2017;13(5):e1006385.
10. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost*. 2013;11(5):951-962.
11. Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. 2013;122(20):3405-3414.
12. Matsuura C, Moraes TL, Barbosa JB, et al. Nitric oxide activity in platelets of dengue haemorrhagic fever patients: the apparent paradoxical role of ADMA and I-NMMA. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(3):174-179.
13. Michels M, Alisjahbana B, De Groot PG, et al. Platelet function alterations in dengue are associated with plasma leakage. *Thromb Haemost*. 2014; 112(2):352-362.
14. Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009;40(2):253-262.
15. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, et al. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol*. 2014;193(4):1864-1872.
16. Hottz ED, Bozza FA, Bozza PT. Platelets in Immune Response to Virus and Immunopathology of Viral Infections. *Front Med*. 2018;5:121.
17. Kar M, Singla M, Chandele A, Kabra SK, Lodha R, Medigeshi GR. Dengue Virus Entry and Replication Does Not Lead to Productive Infection in Platelets. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4(2):ofx051.
18. Simon AY, Sutherland MR, Prydzial ELG. Dengue virus binding and replication by platelets. *Blood*. 2015;126(3):378-385.
19. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. 2013;98(2):192-208.
20. Thiemmecca S, Tamdet C, Punyadee N, et al. Secreted NS1 Protects Dengue Virus from Mannose-Binding Lectin-Mediated Neutralization. *J Immunol*. 2016;197(10):4053-4065.
21. Libraty DH, Young PR, Pickering D, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002;186(8):1165-1168.
22. Chen H-R, Chuang Y-C, Lin Y-S, et al. Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7):e0004828.
23. Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med*. 2015;7(304):304ra141.
24. Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog*. 2016; 12(7):e1005738.
25. Chao C-H, Wu W-C, Lai Y-C, et al. Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLoS Pathog*. 2019;15(4):e1007625.
26. Allonso D, da Silva Rosa M, Coelho DR, et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. *J Virol Methods*. 2011;175(1):109-116.
27. Conceição TM, El-Bacha T, Villas-Boas CSA, et al. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect*. 2010;60(1):65-75.
28. Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, et al. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol*. 2010;84(21):10999-11009.
29. Sacramento CQ, de Melo GR, de Freitas CS, et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication [published correction appears in *Sci Rep*. 2017;7:46772. *Sci Rep*. 2017;7:40920.
30. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, et al. Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathog*. 2009;5(10): e1000632.
31. Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, et al. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol*. 2012;145(3):189-200.

32. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005;122(3): 379-391.
33. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, et al. Novel anti-bacterial activities of b-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog*. 2011;7(11):e1002355.
34. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol*. 2008;181(5): 3495-3502.
35. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost*. 2015;13(12):2141-2151.
36. Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(23):8067-8072.
37. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(1): 31-40.
38. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med*. 2015;7(304):304ra142.
39. Chen J, Ng MM-L, Chu JJH. Activation of TLR2 and TLR6 by dengue NS1 protein and its implications in the immunopathogenesis of dengue virus infection. *PLOS Pathog*. 2015;11(7):e1005053.
40. Zhang G, Han J, Welch EJ, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol*. 2009;182(12):7997-8004.
41. Damien P, Cognasse F, Eyraud M-A, et al. LPS stimulation of purified human platelets is partly dependent on plasma soluble CD14 to secrete their main secreted product, soluble-CD40-Ligand. *BMC Immunol*. 2015;16(1):3.
42. Chen H-R, Chao C-H, Liu C-C, et al. Macrophage migration inhibitory factor is critical for dengue NS1-induced endothelial glycocalyx degradation and hyperpermeability. *PLOS Pathog*. 2018;14(4):e1007033.
43. Jayathilaka D, Gomes L, Jeewandara C, et al. Role of NS1 antibodies in the pathogenesis of acute secondary dengue infection. *Nat Commun*. 2018;9(1): 5242.
44. Glasner DR, Puerta-Guardo H, Beatty PR, Harris E. The good, the bad, and the shocking: the multiple roles of dengue virus nonstructural protein 1 in protection and pathogenesis. *Annu Rev Virol*. 2018;5(1):227-253.
45. Glasner DR, Ratnasiri K, Puerta-Guardo H, Espinosa DA, Beatty PR, Harris E. Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. *PLOS Pathog*. 2017;13(11):e1006673.
