

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Anna Cecília Quirino Teixeira

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E SECREÇÃO DE
CITOCINAS EM RESPOSTA À PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1
(NS1) DO VÍRUS DA DENGUE-2**

JUIZ DE FORA

2019

ANNA CECÍLLIA QUIRINO TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E SECREÇÃO DE
CITOCINAS EM RESPOSTA À PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1)
DO VÍRUS DA DENGUE-2**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Eugenio Damaceno Hottz

JUIZ DE FORA

2019

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

Teixeira, Anna Cecília Quirino.

Avaliação da ativação plaquetária e secreção de citocinas em resposta à proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus da Dengue-2 / Anna Cecília Quirino Teixeira. -- 2019.

73 f. : il.

Orientador: Eugenio Damaceno Hottz

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Vírus da dengue. 2. Ativação plaquetária. 3. NS1. 4. Citocinas pró-inflamatórias. 5. Replicação viral. I. Hottz, Eugenio Damaceno, orient. II. Título.

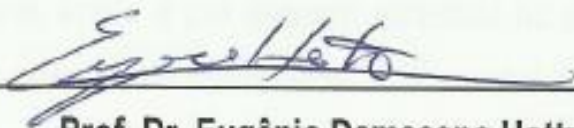
ANNA CECÍLIA QUIRINO TEIXEIRA

**Avaliação da ativação plaquetária e secreção de citocinas em resposta à
proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus da Dengue-2**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 07 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Eugênio Damaceno Hottz

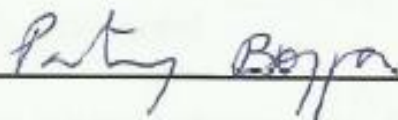
Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Jacy Gameiro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr.ª Patricia Torres Bozza Viola

FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e abençoado durante todo o caminho.

Ao Prof. Dr. Eugenio, pelos ensinamentos, pela orientação e pela atenção que demonstrou comigo durante esse tempo. Agradeço também ao Prof. Jair e à prof. Valquíria, por terem aberto as portas do laboratório para que eu pudesse realizar meus experimentos.

Aos meus amigos do laboratório de Glicoconjugados, Tayná, Stephane, Laís, Arthur, Julinha, Lívia e Mariana, pela paciência e por tornarem esse caminho mais leve e prazeroso. Agradeço à Laura por toda a ajuda e pela cía nas diversas idas à FIOCRUZ. Vocês foram essenciais! A Paula e ao Ari, por toda a ajuda e pela paciência em todos os momentos. Muito obrigada!

A minha mãe, Ana Paula, pela atenção, carinho, amor e compreensão. Ao meu pai, André, pelo carinho, apoio e por sempre acreditar no meu potencial. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, amo vocês! A minha irmã, Anna Carla, por fazer meus dias mais felizes. Obrigada pelos momentos de descontração e também pelas impicâncias, que são muito importantes pra mim. Amo você!

Aos meus amigos Renata, Anselmo, Aline, Natalia, Guilherme, Flaviane, Nathália, Sandra e Hariane, por me apoiarem em todos os momentos e não deixarem que eu desista e também pelos incontáveis momentos de risada. Agradeço por serem os melhores amigos que eu poderia ter.

Aos meus primos Raphaella e Juninho, e a toda a minha família, por estarem sempre comigo. Amo vocês!

Aos amigos que o intercâmbio me deu, Elisa, Júlia, Léo e especialmente às minhas lindas, Isa e Maressa. O que o CsF uniu, a distância não separa! E as minhas amigas Michelle, Juliana e Carol, que mesmo longe ainda estão comigo por todos esses anos.

Aos colaboradores da FIOCRUZ, Patrícia T. Bozza e Giselle Lima, e aos colaboradores da UFRJ, professor Dr. Ronaldo Mohana-Borges e Diego Rodrigues Coelho. Agradeço também aos colaboradores do Laboratório de Biologia Celular, Prof^{as}. Dr^{as}. Patrícia Elaine, Heloísa D`ávila e Rossana Melo, e do Departamento de

Imunologia, Prof^s. Henrique Teixeira, Jacy Gameiro e Gilson Macedo, por abrirem as portas do laboratório e disponibilizarem equipamentos para que pudéssemos realizar os experimentos. Aos professores Prof^a. Dr^a. Patrícia Elaine e Prof. Dr. Henrique Teixeira também agradeço pela avaliação crítica e sugestões durante minha qualificação, contribuindo para o melhor desenvolvimento deste trabalho.

E à equipe do Laboratório Integrado de Pesquisa, Míriam Franco e Bárbara Penido, pela utilização dos equipamentos por diversas vezes, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

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

RESUMO

A dengue é uma doença causada pelo vírus da dengue (DENV), composto por 4 sorotipos, sendo transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, principalmente. Alguns pacientes podem desenvolver uma forma grave da doença, chamada de dengue grave, caracterizada por extravasamento vascular, hemorragia grave e falência dos órgãos. Inflamação exacerbada com concentrações elevadas de citocinas inflamatórias contribuem para o extravasamento vascular e a gravidade da dengue. Estudos recentes demonstraram altos níveis da proteína não estrutural 1 (NS1) do DENV no sangue dos pacientes com dengue grave. A NS1 está relacionada à interação com TLR4 em macrófagos, induzindo a secreção de mediadores inflamatórios, e à ruptura do endotélio vascular, contribuindo para o extravasamento vascular. Apesar de a interação da NS1 com macrófagos e células endoteliais já ter sido demonstrada, sua habilidade em ativar plaquetas ainda é desconhecida. Nesse estudo, plaquetas de voluntários saudáveis foram estimuladas com NS1 do DENV2 recombinante e a resposta plaquetária foi avaliada por citometria de fluxo e ELISA. Nós observamos que a NS1 do DENV2 recombinante produzida em *E. coli* aumentou a ativação plaquetária, indicada pela expressão da P-selectina (CD-62P) na superfície. Nossos resultados indicam que a NS1 aumenta a secreção das quimiocinas RANTES/CCL5 e PF4/CXCL4 e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e MIF. Contudo, não houve aumento nos níveis da citocina antiinflamatória TGF- β . O pré-tratamento com polimixina B não afetou a habilidade da NS1 em induzir a translocação da P-selectina e secreção de citocinas, indicando ausência de contaminação por LPS. Além disso, pré-exposição a NS1 potencializou a ativação plaquetária e secreção de quimiocinas em resposta a uma concentração sub-ótima de trombina. As plaquetas também foram estimuladas com NS1 produzida em células HEK e os resultados obtidos demonstraram um aumento na expressão superficial de P-selectina, confirmando os dados anteriores de que a NS1 do DENV2 promove ativação plaquetária. Posteriormente, plaquetas de voluntários saudáveis pré-tratadas com anticorpos neutralizantes anti-TLR4 ou IgG inespecífica foram estimuladas com NS1 produzida em células HEK. Nossos resultados demonstram que a NS1 ativa plaquetas parcialmente através do receptor TLR4. Finalmente, nós demonstramos que plaquetas infectadas com DENV além de replicarem o RNA viral, são capazes de traduzir o genoma do vírus, sintetizando NS1. No entanto, nossos resultados mostram que as plaquetas não secretam partículas virais, indicando que o ciclo de replicação do vírus não é completo. Apesar dessa replicação abortiva, as plaquetas são capazes de secretar a NS1, que pode agir como um PAMP induzindo respostas imuno-inflamatórias. Nossos dados demonstram que NS1 do DENV2 é capaz de ativar plaquetas, induzindo a secreção de mediadores inflamatórios. Somado a isso, NS1 do DENV2 potencializa a ativação plaquetária pela trombina, sugerindo uma intensificação da resposta tromboinflamatória. Nossos resultados indicam que as plaquetas não só respondem a NS1 exógena como também são fontes de NS1 durante a infecção pelo DENV. Em conjunto, estes eventos podem potencialmente contribuir para a patogênese da dengue.

Palavras-chave: Vírus da dengue. Ativação plaquetária. NS1. Citocinas pró-inflamatórias. Replicação viral.

ABSTRACT

Dengue is a disease caused by dengue virus (DENV), composed by 4 serotypes, and transmitted mostly by *Aedes aegypti* mosquitos. Some patients may develop a severe form of the disease, called severe dengue, characterized by vascular leakage, severe hemorrhage and organ failure. High concentrations of inflammatory cytokines in the blood of dengue patients contribute to vascular leakage and dengue severity. Recent studies have shown high plasma levels of the non-structural protein 1 (NS1) in the blood of dengue patients. NS1 has been related to interaction with TLR4 on macrophages, inducing the secretion of proinflammatory mediators, and to the disruption of the vascular endothelium, contributing to vascular leakage. Although interactions of NS1 with macrophages and endothelial cells have already been demonstrated, its ability to activate platelets is still unclear. Platelets from healthy volunteers were stimulated with recombinant DENV-2 NS1 produced in *E. coli* and platelet responses evaluated by flow cytometry and ELISA. We observed that DENV-2 NS1 increased platelet activation as indicated by P-selectin surface expression. Our results indicate that NS1 increases the secretion of the chemokines RANTES/CCL5 and PF4/CXCL4 and the proinflammatory cytokines IL-1 α and MIF. However, there was no increase in the levels of the anti-inflammatory cytokine TGF- β . Treatment with polymixin B did not affect the ability of NS1 to induce P-selectin translocation and cytokine secretion, indicating the absence of LPS contamination. In addition, pre-exposure to NS1 potentiated platelet activation and chemokine secretion in response to a suboptimal concentration of thrombin. Platelets were also stimulated with recombinant NS1 produced in HEK cells and the results show a similar increase in the surface expression of P-selectin, confirming previous data in which DENV2 NS1 promotes platelet activation. Furthermore, platelets from healthy volunteers were incubated with anti-TLR4 neutralizing antibodies or control IgG and then stimulated with NS1 produced in HEK cells. Our data shows that NS1 activates platelets partially depending on TLR4. Finally, we demonstrated that DENV-infected platelets replicated viral RNA, as quantified by qPCR, and also expressed and secreted NS1, as detected by western blot of pellets and supernatants of infected platelets. However, although DENV2-infected platelets are not able to secrete viral particles, promoting abortive replication, they secrete NS1, which may act as a PAMP inducing immune-inflammatory responses. Our data demonstrate that DENV NS1 is capable of activating platelets inducing the release of pro-inflammatory mediators. Besides, DENV NS1 potentiates platelet activation by thrombin, suggesting an intensification of the thromboinflammatory response. Our data also indicate that platelets not only respond to exogenous NS1 but also are a source of NS1 during DENV infection.

Keywords: Dengue virus. Platelet activation. NS1. Proinflammatory cytokines. Viral replication.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial dos casos de dengue entre 2010 e 2016.	15
Figura 2. Distribuição dos casos de dengue no Brasil, por região, no ano de 2016.	17
Figura 3. Representação esquemática da estrutura e genoma do DENV.	18
Figura 4. Representação esquemática do ciclo de replicação do DENV.	22
Figura 5. Sinais de alarme e critérios para dengue grave.	23
Figura 6. Aspectos clínicos durante o curso da dengue.	24
Figura 7. Representação esquemática do envolvimento das plaquetas na resposta imune.	29
Figura 8. Mecanismos e agonistas para ativação plaquetária via TLR4.	31
Figura 9. Porcentagem de plaquetas expressando P-selectina (CD62P ⁺) após estímulo com NS1 do DENV2.	41
Figura 10. DENV2 NS1 ativa plaquetas de maneira independente de LPS.	42
Figura 11. Plaquetas estimuladas com NS1 do DENV2 secretam mediadores inflamatórios estocados em grânulos.	44
Figura 12. Plaquetas de voluntários saudáveis estimuladas com NS1 do DENV2 ou LPS, na presença ou ausência de Polimixina B.	45
Figura 13. Pré-exposição a NS1 potencializa a ativação plaquetária por concentração sub-ótima de trombina.	47
Figura 14. NS1 ativa plaquetas parcialmente via TLR4.	48
Figura 15. Plaquetas replicam o DENV2 de maneira abortiva.	49
Figura 16. Esquema representativo da ativação plaquetária com NS1 do DENV2 e replicação abortiva do DENV2 em plaquetas.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACD – Anticoagulante contendo ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose;
- ADE – Amplificação dependente de anticorpo;
- 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 – Padrão molecular associado a dano;
- DC-SIGN – Não-integrina acoplada a ICAM-3 específica de célula dendrítica;
- DENV – Vírus da dengue;
- DENV-2 AS – Genótipo Sudeste Asiático do DENV-2;
- DF – Febre do dengue;
- DHF – Febre hemorrágica do dengue;
- DSS – Síndrome do choque do dengue;
- 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 embryonic kidney cells*)

HMEC – células endoteliais da microvasculatura humana (do inglês *Human microvasculature endothelial cells*)

HLA – Antígeno leucocitário humano;

HSA – Albumina de soro humano;

ICAM – Molécula de adesão intercelular;

IL – Interleucina;

LPS – Lipopolissacarídeo;

M – Proteína da membrana viral;

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade;

MIF – Fator inibidor da migração de macrófagos;

MS – Ministério da Saúde;

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;

OPAS – Organização Panamericana de Saúde;

PAMP – Padrão molecular associado a patógeno;

PBS – Tampão fosfato e salina;

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico;

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaqueta;

PGE1 – Prostaglandina E1;

PF – Fator plaquetário;

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;

qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativo;

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

RNA – Ácido Ribonucleico;

SHU – Síndrome hemolítica urêmica

TBS – Tampão Tris e salina;

TGF – Fator de crescimento e transformação;

TNF – Fator de necrose tumoral;

VEGF – Fator de crescimento de endotélio vascular;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Epidemiologia	14
2.2 Agente etiológico	17
2.3 Ciclo de replicação	20
2.4 Aspectos clínicos	22
2.5 Patogênese da dengue	24
2.6 Plaquetas como células do sistema imune	28
2.7 Hipótese e justificativa	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
5 RESULTADOS	40
5.1 NS1 do DENV2 ativa plaquetas	40
5.2 NS1 do DENV2 ativa plaquetas de maneira independente de LPS	41
5.3 NS1 do DENV2 estimula a secreção de mediadores pró-inflamatórios estocados em grânulos	43
5.4 Pré-exposição a NS1 potencializa ativação plaquetária por concentração sub-ótima de trombina	46
5.5 NS1 do DENV2 ativa plaquetas parcialmente via TLR4	47
5.6 Plaquetas replicam o DENV2 de maneira abortiva e secretam NS1 para o meio extracelular	48
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma arbovirose transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente a espécie *A. aegypti* (GUZMAN; HARRIS, 2015). O vírus da dengue pertence à família Flaviviridae, gênero Flavivirus e é classificado em quatro sorotipos – DENV 1 a 4 – os quais são antígenicamente distintos (THISYAKORN; THISYAKORN, 2015; TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013). A dengue é uma doença viral transmitida por mosquitos com grande capacidade de disseminação, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial (OMS, 2018). De acordo com a OMS (2018), cerca de metade da população mundial apresenta risco de contrair a infecção. Ainda assim, muitos países deixam de notificar os casos de dengue, como é o caso de países da África sub-saariana e da região do mediterrâneo (OMS, 2016). Isso pode ser devido a não disponibilidade de testes diagnósticos no continente, falta de conhecimento dos profissionais de saúde a respeito da doença, cobertura precária do sistema de saúde ou ao diagnóstico clínico incorreto, em regiões endêmicas para outras doenças febris como a malária (AMARASINGHE et al., 2011; PETTI et al., 2006). O Brasil é o país com o maior número de casos notificados no mundo inteiro (TEIXEIRA et al., 2009), o que pode ser explicado pela existência de sistema de notificação, além de fatores como períodos de chuva, temperatura elevada na maior parte do ano, além de crescimento desordenado dos centros urbanos (BARCELLOS; LOWE, 2014). Estes fatores contribuem para a proliferação do mosquito vetor e disseminação da doença.

Inicialmente, a OMS classificava os casos de dengue em febre do dengue (DF), febre hemorrágica do dengue (DHF) e síndrome do choque do dengue (DSS). A DHF era caracterizada por febre elevada, hepatomegalia, hemorragia e extravasamento vascular, sendo dividida em quatro níveis de gravidade (I – IV) (OMS, 1997; 2011). Os níveis III e IV caracterizam a DSS, na qual o paciente apresenta choque e pode evoluir para óbito (TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013). Os quadros de DHF/DSS eram comuns em crianças menores de 15 anos em países do sudeste asiático (OMS, 2011). Contudo, a introdução do DENV em regiões que não tinham contato prévio com o vírus ocasionou a infecção de populações adultas, as quais apresentavam aspectos clínicos distintos que não se

enquadravam na classificação DHF/DSS, uma vez que esta classificação se baseava em infecções pelo DENV em crianças tailandesas (HADINEGORO, 2012; OMS, 2009). Houve então a necessidade de implantação de uma nova classificação (HADINEGORO, 2012; OMS, 2009). De acordo com a nova classificação, as infecções pelo vírus da dengue podem ser assintomáticas, apresentar quadros brandos ou evoluir para dengue grave (MS, 2016; OMS, 2009). Os quadros de dengue branda são divididos em dengue sem sinais de alarme e dengue com sinais de alarme (OMS, 2009). Os sinais de alarme incluem dor abdominal, vômitos, acúmulo de líquido, hipotensão postural, hepatomegalia superior a 2 cm, hemorragia de mucosas, letargia/irritabilidade, e aumento do hematócrito juntamente com redução da contagem de plaquetas (OMS, 2009). Durante a dengue grave podem ser observados um ou mais sinais clínicos de aumento do extravasamento vascular grave, hemorragia grave ou danos aos órgãos, podendo levar o paciente ao choque e óbito (CHEN; NG; CHU, 2015; OMS, 2009). Apesar da nova classificação, alguns artigos ainda utilizam a classificação em DHF/DSS. Sendo assim, nós abordaremos os resultados obtidos em cada estudo respeitando a classificação utilizada pelos autores.

Estudos demonstraram altos níveis da proteína não estrutural 1 (NS1) em pacientes com DHF em relação aos pacientes com DF, relacionados a elevada viremia (LIBRATY et al., 2002). Somado a isso, um trabalho realizado por Paranavitane e colaboradores (2014) mostrou que a positividade para NS1 no sangue de pacientes com dengue está associada ao risco de evolução para dengue grave. Este estudo também mostrou uma correlação negativa entre os níveis de NS1 e a contagem de leucócitos, demonstrando novamente o risco de evolução para dengue grave, uma vez que a leucopenia, quando associada a rápido declínio da contagem de plaquetas, já foi associada ao extravasamento vascular (KALAYANAROOJ et al., 1997). Além disso, a NS1 secretada atua como um PAMP, interagindo com células do endotélio vascular, macrófagos e células dendríticas, ocasionando a secreção de mediadores inflamatórios e ruptura do endotélio vascular (ADIKARI et al., 2016; ALAYLI; SCHOLLE, 2016; MODHIRAN et al., 2015). Porém, ainda não se tem conhecimento a respeito da interação da NS1 com as plaquetas.

O elevado extravasamento vascular durante a dengue grave está associado à intensidade da resposta imune do hospedeiro contra o vírus da dengue,

com secreção elevada de citocinas pró-inflamatórias (PANG; CARDOSA; GUZMAN, 2007). O DENV é capaz de infectar linfócitos, células dendríticas, macrófagos, monócitos, hepatócitos e células endoteliais (BALSITIS et al., 2009; CHEUNG et al., 2018; JESSIE et al., 2004; PERDOMO-CELIS; SALGADO; NARVÁEZ, 2017), levando à intensa secreção de mediadores inflamatórios (CHEN; NG; CHU, 2015; REIS et al., 2007). Estudos já demonstraram a presença de altos níveis de citocinas e quimiocinas, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-13, IL-10, IL-18, RANTES, em pacientes com dengue grave, sugerindo sua contribuição para a patogênese da doença (BOZZA et al., 2008; JUFFRIE et al., 2000; KITTIGUL et al., 2000; MUSTAFA et al., 2001; VAN DE WEG et al., 2013). Outros estudos já demonstraram maior ativação de plaquetas de pacientes com dengue, ocasionando a secreção de fatores pró-inflamatórios, como óxido nítrico, quimiocinas (RANTES/CCL5 e PF4/CXCL4), citocinas (IL-1 β) e expressão de moléculas de adesão (P-selectina) (HOTTZ et al., 2014; MATSUURA et al., 2012; MICHELS et al., 2014; NOISAKRAN et al., 2009; TRUGILHO et al., 2017). Outrossim, pacientes com dengue grave apresentam níveis aumentados de plaquetas ativadas em relação aos pacientes com dengue branda (TRUGILHO et al., 2017). Além da secreção de mediadores inflamatórios, as plaquetas ativadas também podem interagir com outras células do sistema imune, como neutrófilos e monócitos, amplificando a resposta inflamatória e contribuindo para a patogênese da doença (CLARK et al., 2007; HOTTZ et al., 2014). Assim, plaquetas ativadas podem ser fatores importantes no desenvolvimento da dengue grave, seja pela secreção de mediadores inflamatórios ou pela interação com outras células do sistema imune. Contudo, os mecanismos responsáveis pela ativação plaquetária na dengue ainda não estão totalmente elucidados. Com este estudo, pretendemos avaliar o papel da NS1 do DENV na ativação plaquetária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A dengue é uma doença endêmica em países tropicais, afetando principalmente centros urbanos e periferias (OMS, 2018) (Figura 1). A incidência desta doença teve um aumento de 30 vezes nos últimos 50 anos, tendo rapidamente se tornado uma pandemia e, conseqüentemente, um sério problema de saúde pública devido à alta capacidade de disseminação, alta incidência dos casos e também à gravidade da infecção (GUZMAN; HARRIS, 2015; OMS, 2016). De acordo com estudos recentes, cerca de 390 milhões de novos casos ocorrem anualmente, dos quais 96 milhões apresentam manifestações clínicas (BHATT et al., 2013). Além disso, estima-se que 3,97 bilhões de pessoas estejam sob risco de infecção em 128 países, dentre eles 36 países que inicialmente eram considerados livres do vírus (BRADY et al., 2012).

A primeira epidemia de dengue foi descrita nas regiões da Ásia, América do Norte e África, na segunda metade do século 18 (GUBLER; CLARK, 1995). Sabe-se que tanto o vírus quanto o mosquito vetor se espalharam para o restante do mundo via navios mercantes, através do armazenamento de água em barris, permitindo a continuidade do ciclo de replicação (GUBLER, 2002). Porém, foi após a segunda guerra mundial que ocorreu uma pandemia, provavelmente devido à migração de pessoas, à dispersão do vírus e do vetor para regiões com populações susceptíveis, e urbanização precária no período pós-guerra (FARES et al., 2015; GUBLER; CLARK, 1995).

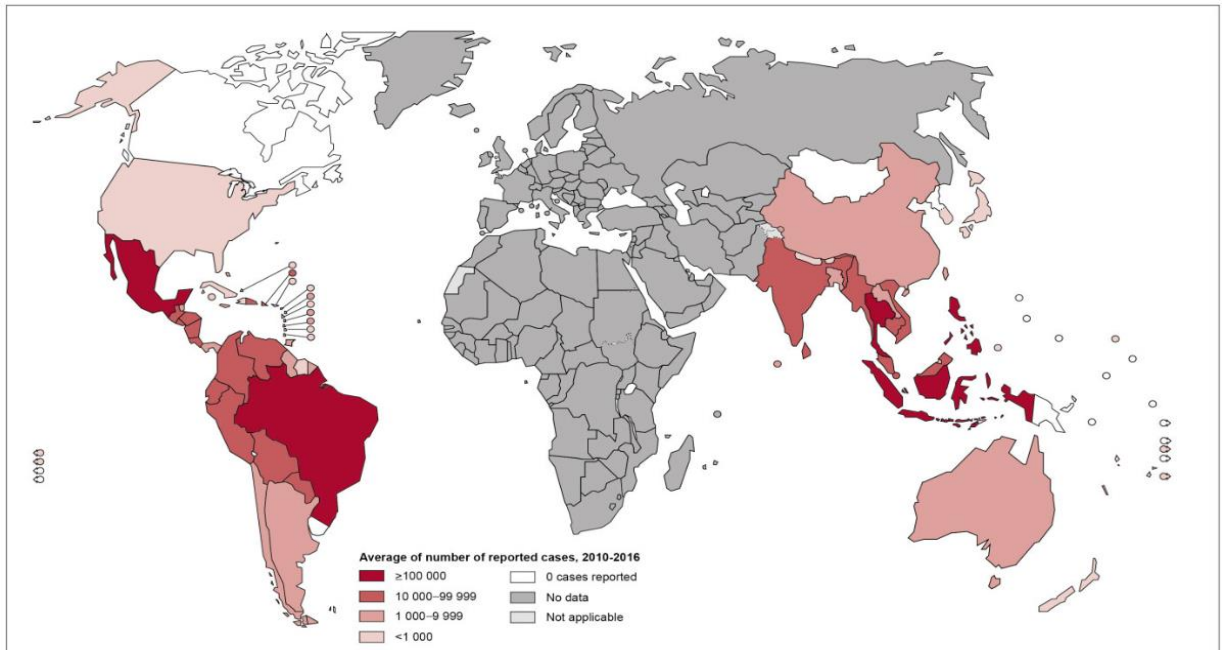


Figura 1: Distribuição mundial dos casos de dengue entre 2010 e 2016 (OMS, 2016). Regiões com tonalidade baixa de vermelho apresentam baixo número de casos reportados de dengue, enquanto regiões com tonalidade forte de vermelho apresentam elevado número de casos reportados.

A entrada do vírus no continente americano ocorreu tardiamente. Isso porque entre as décadas de 1960 e 1970, a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) elaborou um programa de erradicação do mosquito *Aedes aegypti*, com o objetivo de eliminar o vírus da febre amarela no continente (ISLAM et al., 2015). Contudo, falhas no programa de controle do vetor levaram à reintrodução do mosquito no continente (ISTÚRIZ; GUBLER; BREA DEL CASTILLO, 2000), permitindo a entrada do vírus da dengue e estabelecimento do ciclo de transmissão. Após um período livre da circulação do vírus, nos anos de 1982 e 1986 foram registradas epidemias de dengue no Brasil, causadas pelo DENV1 (ISTÚRIZ; GUBLER; BREA DEL CASTILLO, 2000). Entre os anos de 1990 e 1991, ocorreram duas epidemias de dengue no estado do Rio de Janeiro, causadas pelo DENV1 e pela entrada do DENV2 no estado, seguida dos primeiros casos de DHF no Brasil (NOGUEIRA et al., 1993; SIQUEIRA et al., 2005). O DENV3 foi introduzido no país em 2000 (SIQUEIRA et al., 2005). Até 2010, apenas três sorotipos eram encontrados no Brasil. Contudo, após 2012 o sorotipo 4 passou a circular no país (AMÂNCIO et al., 2014) e atualmente os quatro sorotipos podem ser encontrados no Brasil. Em um estudo realizado por Araújo e colaboradores (2017), analisaram-se os

dados obtidos sobre os casos de dengue e óbitos no Brasil entre os anos de 2000 e 2015 e observou-se um aumento de 232,7% e 639% no número de casos e óbitos, respectivamente. Ainda neste trabalho, observou-se maior taxa de mortalidade em crianças com menos de um ano e idosos. A presença de co-morbidades em idosos pode dificultar a resolução do quadro infeccioso (AMÂNCIO et al., 2014).

Entre as regiões brasileiras no ano de 2016, o sudeste apresentou o maior número de casos confirmados de dengue (858.273 casos), seguido das regiões nordeste (324.815 casos), centro-oeste (205.786 casos), sul (72.650 casos) e por fim a região norte (39.011 casos), num total de 1.500.535 casos confirmados em todo o país e uma taxa de incidência de 716,01/100.000 habitantes (MS, 2017a; OPAS, 2017a) (Figura 2). Além disso, nesse mesmo ano, o Brasil apresentou 861 casos graves, dos quais 449 eram da região sudeste, 174 da região centro-oeste, seguidos de 130 da região sul, 96 da região nordeste e 12 da região norte (MS, 2017b). Em relação à mortalidade, o Brasil registrou 642 mortes no ano de 2016, sendo o sudeste a região com maior número de óbitos (392) (MS, 2017c). No ano de 2017, o Brasil apresentou a maior taxa de mortalidade entre os países da América, sendo confirmadas 133 mortes num total de 310 em todo o continente (OPAS, 2017b). Porém, estes dados podem ser subestimados devido à ocorrência de subnotificação dos casos, de modo que o número de casos e óbitos pode ser ainda maior.

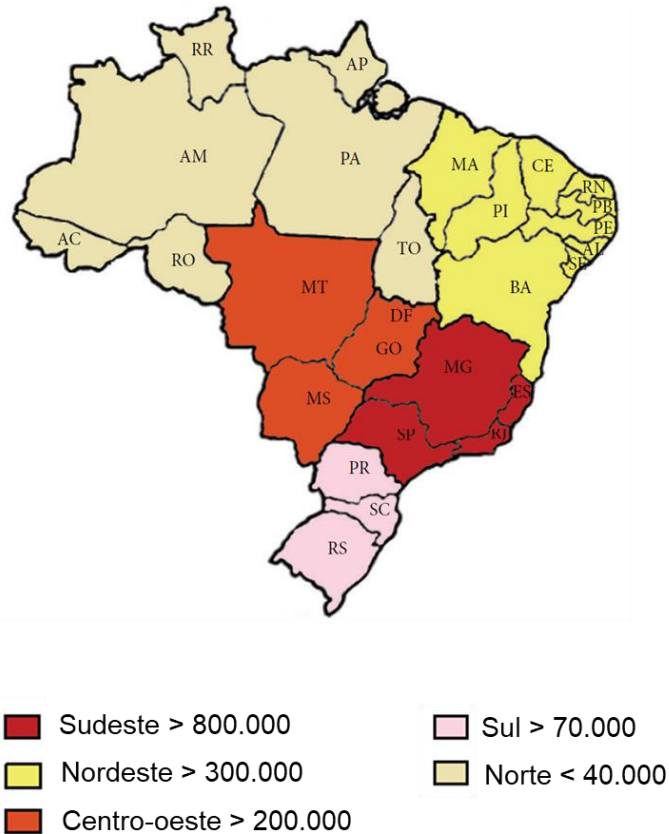


Figura 2: Distribuição dos casos de dengue no Brasil por região, no ano de 2016 (Adaptado de FARES et al., 2015). A região sudeste apresentou o maior número de casos confirmados de dengue, seguida das regiões nordeste, centro-oeste, sul e norte.

2.2 Agente etiológico

O vírus da dengue (DENV) é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, sendo dividido entre quatro sorotipos (DENV1 – 4) (OMS, 2009). A partícula viral é esférica e envelopada, tem aproximadamente 50 nm e é composta por RNA de fita simples de 11 kDa e de polaridade positiva, que apresenta aproximadamente 10.700 nucleotídeos (KUHNS et al., 2002). O RNA codifica uma única poliproteína, a qual é clivada e dá origem às proteínas estruturais e não estruturais (NS) (TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013). As proteínas estruturais são do capsídeo (C), de membrana (M) e do envelope (E), enquanto as proteínas não estruturais compreendem 7 proteínas (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (GUZMAN et al., 2010) (Figura 3). Ao contrário das proteínas estruturais, que estão presentes nas partículas virais, as proteínas não estruturais

são encontradas apenas nas células infectadas (TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013), com exceção da NS1 que também é secretada.