46. Alayli F, Scholle F. Dengue virus NS1 enhances viral replication and pro-inflammatory cytokine production in human dendritic cells. *Virology*. 2016;496: 227-236.
47. Liu J, Liu Y, Nie K, et al. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nat Microbiol*. 2016;1(9):16087.
48. Schmid MA, Glasner DR, Shah S, Michlmayr D, Kramer LD, Harris E. Mosquito saliva increases endothelial permeability in the skin, immune cell migration, and dengue pathogenesis during antibody-dependent enhancement. *PLoS Pathog*. 2016;12(6):e1005676.
49. Ojha A, Nandi D, Batra H, et al. Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. *Sci Rep*. 2017;7(1):41697.
50. Sung P-S, Huang T-F, Hsieh S-L. Extracellular vesicles from CLEC2-activated platelets enhance dengue virus-induced lethality via CLEC5A/TLR2. *Nat Commun*. 2019;10(1):2402.
51. Koupenova M, Vitseva O, MacKay CR, et al. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood*. 2014;124(5):791-802.
52. D'Atri LP, Etulain J, Rivadeneyra L, et al. Expression and functionality of Toll-like receptor 3 in the megakaryocytic lineage. *J Thromb Haemost*. 2015; 13(5):839-850.
53. Koupenova M, Corkrey HA, Vitseva O, et al. The role of platelets in mediating a response to human influenza infection. *Nat Commun*. 2019;10(1):1780.
54. Hottz ED, Monteiro APT, Bozza FA, Bozza PT. Inflammasome in platelets: allying coagulation and inflammation in infectious and sterile diseases? *Mediators Inflamm*. 2015;2015:435783.
55. Vogel S, Arora T, Wang X, et al. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. *Blood Adv*. 2018;2(20):2672-2680.
56. Qiao J, Wu X, Luo Q, et al. NLRP3 regulates platelet integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling, hemostasis and arterial thrombosis. *Haematologica*. 2018; 103(9):1568-1576.
57. Vats R, Brzoska T, Bennewitz MF, et al. Platelet extracellular vesicles drive inflammasome-IL1b-dependent lung injury in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201(1):33-46.
58. Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1b-rich microparticles. *J Immunol*. 2011;186(9):5489-5496.

59. Pan P, Zhang Q, Liu W, et al. Dengue virus M protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce vascular leakage in mice. *J Virol*. 2019;93(21): e00996-19.
60. Suharti C, van Gorp ECM, Setiati TE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost*. 2002;87(1):42-46.
61. Yeh T-M, Liu S-H, Lin K-C, et al. Dengue virus enhances thrombomodulin and ICAM-1 expression through the macrophage migration inhibitory factor induction of the MAPK and PI3K signaling pathways. *PLoS One*. 2013;8(1):e55018.
62. Chen L-C, Lei H-Y, Liu C-C, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(1):142-147.
63. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(6): 840-847.
64. van Gorp ECM, Minnema MC, Suharti C, et al. Activation of coagulation factor XI, without detectable contact activation in dengue haemorrhagic fever. *Br J Haematol*. 2001;113(1):94-99.
65. van Gorp ECM, Setiati TE, Mairuhu ATA, et al. Impaired fibrinolysis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol*. 2002;67(4):549-554.
66. Chagan-Yasutan H, Lacuesta TL, Ndhlovu LC, et al. Elevated levels of full-length and thrombin-cleaved osteopontin during acute dengue virus infection are associated with coagulation abnormalities. *Thromb Res*. 2014;134(2):449-454.
67. Jeewandara C, Gomes L, Wickramasinghe N, et al. Platelet activating factor contributes to vascular leak in acute dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003459.
68. Kamaladasa A, Gomes L, Jeewandara C, Shyamali NLA, Ogg GS, Malavige GN. Lipopolysaccharide acts synergistically with the dengue virus to induce monocyte production of platelet activating factor and other inflammatory mediators. *Antiviral Res*. 2016;133:183-190.
69. Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, et al. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(33):14138-14143.
70. Yang KD, Wang C-L, Shaio M-F. Production of cytokines and platelet activating factor in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis*. 1995;172(2): 604-605.
71. Modhiran N, Watterson D, Blumenthal A, Baxter AG, Young PR, Stacey KJ. Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(5):491-495.
72. van de Weg CAM, Pannuti CS, de Araujo ESA, et al. Microbial translocation is associated with extensive immune activation in dengue virus infected patients with severe disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2236.