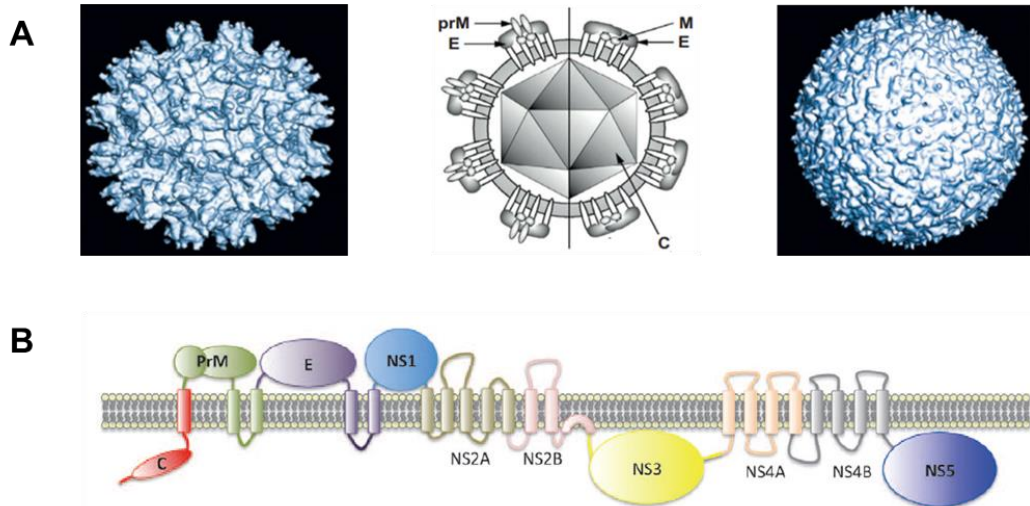


Figura 3: Representação esquemática da estrutura e genoma do DENV. **(A)** Estrutura da partícula viral imatura (esquerda) e madura (direita) do DENV (Adaptado de MACLACHLAN; DUBOVI, 2016). **(B)** Representação esquemática da poliproteína viral ancorada ao RE, demonstrando a localização das proteínas estruturais e não estruturais (Adaptado de MAIRIANG et al., 2013).

A proteína C (do capsídeo), uma das proteínas estruturais, apresenta 12 kDa e possui 4 α -hélices, sendo capaz de formar homodímeros em solução (JONES et al., 2003; WANG; SYU; HU, 2004). Além de constituir o capsídeo viral, estudos *in vitro* já demonstraram que a proteína C atua como uma chaperona de RNA, promovendo o anelamento do RNA de flavivirus, entre eles o DENV (IVANYI-NAGY et al., 2008; PONG et al., 2011). Já a proteína M é sintetizada como um precursor pré-M, que varia de 19 a 23 kDa, e é clivado pelo complexo de Golgi (BRAY; LAI, 1991). A proteína precursora pré-M é de grande importância, uma vez que impede que a proteína E promova uma fusão precoce da membrana da partícula viral ao passar pelo complexo de Golgi, conforme demonstrado em um modelo de encefalite do vale de Murray (GUIRAKHOO; BOLIN; ROEHRIG, 1992). A proteína M apresenta aproximadamente 9 kDa e juntamente com a proteína E forma um complexo que compõe a membrana da partícula viral (KUHN et al., 2002; WONG et al., 2012). Além de sua função estrutural, estudos já demonstraram que a proteína M também está relacionada a mecanismos de apoptose da célula infectada através da disfunção mitocondrial induzida pelo ectodomínio ApoptoM (BRABANT et al., 2009;

CATTEAU et al., 2003). Finalmente, a proteína E é uma glicoproteína que compõe o envelope viral e é responsável pela interação do vírus com o receptor da membrana celular, promovendo a endocitose (NAYAK et al., 2009; ZHANG et al., 2004). Além disso, a proteína E também promove a fusão da membrana viral com a membrana endossomal, permitindo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (NAYAK et al., 2009; ZHANG et al., 2004). Esta glicoproteína apresenta 3 domínios, sendo eles os domínios: I, de localização central na proteína; II, que contem a região hidrofóbica responsável pela fusão do vírus à membrana do endossomo celular; e III, o qual interage com o receptor na superfície da célula (ALLISON et al., 2001; BHARDWAJ et al., 2001; ZHANG et al., 2004).

Enquanto as proteínas estruturais são responsáveis principalmente por montar a partícula viral, as proteínas não estruturais são importantes para a replicação do vírus. As proteínas NS2 compreendem duas proteínas transmembrana: NS2A e NS2B (GOPALA REDDY; CHIN; SHIVANANJU, 2018). A proteína NS2A possui 22 kDa e apresenta 5 domínios transmembrana (GOPALA REDDY; CHIN; SHIVANANJU, 2018). Outrossim, NS2A também está relacionada a inibição da resposta antiviral mediada por IFN do tipo I, juntamente com as proteínas NS4A e NS4B (CHEN et al., 2017; MUNOZ-JORDAN et al., 2003). Assim como as proteínas NS2, as proteínas NS4 também possuem domínios transmembrana (GOPALA REDDY; CHIN; SHIVANANJU, 2018). A proteína NS4A possui uma região C-terminal hidrofóbica, que é clivada pela signalase celular e é necessária para o rearranjo da membrana do RE, levando à formação das vesículas de replicação (MILLER et al., 2007). A NS2B é uma proteína menor, com 15 kDa, cuja principal função é atuar como um cofator da proteína NS3 (GOPALA REDDY; CHIN; SHIVANANJU, 2018). A NS2B apresenta um domínio central de caráter hidrofílico que se associa à proteína NS3, de 70 kDa, formando um complexo responsável pela atividade serino-protease, que promove a clivagem da poliproteína viral (CHAMBERS et al., 1990; GOPALA REDDY; CHIN; SHIVANANJU, 2018). Além da função de protease, estudos já demonstraram que a NS3 também apresenta função de helicase e NTPase (LUO et al., 2008; SWARBRICK et al., 2017; WENGLER; WENGLER, 1991; XU et al., 2005). Assim como a NS3, a NS5, de 104 kDa, apresenta uma importante função enzimática no processo de replicação viral (KLEMA et al., 2016). A porção N-terminal tem a função de metiltransferase,

promovendo o capeamento do RNA viral, e a porção C- terminal possui atividade de RNA polimerase, replicando o genoma viral (ACKERMANN; PADMANABHAN, 2001; EGLOFF et al., 2002; O'REILLY; KAO, 1998).

A última proteína não estrutural, mas não menos importante, é a NS1. Esta é uma glicoproteína de 48 kDa, que além de participar da replicação viral, pode ainda ser expressa na superfície da membrana celular na forma dimérica ou ainda ser secretada como um hexâmero de 300 kDa na circulação sanguínea (CHEN et al., 2016; MODHIRAN et al., 2017; TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013). A NS1 é secretada a partir do primeiro dia do surgimento dos sintomas, sendo então de extrema utilidade para o rápido diagnóstico da infecção (AHMED; BROOR, 2014; OMS, 2009). A NS1 é altamente conservada entre os quatro sorotipos do DENV, assim como entre outros flavivirus, de modo que a detecção desta proteína não permite a identificação do sorotipo infectante (METRI; JYOTHI, 2015; OMS, 2009; RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016). Estudos já demonstraram sua importância na replicação do RNA do vírus, uma vez que mutações nesta proteína impediram a síntese do RNA (FAN; LIU; YUAN, 2014). Contudo, a função desta proteína no complexo de replicação ainda não foi elucidada, uma vez que ela se encontra na face interna do RE, não tendo contato com o genoma viral (AKEY et al., 2015; YOUN et al., 2012). Já foi demonstrado que a NS1 de outros flavivirus interage com as proteínas NS4A e NS4B, sugerindo sua participação na mudança conformacional da membrana do RE para formação do complexo de replicação (LINDENBACH; RICE, 1999; RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016; YOUN et al., 2012).

2.3 Ciclo de replicação

O vírus da dengue interage com receptores presentes na superfície celular por meio da interação da proteína E com o receptor (HIDARI; SUZUKI, 2011). Já foram descritos na literatura a interação do vírus com DC-SIGN (CD209), descrito em células dendríticas e plaquetas, e heparan sulfato em diversas células (CHEN et al., 1997; HOTTZ et al., 2013a; TASSANEETRITHEP et al., 2003). Outros receptores também têm sido apontados como possíveis alvos para o DENV. Entre eles estão os

receptores de manose e o CD14 em monócitos e macrófagos, as proteínas de choque térmico HSP90 e HSP70 (*heat shock protein* 70 e 90), além da chaperona GRP78 (CHEN; WANG; KING, 1999; CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015; JINDADAMRONGWECH; THEPPARIT; SMITH, 2004; MILLER et al., 2008; REYES-DEL VALLE et al., 2005).

Após se ligar ao receptor na célula hospedeira, o vírus é endocitado pela célula (Figura 4). No citoplasma, a acidificação do endossoma promove a trimerização irreversível da proteína E, expondo os domínios responsáveis pela fusão das membranas viral e endossomal e liberando o nucleocapsídeo no citoplasma (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Após dissociação do capsídeo, o RNA viral é liberado e traduzido em uma poliproteína no retículo endoplasmático (RE), a qual é clivada por proteases virais e celulares, liberando as proteínas estruturais e não estruturais (TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013). A membrana do RE sofre alterações estruturais, formando vesículas, onde as proteínas não estruturais, entre elas a NS1, formam um complexo de replicação que transcrevem o RNA de polaridade positiva em uma fita de RNA de polaridade negativa (MULLER; YOUNG, 2013; WELSCH et al., 2009). Esta fita serve de molde para a síntese de novas fitas de polaridade positiva (MULLER; YOUNG, 2013). A proteína C se une ao genoma viral recém sintetizado no RE e estes são envolvidos pela membrana do RE contendo as proteínas E e pré-M, formando uma partícula viral imatura (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Esta partícula viral imatura é translocada para o complexo de Golgi, onde as proteínas presentes na membrana do vírus são glicosiladas (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008). Ainda no complexo de Golgi, a proteína pré-M é clivada em proteína M pela ação da furina, que é uma protease produzida pela célula (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; STADLER et al., 1997). Após este processo de clivagem, a proteína E forma homodímeros e a partícula viral madura é liberada da célula (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008). Estudos já demonstraram que o vírus é capaz de se replicar em células dendríticas, macrófagos, linfócitos, hepatócitos e células endoteliais (BALSITIS et al., 2009; PUERTA-GUARDO et al., 2013; SILVEIRA et al., 2018). Trabalhos mais recentes demonstraram que a tradução das proteínas virais e a replicação do genoma viral ocorrem em plaquetas (KAR et al., 2017; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL,

2015). Porém, são necessários novos estudos para analisar se as partículas virais sintetizadas nas plaquetas são infecciosas ou se a replicação é abortiva.

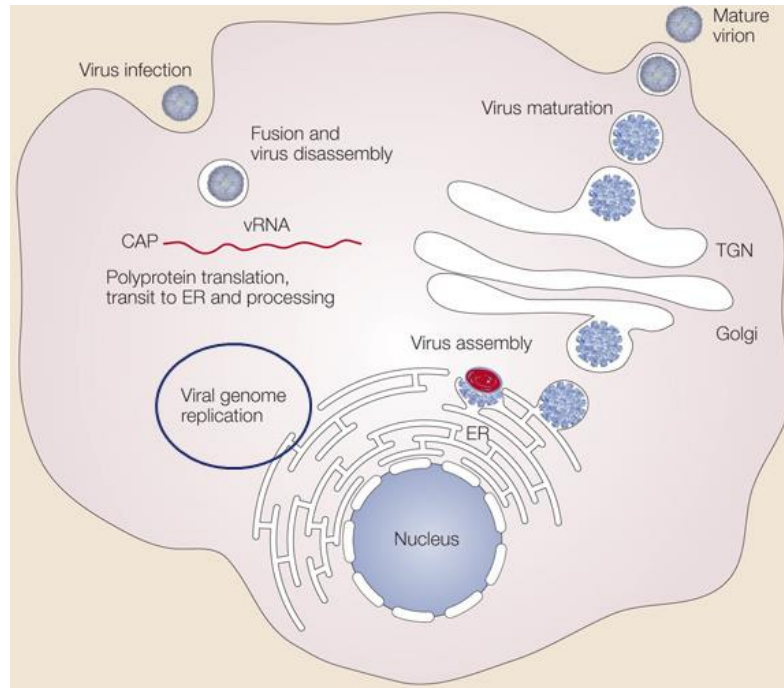


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de replicação do DENV (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

2.4 Aspectos clínicos

Após ser picado por um mosquito infectado, o indivíduo passa por um período, que pode variar de 2 a 7 dias, em que o vírus permanece incubado (KURANE, 2007). Apesar de na maioria dos casos a infecção ser assintomática, o indivíduo pode apresentar manifestações clínicas geralmente leves, mas que podem evoluir para um quadro de dengue grave (Figura 5), que é caracterizado por hemorragia grave, extravasamento vascular intenso e acúmulo de líquido em cavidades associado à dificuldade respiratória por derrame pleural, danos aos órgãos devido à hipoperfusão, podendo levar ao choque e óbito (KURANE, 2007; OMS, 2009). De forma a proporcionar um melhor manejo dos pacientes com dengue, a OMS (2009) separou os casos de dengue em dengue sem sinais de alarme e dengue com sinais de alarme, os quais estão descritos na figura 5. A

presença desses sinais pode ser um indicativo da evolução para um quadro grave (OMS, 2009; MS, 2017). No entanto, pacientes sem sinais de alarme também podem evoluir para dengue grave.



Figura 5: Sinais de alarme e critérios para dengue grave (Adaptado de OMS, 2009).

Os indivíduos com quadro sintomático apresentam inicialmente uma fase febril (Figura 6). Nesta fase, ocorre um aumento da temperatura corporal, ao mesmo tempo em que há alta taxa de replicação viral (OMS, 2011). Além disso, o indivíduo pode apresentar mialgia, dor de cabeça e artralgia. É importante ressaltar que os sinais e sintomas apresentados na fase febril não são suficientes para avaliar se o paciente desenvolverá um quadro brando ou evoluirá para dengue grave. Dentro de 3 a 7 dias, a viremia decresce e a febre começa a ceder, iniciando-se a fase crítica. Nesta fase, ocorre uma amplificação da resposta inflamatória (KURANE, 2007), ocorre então um aumento da permeabilidade vascular, ocasionando um aumento no hematócrito e hipotensão (OMS, 2009). Além disso, são observados quadros de

plaquetopenia e leucopenia. A partir da fase crítica, o paciente pode evoluir para recuperação, ocorrendo resolução do quadro inflamatório e, conseqüentemente, reabsorção do fluido extravasado. Contudo, caso não haja resolução do quadro inflamatório, alguns pacientes podem evoluir com um quadro de dengue grave (OMS, 2009).

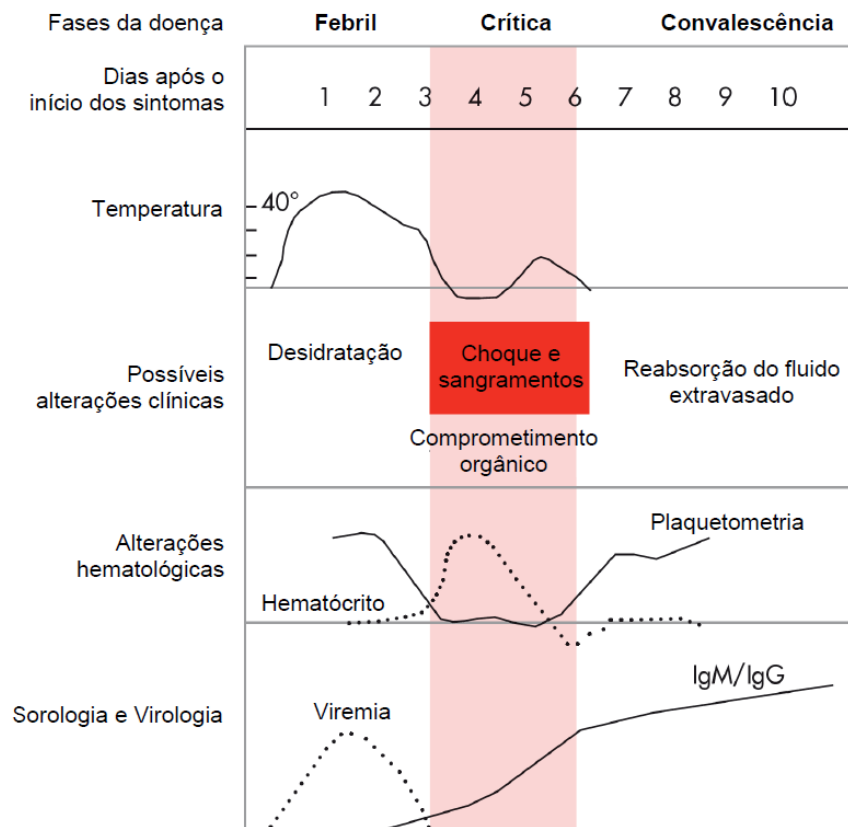


Figura 6: Aspectos clínicos durante o curso da dengue (Adaptado de OMS, 2009).

2.5 Patogênese da dengue

Inicialmente, a dengue se apresenta como uma doença febril autolimitada, podendo progredir para dengue grave. Porém, os mecanismos patogênicos para o desenvolvimento da dengue grave não são totalmente conhecidos e diferentes hipóteses têm sido propostas. Esta evolução para dengue grave tem sido associada à ocorrência de infecções secundárias (DHANOA et al., 2017; NISALAK et al., 2003;

SANGKAWIBHA et al., 1984). Algumas hipóteses já foram propostas para explicar esta associação. A primeira hipótese é conhecida como amplificação dependente de anticorpos (ADE, do inglês *antibody-dependent enhancement*). De acordo com esta hipótese, anticorpos com capacidade sub-neutralizante são produzidos durante a infecção secundária. Estes anticorpos são produzidos por células B de memória da infecção primária e são incapazes de neutralizar um sorotipo distinto durante a infecção secundária (HALSTEAD, 1970, 1988, 2003; KATZELNICK et al., 2017). O complexo vírus-anticorpo é reconhecido por receptores Fc γ (Fc γ R) na superfície de células, as quais internalizam o vírus (LITTAUA; KURANE; ENNIS, 1990). Desta forma, o número de células infectadas aumenta, assim como a viremia (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013). Uma segunda hipótese, chamada de pecado original antigênico, propõe que células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória são ativadas durante uma infecção secundária, ocasionando uma intensa secreção de citocinas pró-inflamatórias, juntamente com apoptose das células T específicas para o sorotipo infectante (MONGKOLSAPAYA et al., 2003, 2006). Contudo, estas hipóteses não são capazes de explicar a ocorrência de dengue grave em infecções primárias (DE ARAÚJO et al., 2009; NUNES et al., 2018).

Uma das hipóteses que explica a ocorrência de dengue grave em infecções primárias e secundárias diz respeito à virulência dos diferentes sorotipos, associada à variação genotípica entre eles. Yung e colaboradores (2015) demonstraram que o DENV-1 genótipo 1 está mais associado ao desenvolvimento de dengue grave em relação ao DENV-2 cosmopolita, num estudo realizado em Singapura. Por outro lado, a ocorrência de casos graves da doença na América tem sido associada ao DENV-2. O DENV-2, especificamente o genótipo do sudeste asiático (DENV-2 SA), é associado a epidemias de DHF ocorridas no Brasil (2008) e Cuba (1981) (KOURI et al., 1989; RICO-HESSSE et al., 1997). Outras epidemias ocorridas no Peru (2011), Venezuela (1989), Porto Rico e México também foram associadas ao sorotipo 2 SA (GUBLER; MELTZER, 1999; VILCARROMERO et al., 2014). Somado a essa hipótese, outros estudos sugerem a participação de fatores genéticos associados ao hospedeiro na progressão para quadros de dengue grave. O fator genético mais estudado atualmente é o HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*), que corresponde ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), localizado no cromossomo 6. Um estudo

realizado por Lan et al. (2008) demonstrou que o alelo HLA-A*24 está associado ao desenvolvimento de dengue grave em uma população vietnamita. Por outro lado, o alelo HLA-DRB1*0901 apresentou um efeito protetor contra a dengue grave, principalmente contra o DENV-2 (LAN et al., 2008). Além disso, o alelo HLA-A*03 foi associado negativamente ao desenvolvimento de dengue grave em um grupo da população da Malásia, embora não tenha sido observada associação deste alelo com a gravidade da doença em grupos chineses e indianos, dentro da população da Malásia (APPANNA et al., 2010).

Apesar de as diferentes hipóteses proporem diferentes mecanismos para o desenvolvimento da dengue grave, todas convergem para um ponto em comum: os níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios. Diversos artigos já demonstraram que a presença destes mediadores está relacionada à ocorrência de extravasamento vascular em pacientes com dengue (APPANNA et al., 2012; PANG; CARDOSA; GUZMAN, 2007). Bozza et al. (2008) demonstraram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1 β e IFN- γ , no plasma de pacientes com dengue grave. ZHAO et al. (2016) também encontraram níveis elevados de IFN- γ , além de maiores concentrações de TNF- α e IL-1 α , em pacientes com dengue. Outros estudos já demonstraram uma maior concentração plasmática de MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) em pacientes com DHF (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2010; CHEN et al., 2006; CHUANG et al., 2011). Diversos estudos já associaram células do sistema imune, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e células T, com a secreção de citocinas pró-inflamatórias (MATHEW; ROTHMAN, 2008; MONGKOLSAPAYA et al., 2003; PUERTA-GUARDO et al., 2013; SCHMID; DIAMOND; HARRIS, 2014; YONG et al., 2017). Contudo, ainda são poucos os estudos que demonstram o papel das plaquetas na resposta inflamatória durante a infecção pelo DENV (HOTTZ et al., 2013a, 2013b, 2014; MATSUURA et al., 2012; MENDES-RIBEIRO et al., 2008; MICHELS et al., 2014; NOISAKRAN et al., 2009; OJHA et al., 2017; TRUGILHO et al., 2017).

A NS1 secretada tem papel importante na patogênese da dengue. Estudos já demonstraram que altos níveis de NS1 estão relacionados ao desenvolvimento de DHF, uma vez que pacientes com DHF ou em risco de desenvolver DHF apresentaram elevada concentração plasmática desta proteína (LIBRATY et al., 2002). Além disso, a carga viral no plasma de pacientes está

diretamente relacionada aos níveis circulantes de NS1 (LIBRATY et al., 2002). Estudos já demonstraram que a NS1 age como um PAMP (padrão molecular associado a patógeno) (ADIKARI et al., 2016; MODHIRAN et al., 2015). PAMPs são estruturas altamente conservadas de patógenos e indispensáveis para sua sobrevivência, sendo reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) do hospedeiro (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; MOGENSEN, 2009). O reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs é importante para o desenvolvimento da resposta imune inata, uma vez que desencadeia uma cascata de eventos que levam a síntese de mediadores inflamatórios e outras moléculas imunorreguladoras, além de promover a ativação da resposta adaptativa (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; MOGENSEN, 2009).

Sabe-se que a NS1 ativa PBMCs (células mononucleares de sangue periférico), macrófagos e monócitos, ocasionando a secreção das citocinas TNF- α , IL-6, IFN- β , IL-1 β , IL-10 e IL-12 (ADIKARI et al., 2016; MODHIRAN et al., 2015). A NS1 também atua diretamente sobre células do endotélio vascular, causando danos ao endotélio e levando ao aumento da permeabilidade endotelial (MODHIRAN et al., 2015). Beatty e colaboradores (2015) também demonstraram que a NS1 ocasiona aumento da permeabilidade e extravasamento vascular em camundongos, além de induzir a secreção das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6. Estudos já demonstraram que a NS1 é capaz de promover a degradação do glicocálice endotelial levando ao extravasamento vascular (CHEN et al., 2018; PUERTA-GUARDO; GLASNER; HARRIS, 2016). Outrossim, a NS1 é capaz de se ligar a glicosaminoglicanos (heparan sulfato e condroitin sulfato E) preferencialmente na membrana de células HMEC (células endoteliais da microvasculatura humana) (AVIRUTNAN et al., 2007), sugerindo um possível mecanismo para o extravasamento vascular durante a dengue. Modhiran et al. (2015) demonstraram que a NS1 ativa PBMCs e macrófagos por meio da interação com TLR4 (do inglês *Toll-like receptor 4*). Apesar de os estudos citados anteriormente já terem demonstrado a ativação de células do sistema imune e células endoteliais pela NS1, a capacidade da NS1 em ativar plaquetas ainda não está esclarecida.

2.6 Plaquetas como células do sistema imune

As plaquetas são células originalmente associadas ao processo de coagulação sanguínea, sendo importantes na manutenção da homeostasia. Por muito tempo acreditou-se que esta era sua única função. Contudo, estudos mais recentes têm demonstrado o envolvimento dessas células em respostas imunes e processos inflamatórios (GARRAUD; COGNASSE, 2015; VIEIRA-DE-ABREU et al., 2012) (Figura 7). Apesar de serem anucleadas, as plaquetas possuem estoques de RNAm que são processados por spliceossomos após estímulo, levando à síntese de proteínas, como a pré-IL-1 β , o fator tecidual (TF), o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), Bcl-3 (*B-cell lymphoma 3*) e β -defensina (BROGREN et al., 2004; DENIS et al., 2005; KRAEMER et al., 2011; SCHWERTZ et al., 2006; WEYRICH et al., 1998, 2009). Outra contribuição importante das plaquetas são as diversas moléculas estocadas em grânulos citoplasmáticos, os quais podem ser diferenciados em grânulos densos e α -grânulos. Os grânulos densos são encontrados em torno de 3 a 8 por plaqueta e estocam serotonina, ADP, ATP, além de cálcio e polifosfatos (HEIJNEN; VAN DER SLUIJS, 2015). Já os α -grânulos são encontrados de forma abundante, entre 50 a 80 por plaqueta, e são responsáveis por armazenar moléculas de adesão, como P-selectina, fator de Von Willebrand (VWF) e fibrinogênio (FURIE; FURIE; FLAUMENHAFT, 2001; SANDER et al., 1983; WENCEL-DRAKE et al., 1985). Também são encontrados nos α -grânulos mediadores inflamatórios, entre eles quimiocinas e citocinas inflamatórias, como PF4, RANTES/CCL5, CXCL7, MIF, IL-8 e TGF- β , e fatores de crescimento, como VEGF e PDGF (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009; HEIJNEN; VAN DER SLUIJS, 2015; STRÜSSMANN et al., 2013).

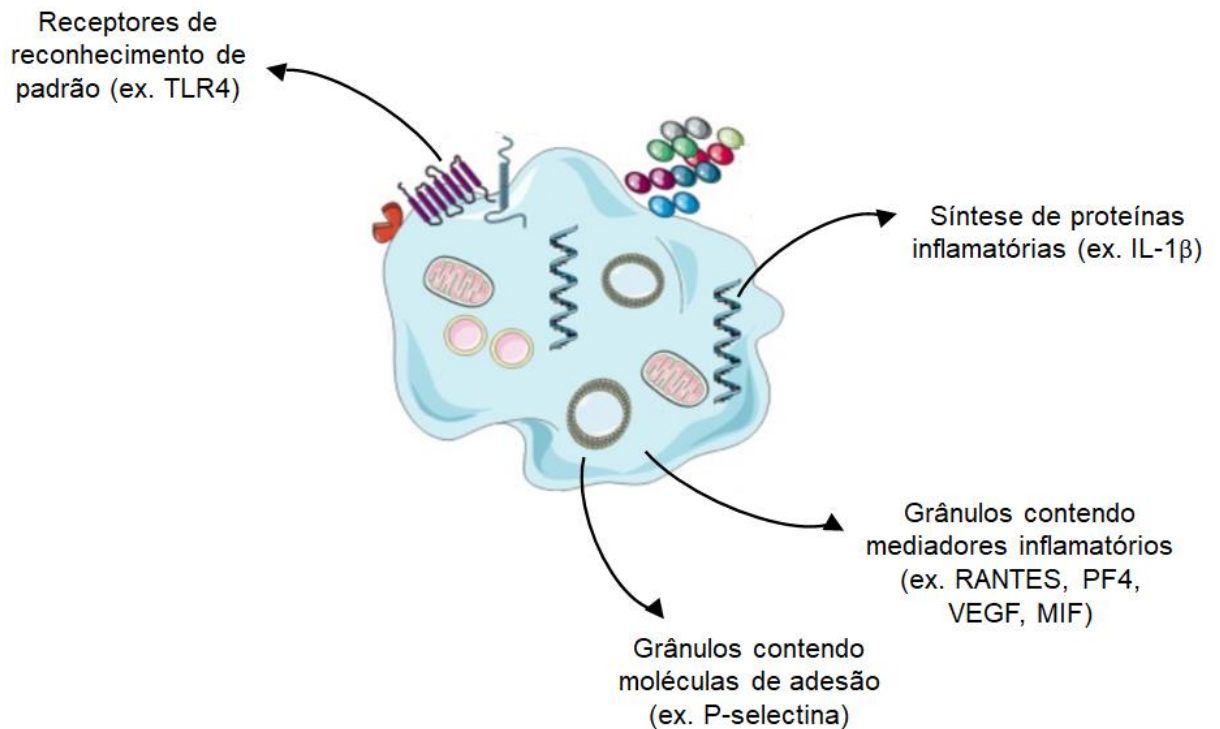


Figura 7: Representação esquemática do envolvimento das plaquetas na resposta imune (Adaptado de Garraud et al., 2015).

As plaquetas também podem interagir com outras células do sistema imunológico, auxiliando no desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa (ALI; WUESCHER; WORTH, 2015; CHAPMAN et al., 2012; GARRAUD; COGNASSE, 2015; LANGER et al., 2007; NISHAT; WUESCHER; WORTH, 2018; VIEIRA-DE-ABREU et al., 2012). Estudos do nosso grupo demonstraram que monócitos de voluntários saudáveis incubados com plaquetas de pacientes com dengue secretam citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-8 e IL-10, além de demonstrar a presença de agregados plaqueta-monócito no sangue de pacientes com dengue, principalmente em pacientes com quadros de trombocitopenia e extravasamento vascular (HOTTZ et al., 2014). Somado a isso, já foi demonstrado que plaquetas ativadas por LPS via TLR4 se ligam a neutrófilos aderidos ao endotélio, induzindo a secreção de NETs (*neutrophil extracellular traps*) que retêm bactérias da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*) (CLARK et al., 2007).

Sabe-se que as plaquetas são capazes de reconhecer PAMPs por meio de PRRs, influenciando o desenvolvimento de uma resposta contra patógenos (BERTHET et al., 2012). Já foram descritos na literatura diversos receptores

expressos por plaquetas, entre eles o DC-SIGN, através do qual o vírus da dengue é reconhecido (HOTTZ et al., 2013a; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015). Além deste, já foram descritos em plaquetas receptores do tipo NLR (*NOD-like receptors*), sendo o mais estudado o NLRP3 (MURTHY et al., 2017; VOGEL et al., 2018), relacionado à ativação do inflamassoma nas plaquetas durante a dengue (HOTTZ et al., 2013a; HOTTZ; BOZZA; BOZZA, 2018; MIDDLETON; WEYRICH; ZIMMERMAN, 2016). As plaquetas também expressam receptores do tipo TLR, inclusive os TLR envolvidos no reconhecimento de vírus. Estudos realizados por Assinger et al. (2014) e Koupenova e colaboradores (2014) mostraram que o citomegalovírus (CMV) e o vírus da encefalomiocardite (EMCV) interagem, respectivamente, com receptores do tipo TLR2 e TLR7 expressos por plaquetas, gerando uma resposta inflamatória contra estes patógenos.

Os TLRs são PRRs expressos por células do sistema imune e responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs e DAMPs, elicitando uma resposta inflamatória (LU; YEH; OHASHI, 2008). Estes receptores podem ser expressos no compartimento intracelular, como TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, ou na superfície celular, como é o caso do TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 (DE NARDO, 2015). O TLR4 é um subtipo de TLRs encontrado na conformação homodimérica, capaz de reconhecer PAMPs extracelulares, sendo o LPS o agonista mais estudado (DE NARDO, 2015). Estudos já demonstraram a expressão de TLRs tanto na superfície quanto no interior de plaquetas, sendo a expressão na superfície modulada de acordo com o estado de ativação plaquetária (COGNASSE et al., 2005). ANDONEGUI et al. (2005) demonstraram que plaquetas expressam TLR4, e relacionaram a ativação plaquetária por LPS via TLR4 com quadro de trombocitopenia em camundongos. Aslam et al. (2006) também demonstrou um aumento nos níveis de TNF- α e quadro de trombocitopenia em camundongos estimulados com LPS de *E. coli*. Stahl e colaboradores (2006) também demonstraram a ativação plaquetária através de TLR4 após estímulo com LPS de *E. coli* enterohemorrágica, além de demonstrar a presença de LPS em plaquetas de pacientes com síndrome hemolítica urêmica (SHU), mas não em pacientes sem quadro de SHU, sugerindo que a interação LPS-TLR4 pode contribuir para a plaquetopenia. Além disso, a interação de LPS com TLR4 na superfície das plaquetas é capaz de estimular a secreção das citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α por

PBMCs estimulados com o sobrenadante de plaquetas tratadas com LPS (BERTHET et al., 2012). Além do LPS, outros agonistas de TLR4, como as histonas extracelulares, também são capazes de ativar plaquetas (Figura 8) (SEMERARO et al., 2011; TRUGILHO et al., 2017). Contudo, o papel da NS1 na ativação de TLRs em plaquetas ainda não foi descrito.

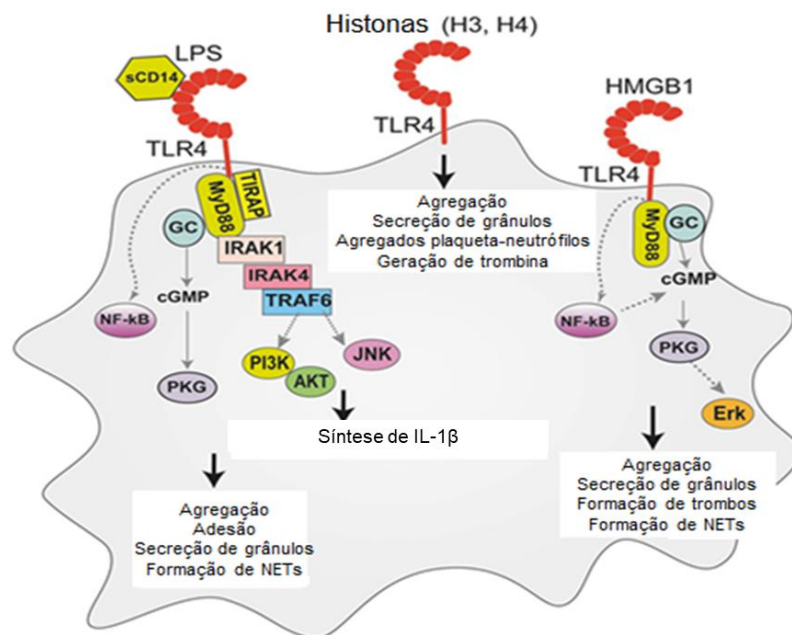


Figura 8: Mecanismos e agonistas para ativação plaquetária via TLR4 (Adaptado de D'ATRI et al., 2017).

2.7 Hipótese e justificativa

A NS1 tem se tornado um importante alvo de estudos para o entendimento dos processos patogênicos da dengue, já tendo sido demonstrados na literatura diversos mecanismos através dos quais esta proteína atua (ADIKARI et al., 2016; BEATTY et al., 2015; MODHIRAN et al., 2015; PUERTA-GUARDO; GLASNER; HARRIS, 2016). Sabe-se que as plaquetas são componentes importantes do sistema imune, sendo capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs e iniciar uma resposta imuno-inflamatória (D'ATRI; SCHATTNER, 2017; GARRAUD; COGNASSE, 2015; SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011; VIEIRA-DE-ABREU et

al., 2012). Então, nós propomos a hipótese de que a NS1 do DENV2 ativa plaquetas através da ligação ao receptor TLR4, ocasionando a liberação de mediadores inflamatórios. As plaquetas de pacientes com dengue circulam em um estado mais ativado, secretando citocinas e quimiocinas inflamatórias (HOTTZ et al., 2013b; TRUGILHO et al., 2017). No entanto, os mecanismos que levam a essa ativação ainda não foram totalmente esclarecidos. Assim, novos estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação plaquetária e sua contribuição para a patogênese da dengue.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar os efeitos da NS1 do DENV2 na ativação plaquetária e secreção de citocinas, bem como a participação do receptor TLR4 neste processo.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Investigar a ativação plaquetária após estimulação com NS1 do DENV2;

3.2.2 Avaliar o perfil inflamatório de citocinas secretadas por plaquetas estimuladas com NS1 do DENV2;

3.2.3 Investigar se NS1 do DENV2 é capaz de potencializar a ativação de plaquetas estimuladas com trombina;

3.2.4 Investigar a participação do TLR4 na ativação plaquetária induzida por NS1;

3.2.5 Investigar se a infecção de plaquetas com o vírus da dengue leva à replicação viral com síntese e secreção de NS1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Voluntários saudáveis

Foram obtidas amostras de sangue periférico de voluntários saudáveis do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (ICB-UFJF). Os critérios de inclusão de voluntários saudáveis foram: ter mais de 18 anos, não fazer uso de anti-inflamatórios por no mínimo 7 dias antes da coleta, não consumir qualquer alimento ou bebida contendo cafeína, e não ter tido nenhum episódio de doenças infecciosas ou alérgicas por no mínimo 7 dias antes da coleta da amostra.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HU-UFJF sob número 2.223.542. Antes do início dos procedimentos, todos os voluntários consentiram em participar dos experimentos por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Isolamento de plaquetas

As plaquetas foram isoladas a partir do sangue periférico de voluntários saudáveis, conforme método descrito por Hamburger e McEver (1990). Foram coletados 17 mL de sangue por meio de escalpe em seringa contendo 3 mL de ACD (8 g/L de ácido cítrico, 22,4 g/L de citrato de sódio e 2 g/L de dextrose; pH 5,1), e o sangue foi homogeneizado e transferido para tubo falcon estéril de 50 mL, em cabine de fluxo laminar. O sangue foi centrifugado a 200 \times g, por 20 minutos à temperatura ambiente, com parada sem freio, obtendo-se o plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi recolhido, adicionou-se 100 nM de prostaglandina E₁ (PGE₁) e o PRP foi centrifugado a 500 \times g, por 20 minutos à temperatura ambiente, com parada sem freio. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi descartado, e as plaquetas foram ressuspensas em 25 mL de PSG (5 mM de PIPES, 145 mM de

NaCl, 4 mM de KCl, 50 μ M de Na₂HPO₄, 1 mM de MgCl₂·6H₂O, 5,5 mM de glicose; pH 6,8) e 100 nM PGE₁ e centrifugadas a 500 xg, por 20 minutos, à temperatura ambiente, com parada sem freio. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio 199 (M199 com EBSS, L-Glutamina e HEPES; Lonza 12-117F). Após contagem das plaquetas, a concentração plaquetária foi corrigida de modo a obter 1x10⁹ plaquetas/mL.

Para avaliação da replicação viral em plaquetas, foram utilizados procedimentos para a depleção de leucócitos, obtendo-se plaquetas com maior grau de pureza. Com esta finalidade, após descartar o PPP, o pellet foi ressuspensionado em 2,5 mL de PBS-EDTA-HSA (PBS contendo EDTA 2 mM e 0,5% de albumina de soro humano). Então, adicionou-se 100 nM de PGE₁ e o anticorpo anti-CD45 (1:200) do kit de depleção de células CD45+ Easy sep (StemCell.18259). Após 10 minutos de incubação, à temperatura ambiente, adicionou-se 100 nM de PGE₁ e a suspensão de microesferas magnéticas (1:100) do kit de depleção de células CD45+ Easy sep (StemCell.18259). A suspensão foi incubada por 15 minutos, à temperatura ambiente, e após esse período, foi transferida para um tubo de fundo em U (Falcon 352054) para inserção no magneto Easy Sep magenta (StemCell.18000). A suspensão foi incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, a suspensão foi vertida para um tubo falcon estéril de 50 mL, tendo o cuidado de não retirar o tubo do magneto durante o processo. Posteriormente, completou-se o volume para 25 mL com PSG e 100 nM de PGE₁ e realizou-se nova centrifugação a 500 xg por 20 minutos, à temperatura ambiente, com parada sem freio. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio 199. Após contagem a concentração de plaquetas foi corrigida para 1x10⁹ plaquetas/mL.

4.3 Estimulação plaquetária

As plaquetas isoladas de voluntários saudáveis foram incubadas a 37 °C com NS1 do DENV-2 proveniente de sistemas de transfecção em *Escherichia coli* (NS1_{EC}) (ALLONSO et al., 2011) ou em células HEK (NS1_{HEK}) (ab181966, Abcam).

Foram utilizadas concentrações de 0, 0,5, 5 ou 50 µg/mL de NS1 do DENV-2, por 1:30 ou 3:00 horas. Para eliminação da possibilidade de contaminação com LPS nos experimentos com NS1_{EC}, plaquetas isoladas foram incubadas com NS1 do DENV-2 (50 µg/mL) ou LPS (10 µg/mL) (Sigma L3129) na presença de 10, 50 ou 100 µg/mL de Polimixina B (InvivoGen). Após incubação por 3 horas, as plaquetas estimuladas foram centrifugadas a 700 xg, por 15 minutos. Precipitados de plaquetas foram utilizados para avaliação da ativação plaquetária por citometria de fluxo e os sobrenadantes foram congelados a -80°C para análise da secreção de mediadores inflamatórios.

Para investigar se a NS1 do DENV2 potencializa a ativação plaquetária induzida por trombina, plaquetas pré-tratadas com concentração de 50 µg/mL de NS1_{EC} por 2:50 horas foram incubadas com concentração sub-ótima de trombina (0,01 U/mL) por 10 minutos, a 37°C. Após o período de incubação, as plaquetas estimuladas foram centrifugadas conforme descrito acima.

Com o objetivo de avaliar se a NS1 ativa plaquetas por meio da ligação ao receptor TLR4, as plaquetas foram incubadas com 20 µg/mL de anticorpos neutralizantes anti-TLR4 (eBioscience 169917-82) ou IgG controle de mesmo isotipo (Sigma M5534), por 30 minutos, a 37 °C. Após esse tempo, as plaquetas foram estimuladas com 5 µg/mL de NS1_{HEK} por 3 horas, a 37 °C. Após a incubação por 3 horas, as amostras foram centrifugadas a 900 xg, por 15 minutos, à temperatura ambiente, com parada sem freio. Os sobrenadantes foram congelados a -80°C e os precipitados de plaquetas foram recuperados para análise da ativação plaquetária por citometria de fluxo.

4.4 Avaliação da ativação plaquetária

Os precipitados de células obtidos após estimulação das plaquetas foram ressuspensos em M199 e marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos, e protegidos da luz. As plaquetas foram identificadas através da marcação com o anticorpo anti-CD41 conjugado a alofocianina (APC), PerCP-Cy5 ou phicoeritrina (PE) (1:10) (BD Pharmingen). Para avaliação da ativação plaquetária, avaliou-se a

expressão superficial da P-selectina utilizando-se o anticorpo anti-CD62P conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:10) (BD Pharmingen). Após 30 minutos, as plaquetas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Como controle negativo, utilizou-se IgG do mesmo isotipo conjugada ao mesmo fluorocromo (1:10). Posteriormente, as plaquetas marcadas foram adquiridas em Citômetro de Fluxo (BD FACSCanto II ou BD FACSCalibur) através dos softwares FACSDiva ou CellQuest, respectivamente, analisando-se 10.000 eventos por gate. Os dados foram posteriormente analisados por meio do software FlowJo.

4.5 Dosagem de citocinas

O sobrenadante de plaquetas estimuladas com NS1 do DENV-2 foi utilizado para a dosagem de citocinas e quimiocinas de perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório, por meio de ELISA de captura (R&D systems) e conforme as instruções do fabricante. Foram dosadas as citocinas IL-1 α , MIF, IL-1 β e TGF- β e as quimiocinas PF4/CXCL4 e RANTES/CCL5. Para a dosagem de IL-1 α e IL-1 β as amostras não foram diluídas, enquanto para a dosagem de PF4/CXCL4, MIF, RANTES/CCL5 e TGF- β as amostras foram diluídas 200, 2, 10 e 20 vezes, respectivamente.

4.6 Infecção das plaquetas com o DENV2

Plaquetas foram isoladas e depletadas de leucócitos, conforme descrito anteriormente, e infectadas ou não com DENV2 (MOI=1). As amostras infectadas foram incubadas a 37°C. Após 1,5 horas, os tubos contendo plaquetas infectadas foram submetidos a um processo de lavagem com meio 199 (M199) e centrifugados a 1000 xg, por 10 minutos, sem freio e à temperatura ambiente. Este processo foi repetido duas vezes. Nos tempos de 3, 6, 12 e 24 horas após a infecção, as plaquetas foram centrifugadas a 1000 xg, por 10 minutos, sem freio e à temperatura ambiente. As amostras de sobrenadante e precipitado de plaquetas foram

separadas para análise da síntese e secreção de NS1 por Western blot e em tampão (*QIAamp viral RNA minikit*, QIAGEN) para quantificação do RNA viral por qPCR.

4.7 Western blot

Plaquetas de voluntários saudáveis infectadas ou não com DENV-2 foram lisadas com 50 μ L de tampão de lise (NaCl 0,15 M, Tris 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 1 %, inibidor de proteases (ROCHE)) e o lisado foi submetido a dosagem de proteínas utilizando-se kit BCA (Thermo Scientific). As amostras de célula (de 14 a 52 μ g de proteína) e sobrenadante (20 μ L) foram aplicadas em gel SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio - poliacrilamida) a 10 % para realização de eletroforese, a 32 mA por gel. Posteriormente, realizou-se a eletrotransferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose, a 200 mA, por 105 minutos. Após esse tempo, as membranas foram bloqueadas com TBS-T (tampão tris salina, 0,1 % Tween 20) e 5 % de leite durante 1 hora. Então, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-NS1 produzido em coelho (Invitrogen PA5-32207, 1:1000), overnight, sob refrigeração (4 °C). No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a HRP (1:10.000) por 1 hora. As membranas foram lavadas novamente com TBS-T e reveladas com os reagentes quimioluminescentes Pico ou Dura (Thermo). Após revelação, a membrana contendo amostras de células foi lavada com TBS-T e incubada com anticorpo primário anti- β -actina humana produzida em camundongo (Sigma, 1:10.000) por 1 hora. A membrana foi lavada com TBS-T, incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:10.000) por 1 hora e revelada com o reagente Pico.

4.8 Quantificação do RNA viral por qPCR

A sonda fluorescente QuantiNova Probe RT-PCR Kit (Qiagen®) foi utilizada para 25 µL de volume de reação (tampão de reação 2x, 5 µL RNA, 50µM dos iniciadores *Forward/Reverse* (F/R) e 10 µM sonda). A reação de transcrição reversa foi realizada a 50 °C por 30 min, seguida de desnaturação a 95 °C por 15 minutos. Por fim, a amplificação do material genético foi realizada através de 50 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, e anelamento a 55 °C por 35 segundos. Foram consideradas positivas curvas sigmoidais com valores de Ct (*cycle threshold*) inferiores a 40. Para descartar contaminação cruzada, nós utilizamos, durante a reação, controles negativos (controle do veículo de extração e controle não-template do RT-qPCR) e positivo (18S rRna humano). A quantificação absoluta do RNA viral foi realizada por meio de uma curva padrão feita a partir da diluição seriada do RNA obtido do vírus (DENV2 16681) em concentrações conhecidas.

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism versão 6. As variáveis analisadas foram expressas em média ± erro padrão da média. As variáveis numéricas foram analisadas para distribuição normal utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre dois grupos foram realizadas por meio de teste U de Mann-Whitney, para distribuições não-paramétricas, ou teste t de Student, para distribuições paramétricas. Para comparação entre três ou mais grupos foi utilizada a análise de variância em um sentido (*one-way* ANOVA) e a localização das diferenças entre os grupos foi identificada pelo pós teste de Tukey. Para a comparação do efeito da polimixina B sobre o efeito da NS1 ou LPS foi utilizada análise de variância em dois sentidos (*two-way* ANOVA), e a localização das diferenças foi identificada pelo pós teste de Fisher. Para análise do efeito do anti-TLR4 sobre a ativação de plaquetas de um mesmo doador por experimento independente foi utilizado o teste t pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 NS1 do DENV2 ativa plaquetas

Inicialmente, nós investigamos se a proteína não estrutural NS1 obtida em sistema de transfecção em *E. coli* (NS1_{EC}) é capaz de promover a ativação plaquetária. Para isso, nós estimulamos plaquetas de voluntários saudáveis com NS1_{EC} nas concentrações de 0, 0,5, 5 e 50 µg/mL, nos tempos de 1,5 e 3 horas, a 37°C. Nós avaliamos a expressão da proteína de adesão P-selectina (CD62P) na superfície das plaquetas por citometria de fluxo. A P-selectina é encontrada nos α-grânulos em plaquetas quiescentes e após as plaquetas serem estimuladas, ocorre translocação destes grânulos para a superfície da célula (VIEIRA-DE-ABREU et al., 2012). Nós observamos um aumento significativo da ativação de plaquetas estimuladas na dose de 50 µg/mL de NS1_{EC}, no tempo de 1,5 horas, e nas doses de 5 e 50 µg/mL no tempo de 3 horas de incubação (Figura 9 A-B). Para confirmar que a NS1 do DENV2 é capaz de ativar plaquetas, nós utilizamos NS1 produzida em sistema de transfecção de células HEK (NS1_{HEK}). Assim, nós repetimos o experimento estimulando ou não as plaquetas com NS1_{HEK} na concentração de 5 µg/mL, por 3 horas, a 37°C. De maneira semelhante, a NS1_{HEK} também aumentou significativamente a expressão de P-selectina na superfície de plaquetas em relação às plaquetas não estimuladas (Figura 9 C), confirmando que a NS1 do DENV2 é capaz de ativar plaquetas.

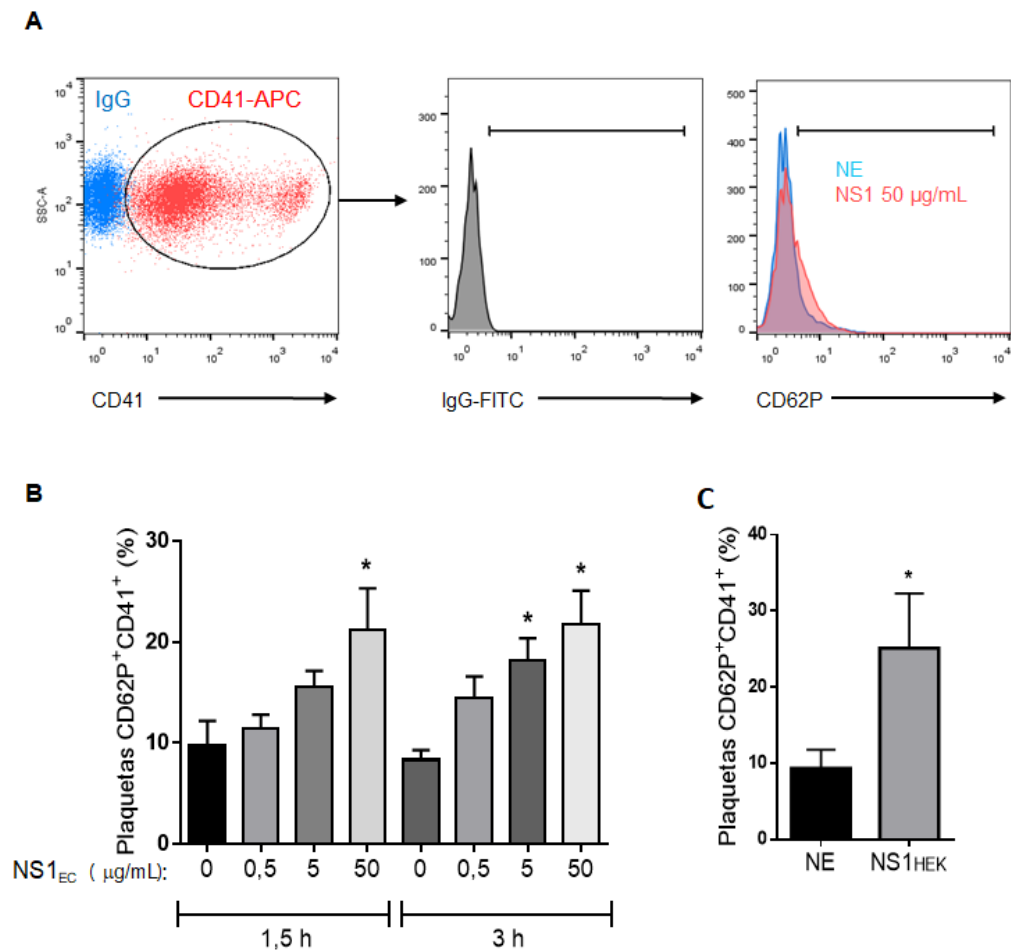


Figura 9: Porcentagem de plaquetas expressando P-selectina (CD62P⁺) após estímulo com NS1 do DENV2. **(A)** Estratégia de *gating* para análise de plaquetas estimuladas com NS1. Histogramas mostram expressão de P-selectina em plaquetas de voluntários saudáveis estimuladas com 50 µg/mL de NS1 por 3 horas. **(B)** Plaquetas de voluntários saudáveis foram estimuladas com 0, 0,5, 5 e 50 µg/mL de NS1 do DENV2 recombinante produzida em *E. coli* (NS1_{EC}) por 1,5 ou 3 horas a 37 °C. **(C)** Plaquetas de voluntários saudáveis foram estimuladas com 5 µg/mL de NS1 do DENV2 produzida em células HEK (NS1_{HEK}) por 3 horas a 37 °C. Citometria de fluxo foi utilizada para quantificar a porcentagem de plaquetas expressando P-selectina (CD62P⁺) na superfície. As barras representam média ± erro padrão da média de (B) 5 ou (C) 4 experimentos independentes com plaquetas de voluntários diferentes. *p < 0.05 comparado com não estimulado; NE: não estimulado.

5.2 NS1 do DENV2 ativa plaquetas de maneira independente de LPS

A NS1 utilizada nos experimentos iniciais foi obtida através de sistema de transfecção em *E. coli* (NS1_{EC}). Então, para eliminar a possibilidade de que as plaquetas foram ativadas por LPS contaminante, nós estimulamos plaquetas isoladas de 5 voluntários saudáveis com NS1_{EC} (50 µg/mL) na presença de concentrações crescentes de polimixina B (0, 10, 50 e 100 µg/mL), que age como

quelante de LPS. Como controle positivo, plaquetas foram estimuladas com LPS (10 µg/mL) com as mesmas concentrações de polimixina B. De acordo com os resultados obtidos, observamos que a polimixina B não foi capaz de inibir a ativação plaquetária induzida por NS1_{EC} em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 10 A e C). Em contrapartida, a polimixina B reduziu significativamente ($p < 0,05$) a ativação plaquetária por LPS de modo dependente da dose em relação às plaquetas não tratadas com polimixina B (Figura 10 B e C).

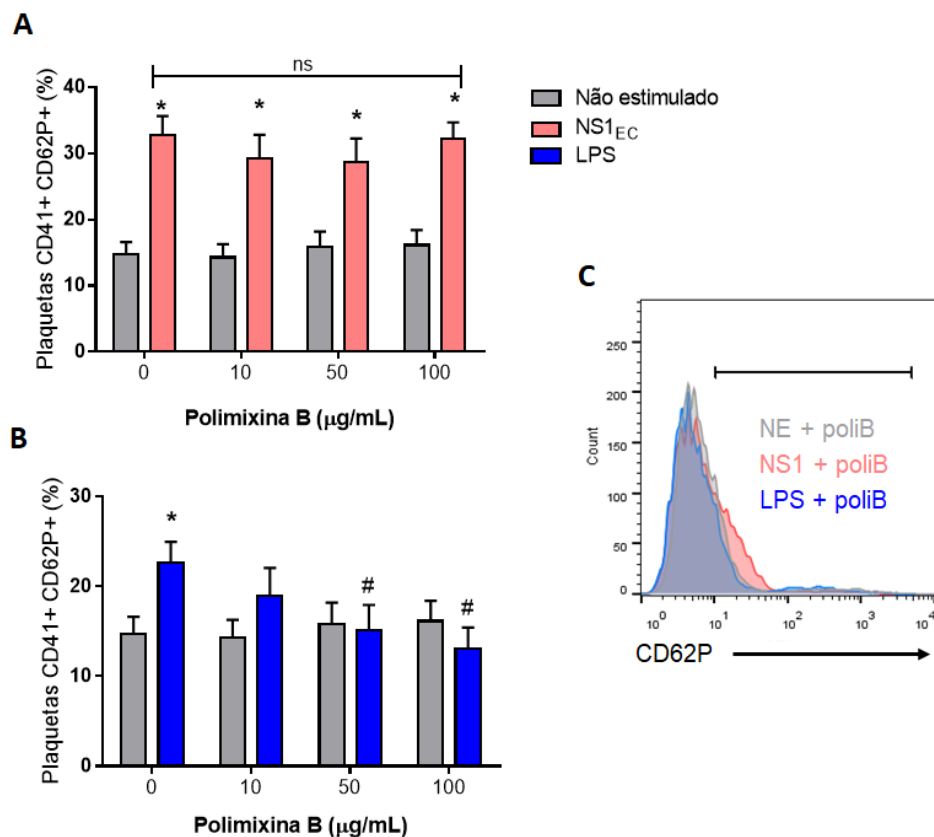


Figura 10: NS1 do DENV2 ativa plaquetas de maneira independente de LPS. Plaquetas de voluntários saudáveis foram estimuladas com NS1 do DENV-2 produzida em *E. coli* (NS1_{EC}) (**A**) ou LPS (**B**) na ausência ou presença de 10, 50 ou 100 µg/mL de Polimixina B (PoliB). (**A**) Plaquetas foram estimuladas com 50 µg/mL de NS1_{EC} por 3 horas; (**B**) Plaquetas foram estimuladas com 10 µg/mL de LPS por 3 horas. Citometria de fluxo foi utilizada para quantificar a porcentagem de plaquetas expressando P-selectina (CD62P⁺) na superfície. (**C**) Histogramas sobrepostos mostram a expressão de P-selectina em plaquetas tratadas com LPS ou NS1 na presença de 100 µg/mL de Polimixina B. As barras representam média ± erro padrão da média de 5 experimentos independentes com plaquetas obtidas de voluntários diferentes. * $p < 0.05$ comparado com não estimulado; # $p < 0.05$ comparado com o veículo B; ns = não significativo.

5.3 NS1 do DENV2 estimula a secreção de mediadores pró-inflamatórios

As plaquetas são capazes de secretar citocinas e quimiocinas estocadas em grânulos. Contudo, a secreção destes mediadores varia de maneira dependente do estímulo aplicado (BERTHET et al., 2012). Então, nós investigamos o perfil de mediadores inflamatórios secretados por plaquetas isoladas de voluntários saudáveis estimuladas com NS1_{EC}. Com essa finalidade, nós investigamos a secreção de duas quimiocinas, PF4/CXCL4 e RANTES/CCL5, além das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , MIF e IL-1 β , e da citocina anti-inflamatória TGF- β , através da dosagem por ELISA.

Nossos resultados demonstram que a NS1_{EC}, nas maiores concentrações (5 e/ou 50 μ g/mL), estimulou a secreção das quimiocinas PF4/CXCL4 e RANTES/CCL5 e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e MIF em comparação com as plaquetas não estimuladas (Figura 11 A e B). No entanto, ao quantificarmos a secreção de TGF- β após estímulo com NS1 do DENV2, percebemos que não houve aumento da secreção desta citocina em nenhuma das concentrações e tempos testados (Figura 11 C). Além disso, a concentração de IL-1 β ficou abaixo da curva padrão em todas as condições avaliadas. Juntos, estes resultados indicam que a NS1 do DENV2 estimula a secreção plaquetária de mediadores de perfil pró-inflamatório estocados em grânulos.

De modo semelhante à P-selectina, a polimixina B não foi capaz de inibir significativamente a secreção das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias pelas plaquetas estimuladas com NS1_{EC}, quando comparadas às plaquetas não tratadas com polimixina B (Figura 12 A, C, D e E). Por outro lado, a polimixina B na concentração de 100 μ g/mL diminuiu significativamente a secreção de PF4/CXCL4 induzida por LPS em relação às plaquetas não tratadas com polimixina B (Figura 12 B). Estes resultados mostram que a secreção dos mediadores pró-inflamatórios é mediada pela NS1 do DENV2, não sendo influenciada por LPS contaminante.

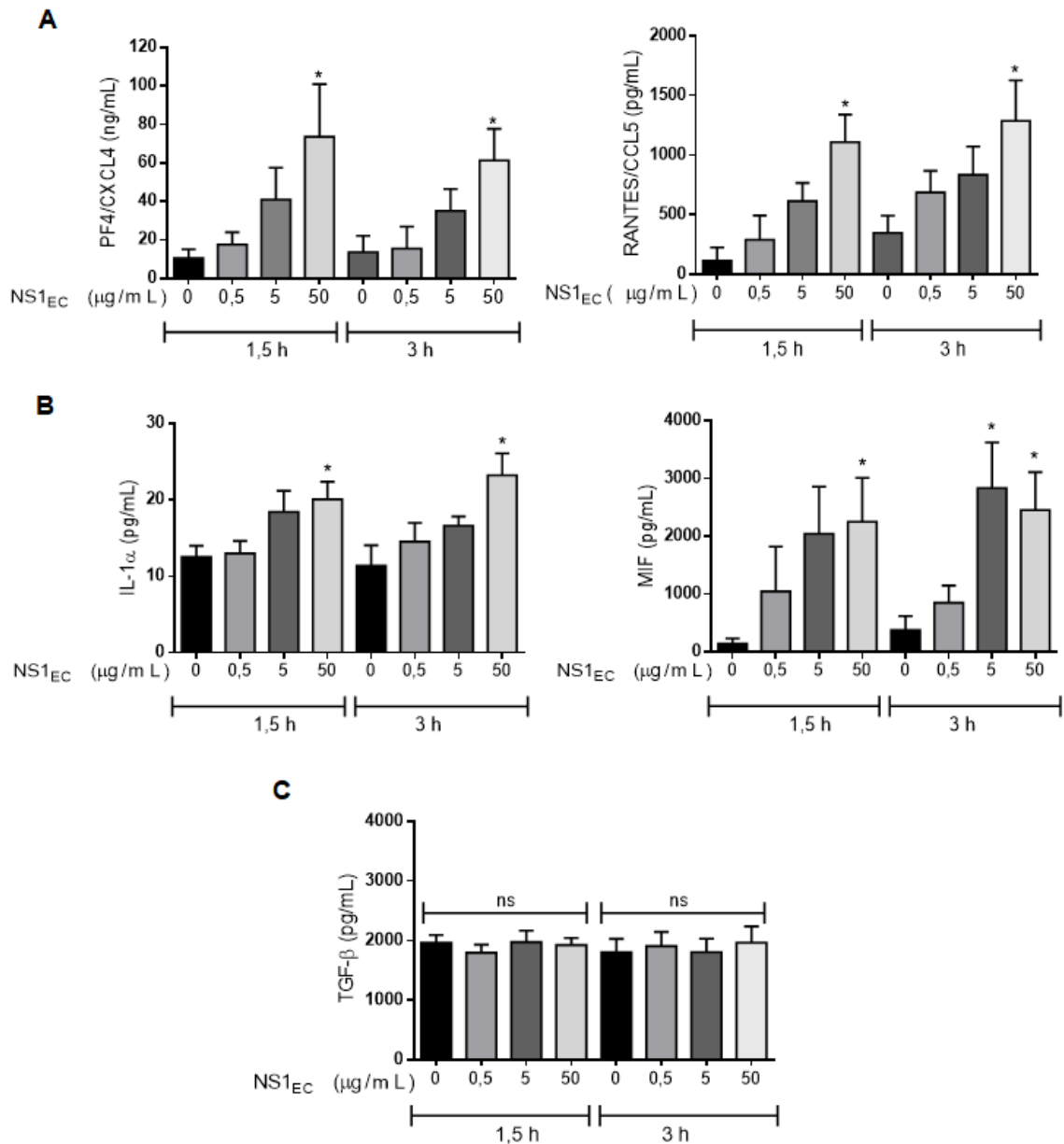


Figura 11: Plaquetas estimuladas com NS1 do DENV2 secretam mediadores inflamatórios estocados em grânulos. Concentração de mediadores inflamatórios secretados por plaquetas estimuladas com 0, 0,5, 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de NS1 do DENV2 recombinante produzida em *E. coli* (NS1_{EC}) por 1,5 ou 3 horas. Os gráficos mostram as concentrações dos seguintes mediadores: **(A)** as quimiocinas PF4/CXCL4 e RANTES/CCL5, **(B)** as citocinas pro-inflamatórias IL-1 α e MIF, e **(C)** a citocina antiinflamatória TGF- β . As barras representam média \pm erro padrão da média de 5 experimentos independentes com plaquetas obtidas de voluntários diferentes. * $p < 0.05$ comparado com não estimulado; ns = não significativo.

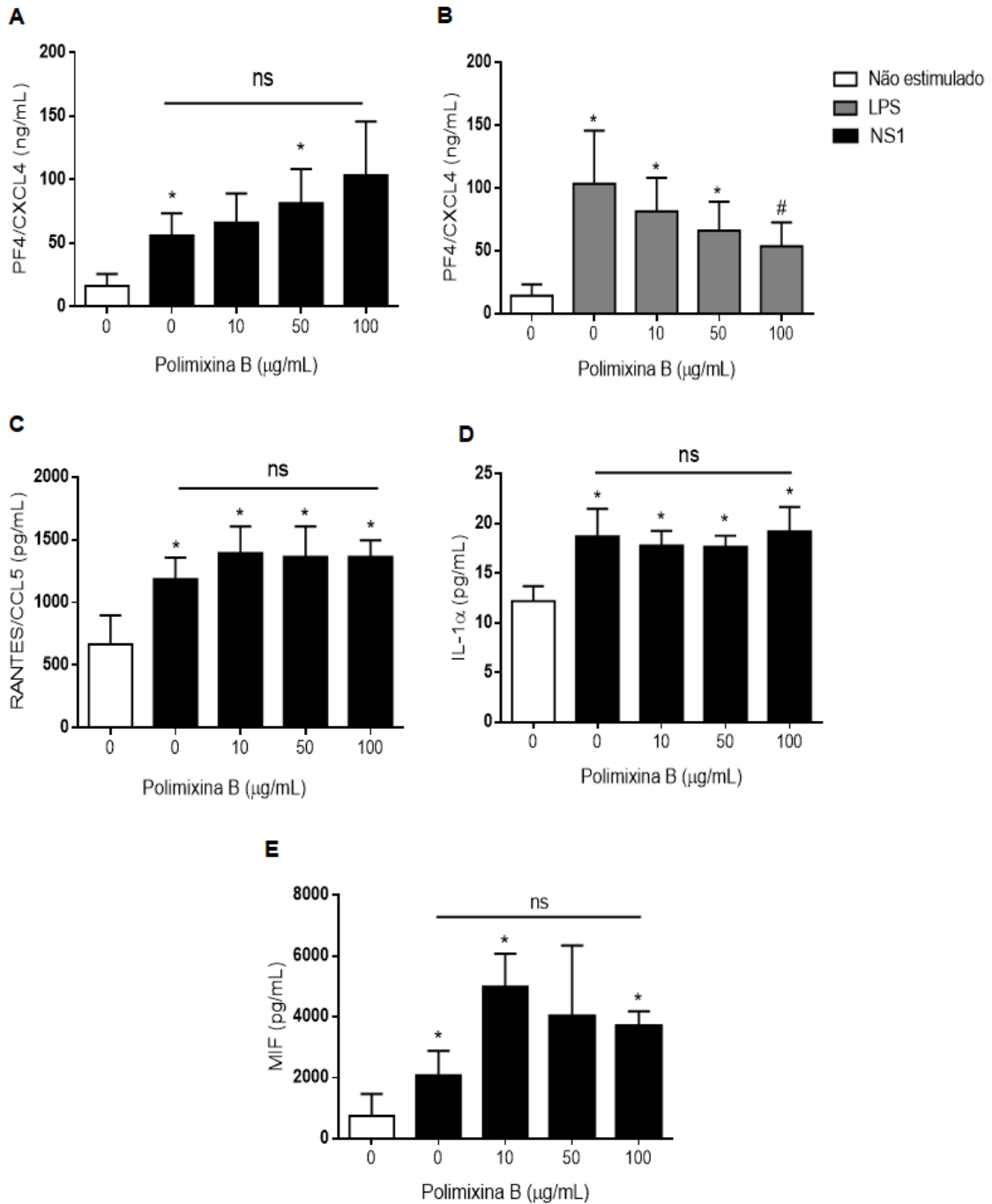


Figura 12: Plaquetas de voluntários saudáveis foram estimuladas com **(A, C, D e E)** NS1 do DENV2 recombinante produzida em *E. coli* (NS1_{EC}) (50 µg/mL) ou **(B)** LPS (10 µg/mL), na presença ou ausência de 10, 50 ou 100 µg/mL de Polimixina B. Os gráficos mostram as concentrações de **(A)** PF4/CXCL5, **(C)** RANTES/CCL5, **(D)** IL-1α, e **(E)** MIF secretados por plaquetas estimuladas com NS1_{EC} e as concentrações de **(B)** PF4/CXCL5 de plaquetas estimuladas com LPS. As barras representam média ± erro padrão da média de 5 experimentos independentes com plaquetas obtidas de voluntários diferentes. * $p < 0.05$ comparado ao não estimulado; # $p < 0.05$ entre plaquetas estimuladas com LPS tratadas ou não com polimixina B; ns: não significativo.

5.4 Pré-exposição a NS1 potencializa a ativação plaquetária por concentração sub-ótima de trombina

Em seguida, nós avaliamos se a NS1_{EC} é capaz de potencializar a ativação plaquetária induzida por concentração sub-ótima de trombina. Para isso, nós estimulamos plaquetas isoladas de voluntários saudáveis com NS1_{EC} (50 µg/mL) a 37°C e após 2 h e 50 min estimulamos as plaquetas com uma concentração subótima de trombina (0,01 U/mL) por 10 minutos.

Como observado anteriormente, a incubação por 3 horas com NS1_{EC} aumentou significativamente a expressão superficial de P-selectina nas plaquetas, além de promover a secreção plaquetária de mediadores inflamatórios estocados em grânulos, em relação às plaquetas não estimuladas (Figura 13). De forma semelhante, o estímulo com dose subótima de trombina por 10 minutos também foi capaz de estimular a expressão de P-selectina pelas plaquetas, e também induziu a secreção plaquetária dos mediadores pró-inflamatórios MIF e PF4, quando comparado com as plaquetas não estimuladas. Somado a isso, as plaquetas pré-tratadas com NS1_{EC} e estimuladas com trombina tiveram uma amplificação da expressão de P-selectina, além da potencialização da secreção de PF4/CXCL4 e MIF, em relação as plaquetas estimuladas somente com trombina (Figura 13). Estes dados indicam que a pré-exposição à NS1 potencializa a ativação plaquetária induzida por concentrações sub-ótimas de trombina.

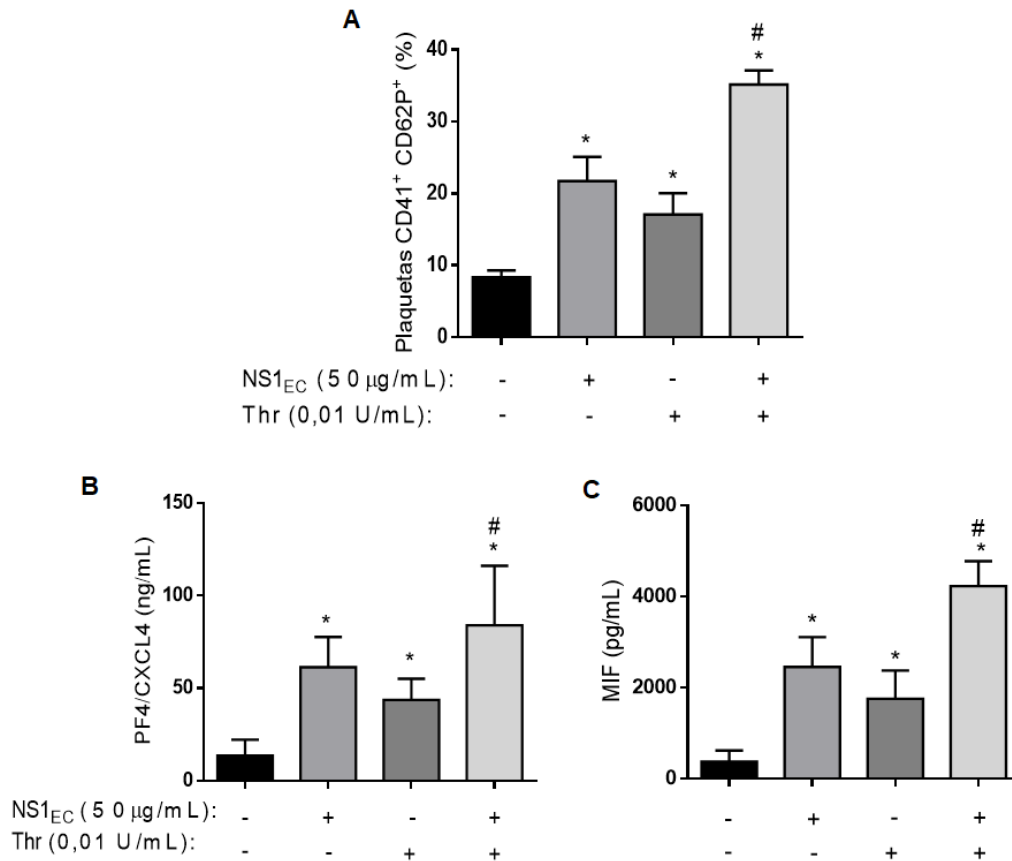


Figura 13: Pré-exposição a NS1 potencializa a ativação plaquetária por concentração sub-ótima de trombina. Plaquetas foram pré-tratadas ou não com NS1 recombinante produzida em *E. coli* (NS1_{EC}) por 2 h e 50 min a 37°C. As plaquetas foram então estimuladas ou não com 0,01 U/mL de trombina (Thr). **(A)** Citometria de fluxo foi utilizada para quantificar a porcentagem de plaquetas expressando P-selectina (CD62P⁺) na superfície. **(B-C)** Concentrações de **(B)** PF4/CXCL5 e **(C)** MIF secretados por plaquetas em cada condição. As barras representam média ± erro padrão da média de 5 experimentos independentes com plaquetas obtidas de voluntários diferentes. *p < 0.05 comparado ao não estimulado; #p < 0.05 comparado a plaquetas tratadas somente com trombina.

5.5 NS1 do DENV2 ativa plaquetas parcialmente via TLR4

Posteriormente, nós objetivamos investigar se a NS1 do DENV2 promove a ativação plaquetária através da interação com receptores TLR4 na superfície das plaquetas. Então, nós estimulamos as plaquetas obtidas de 4 voluntários saudáveis com NS1_{HEK}, na presença ou ausência de anticorpos neutralizantes anti-TLR4 ou IgG controle de mesmo isotipo, por 3 horas. Nós observamos, então, que o bloqueio com anticorpos anti-TLR4 reduziu significativamente a ativação plaquetária induzida por NS1_{HEK}, quando comparado ao grupo incubado com IgG controle (Figura 14).

Contudo, observamos que a NS1_{HEK} ainda foi capaz de aumentar significativamente a ativação plaquetária, mesmo na presença do anticorpos anti-TLR4, em relação ao grupo não estimulado (Figura 14). Esses resultados sugerem que o TLR4 participa da ativação plaquetária por NS1, mas não é o único receptor envolvido.

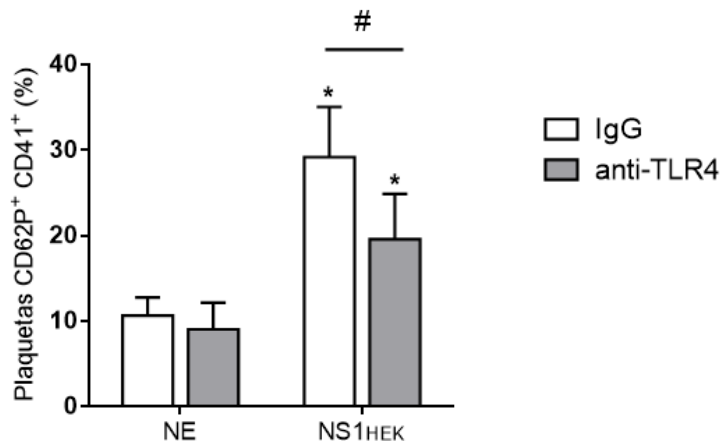


Figura 14: NS1 ativa plaquetas parcialmente via TLR4. Plaquetas de 4 voluntários saudáveis foram incubadas com 20 µg/mL de anticorpos anti-TLR4 ou IgG controle de mesmo isotipo, por 30 minutos, a 37 °C. As plaquetas foram estimuladas ou não com NS1 produzida em células HEK (NS1_{HEK}) (5 µg/mL) e incubadas por 3 horas, a 37 °C. Citometria de fluxo foi utilizada para quantificar a porcentagem de plaquetas expressando P-selectina (CD62P⁺) na sua superfície. *p < 0.05 comparado ao não estimulado; #p < 0.05 entre plaquetas incubadas com IgG ou anti-TLR4; NE: não estimulado.

5.6 Plaquetas replicam o DENV2 de maneira abortiva e secretam NS1 para o meio extracelular

Com o objetivo de avaliar se as plaquetas são capazes de replicar o DENV2, nós avaliamos a replicação e tradução do genoma viral. Para isso, plaquetas de 4 voluntários saudáveis foram infectadas ou não com DENV2 (MOI=1) por até 24 horas. O RNA viral foi quantificado por qPCR nos lisados de plaquetas e nos sobrenadantes obtidos após a infecção. Para avaliar a tradução do RNA viral, nós também analisamos por Western blot a presença da NS1 nos lisados e sobrenadantes das plaquetas infectadas. Nossos resultados demonstram um aumento significativo do RNA viral no lisado de plaquetas após 24 horas de infecção

em relação aos tempos anteriores (Figura 15 A). Contudo, não foi observado aumento do RNA viral no sobrenadante de plaquetas em nenhum dos tempos analisados. Ao analisarmos a expressão de NS1 nos lisados e nos sobrenadantes das plaquetas, observamos acúmulo de NS1 nas plaquetas infectadas, além de um aumento desta proteína no sobrenadante de maneira tempo-dependente (Figura 15 B). Juntos, estes resultados sugerem que a plaqueta é capaz de replicar o RNA viral, porém não é capaz de secretar partículas virais para o meio extracelular. Além disso, as plaquetas são capazes de sintetizar e secretar a NS1 do DENV2, mostrando que o genoma do DENV é traduzido em proteínas virais.

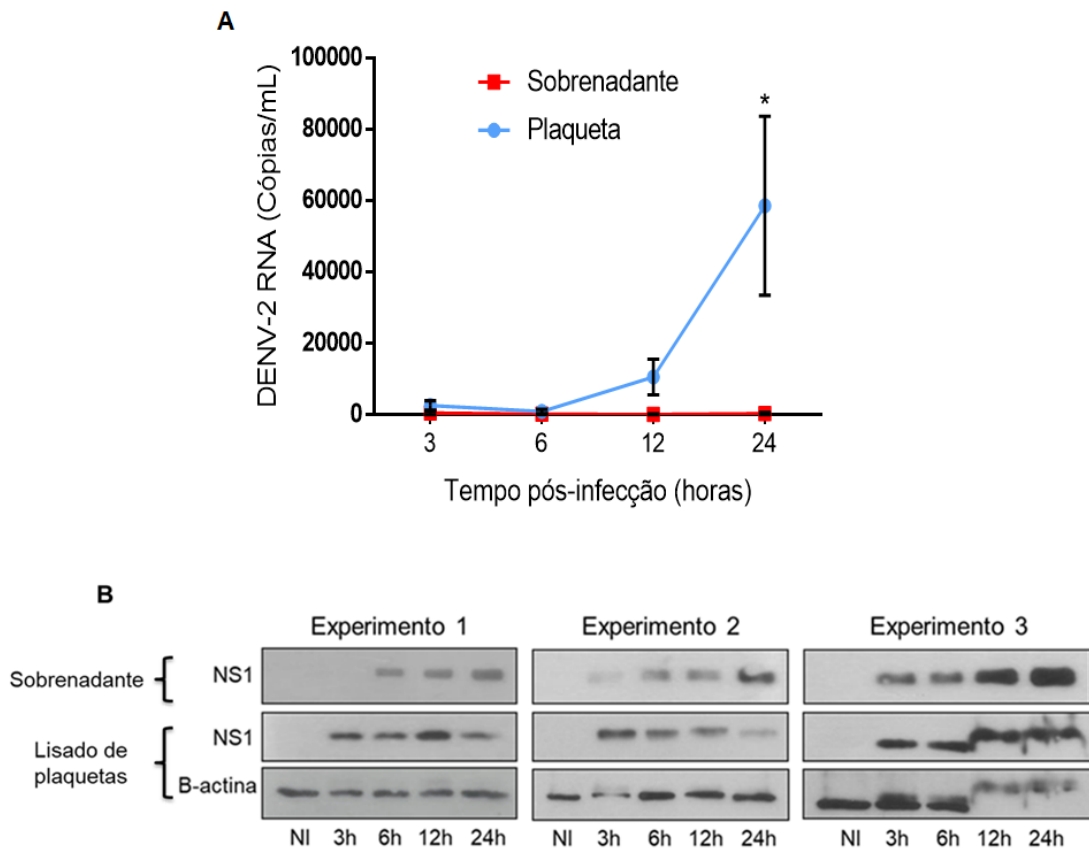


Figura 15: Plaquetas replicam o DENV2 de maneira abortiva. Plaquetas de voluntários saudáveis foram isoladas, depletadas de leucócitos, e infectadas ou não com DENV2 (MOI=1). Plaquetas infectadas foram incubadas a 37 °C. Após 1,5 horas de infecção, plaquetas foram lavadas duas vezes com meio 199 (M199). 3, 6, 12 e 24 horas após a infecção, as plaquetas foram centrifugadas e os precipitados e sobrenadantes foram recuperados para análise de **(A)** quantificação do RNA viral por qPCR e **(B)** expressão de NS1 por Western blot. A β -actina foi utilizada como controle. Os pontos representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes com plaquetas de diferentes voluntários. * $p < 0.05$ comparado aos demais tempos pós-infecção; NI: não infectado.

6 DISCUSSÃO

A NS1 tem se tornado um importante objeto de estudo da patogênese da dengue. Diversos trabalhos já demonstraram que esta proteína interage com células do sistema imune, como macrófagos e monócitos (ADIKARI et al., 2016; MODHIRAN et al., 2015). Além disso, a NS1 também interage com células do endotélio vascular, ocasionando a degradação do glicocálce do endotélio e extravasamento vascular (BEATTY et al., 2015; CHEN et al., 2016; MODHIRAN et al., 2015; PUERTA-GUARDO; GLASNER; HARRIS, 2016). Contudo, a ativação plaquetária pela NS1 ainda não havia sido investigada. A ativação de plaquetas está relacionada a mecanismos imuno-inflamatórios durante a dengue (HOTTZ et al., 2013b, 2014; MICHELS et al., 2014; OJHA et al., 2017; TRUGILHO et al., 2017). Estudos do nosso grupo já demonstraram que plaquetas isoladas de pacientes com dengue são mais ativadas em relação a plaquetas de indivíduos saudáveis, e esta maior ativação está correlacionada à apoptose das plaquetas e trombocitopenia dos pacientes (HOTTZ et al., 2013a). Além disso, a presença de agregados plaqueta-monócito no sangue de pacientes com dengue está relacionada à expressão de P-selectina, além de se associar a quadros de trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular (HOTTZ et al., 2014). Neste trabalho, nós demonstramos que a NS1 do DENV2 é capaz de ocasionar a ativação plaquetária nas concentrações de 5 e/ou 50 µg/mL, consistente com dados da literatura que demonstram concentrações de até 50 µg/mL no plasma de pacientes com dengue (ALCON et al., 2002). A ativação plaquetária foi visualizada através do aumento na porcentagem de plaquetas expressando P-selectina na membrana e da secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias.

A interação da NS1 com macrófagos e células endoteliais se dá por meio de receptores do tipo TLR4, levando à secreção de mediadores inflamatórios, além de contribuir para a resposta inflamatória e extravasamento vascular na dengue (MODHIRAN et al., 2015). Receptores TLR4 já foram descritos em plaquetas, sendo capazes de reconhecer diversos PAMPs e DAMPs, entre eles LPS e histonas extracelulares (ANDONEGUI et al., 2005; D'ATRI; SCHATTNER, 2017; STÅHL et al., 2006). No entanto, a ação da NS1 sobre estes receptores nas plaquetas ainda

não havia sido descrita. Nossos resultados demonstram que o tratamento com anticorpos anti-TLR4 inibiu parcialmente a ativação plaquetária induzida por NS1 do DENV2, mostrando que a NS1 é capaz de ativar plaquetas por meio de TLR4. Como o bloqueio do receptor TLR4 inibiu parcialmente a ação da NS1 sobre as plaquetas, nós acreditamos que outros receptores podem estar envolvidos na ativação plaquetária induzida por NS1. A NS1 é uma proteína altamente glicosilada (FLAMAND et al., 1999; YAP et al., 2017). Então, nós não descartamos a possibilidade de a NS1 ser reconhecida por PRRs do tipo CLR (do inglês *C-type lectin-like receptor*), entre eles o DC-SIGN, CLEC-2 e o receptor de manose. Os CLRs possuem domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) capazes de reconhecer glicoconjugados em PAMPs, na maioria das vezes de maneira dependente de cálcio (MONTEIRO; LEPENIES, 2017; SOILLEUX, 2003; TAYLOR, 1993). O CLEC-2 é um importante receptor plaquetário, cujo principal ligante é a podoplanina, e atua na hemostasia e em processos inflamatórios (NAVARRO-NÚÑEZ et al., 2013; RAYES; WATSON; NIESWANDT, 2019). Já o DC-SIGN, assim como o receptor de manose, é capaz de reconhecer glicoproteínas contendo resíduos de manose (MARAKALALA; NDLOVU, 2017). A NS1 é secretada na forma de uma lipoproteína de alta densidade, apresentando em seu sítio central conteúdo lipídico semelhante ao HDL (do inglês *High Density Lipoprotein*) (GUTSCHE et al., 2011). Considerando que os receptores *scavenger* CD36 são capazes de reconhecer lipoproteínas oxidadas (BRUNDERT et al., 2011; JAY et al., 2015), o CD36 pode ser um possível receptor de reconhecimento da NS1 do DENV em plaquetas.

A tempestade de citocinas é um evento importante na patogênese da dengue, uma vez que os níveis de citocinas estão associados ao extravasamento vascular, hemorragia, hipotensão, choque e diminuição na contagem de plaquetas, leucócitos e linfócitos (AZEREDO et al., 2001; BOZZA et al., 2008; CHEN et al., 2006; MALAVIGE et al., 2013; VAN DE WEG et al., 2013). Estudos já demonstraram que a interação da NS1 com células do sistema imune e células do endotélio vascular ocasiona a secreção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como MIF, IL-10, TNF- α , IL-6, IFN- β , IL-1 β e IL-12 (ADIKARI et al., 2016; MODHIRAN et al., 2015; PUERTA-GUARDO; GLASNER; HARRIS, 2016). Porém, o perfil de mediadores inflamatórios secretados por plaquetas em resposta a NS1 do DENV2 ainda não havia sido demonstrado. As plaquetas são capazes de secretar de maneira

estímulo-dependente os fatores estocados em α -grânulos, variando o perfil inflamatório destes fatores, a quantidade e a cinética de secreção de acordo com o agonista ao qual foram expostas (BERTHET et al., 2012; CHATTERJEE et al., 2011; HEIJNEN; VAN DER SLUIJS, 2015; JONNALAGADDA; IZU; WHITEHEART, 2012). Estudos já demonstraram a presença de níveis elevados de MIF no plasma de pacientes com dengue grave, sendo esta citocina relacionada ao aumento da permeabilidade do endotélio vascular e processos inflamatórios durante a dengue (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2010; CHEN et al., 2006; CHUANG et al., 2011). Além disso, já foi demonstrado que células do endotélio vascular e monócitos estimulados com MIF recombinante tiveram maior expressão de ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) e trombosmodulina, o que pode ocasionar uma desregulação do processo de coagulação (SHYU et al., 2012; YEH et al., 2013). Outrossim, níveis elevados de RANTES/CCL5, IL-1 α e PF4/CXCL4 também já foram encontradas no plasma de pacientes com dengue, estando alguns destes mediadores associados à dengue grave (FRAGNOUD et al., 2015; RATHAKRISHNAN et al., 2012; SRICHAIKUL et al., 1989; SRICHAIKUL; NIMMANNITYA, 2000; ZHAO et al., 2016). Em concordância com estes estudos, nossos resultados mostram que as plaquetas estimuladas com NS1 do DENV2 promovem a secreção das quimiocinas PF4/CXCL4 e RANTES/CCL5 e das citocinas pró-inflamatórias IL1 α e MIF, embora não seja visualizada diferença significativa na secreção da citocina anti-inflamatória TGF- β . Porém, diferentemente dos nossos resultados, Malavige e colaboradores (2012) demonstraram uma correlação positiva entre a contagem de plaquetas e os níveis plasmáticos de TGF- β em pacientes com dengue, sugerindo sua secreção pelas plaquetas. Dessa forma, não podemos descartar o estímulo à secreção de TGF- β por outros PAMPs durante a dengue. Além disso, uma limitação do nosso resultado é a falta de um controle positivo para a secreção plaquetária de TGF- β . Para superar esta limitação, as concentrações de TGF- β serão quantificadas em novos experimentos nos quais as plaquetas serão estimuladas com um agonista, como a trombina, em paralelo ao estímulo com NS1. Outrossim, estes resultados foram obtidos de plaquetas estimuladas com NS1_{EC}. Considerando que bactérias não possuem toda a maquinaria necessária para promover modificações pós-traducionais para a síntese da NS1, seria importante repetir estes experimentos utilizando NS1_{HEK}. Em conjunto, nossos resultados mostram que as plaquetas ativadas por NS1 do DENV2 secretam

mediadores de perfil pró-inflamatório, podendo contribuir para a resposta pró-inflamatória durante o curso da infecção.

A ocorrência de quadros de trombocitopenia em pacientes com dengue é um importante marcador da gravidade da doença. Esta manifestação pode ser causada por diversos fatores, entre eles a infecção de precursores hematopoiéticos e estromais na medula óssea, ou destruição das plaquetas e interação com células imunes na circulação periférica (HOTTZ et al., 2014; NAKAO; LAI; YOUNG, 1989; NOISAKRAN et al., 2009; ROTHWELL; PUTNAK; LA RUSSA, 1996; SUN et al., 2007). Além disso, citocinas relacionadas à coagulação e fibrinólise já foram encontradas no plasma de pacientes com DSS (SUHARTI et al., 2002), sugerindo que o consumo de plaquetas também pode estar relacionado à resposta inflamatória. Estudos já demonstraram a ocorrência de um aumento na geração de trombina durante o curso da dengue, o que pode contribuir para a ativação das plaquetas (KRISHNAMURTI et al., 2001). Ghosh et al. (2008) demonstrou que plaquetas estimuladas com o DENV2 têm um aumento na expressão de P-selectina, indicando ativação plaquetária, além de apresentar maior afinidade por fibrinogênio, o que também pode contribuir para a trombocitopenia encontrada em pacientes com dengue. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a NS1 é capaz de potencializar a expressão de P-selectina na superfície das plaquetas induzida por uma concentração sub-ótima de trombina, indicando maior ativação plaquetária na presença deste agonista. Além disso, as plaquetas estimuladas com concentração sub-ótima de trombina na presença de NS1 tiveram uma maior secreção da quimiocina PF4/CXCL4 e da citocina MIF. Ao analisarmos estes dados em conjunto, podemos dizer que a NS1 pode amplificar a ação da trombina, auxiliando no desenvolvimento da resposta tromboinflamatória durante a dengue através da maior ativação de plaquetas e do estímulo à resposta pró-inflamatória. No entanto, são necessários novos estudos para avaliar se esta amplificação se deve a um sinergismo entre a NS1 e a trombina ou se ocorre um efeito aditivo.

O vírus da dengue é capaz de infectar diversos tipos celulares, entre eles células dendríticas, macrófagos, monócitos, linfócitos e células do endotélio vascular (BALSITIS et al., 2009; CHEUNG et al., 2018; JESSIE et al., 2004; PERDOMO-CELIS; SALGADO; NARVÁEZ, 2017). Contudo, poucos estudos investigaram a replicação do DENV em plaquetas (KAR et al., 2017; SIMON; SUTHERLAND;

PRYZDIAL, 2015). Já foi demonstrado que plaquetas infectadas com DENV replicam o RNA viral, porém não são capazes de produzir partículas virais maduras (KAR et al., 2017; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015). Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram os achados anteriores, uma vez que o lisado de plaquetas apresentou expressão significativamente maior de cópias de RNA viral após 24 horas de infecção em relação aos tempos anteriores. Contudo, não foi encontrada diferença significativa no número de cópias do RNA viral no sobrenadante de plaquetas, mostrando a ausência de vírus no meio extracelular. Esses resultados demonstram que as plaquetas são capazes de replicar o genoma viral, porém não secretam partículas virais, o que é conhecido como replicação abortiva (PEJAWAR; PARKS; ALEXANDER-MILLER, 2005). Uma possível limitação deste resultado é o período de incubação relativamente curto. Este experimento poderia ser repetido infectando-se as plaquetas por um tempo maior, por exemplo 48 horas, e realizando-se a quantificação do número de cópias do RNA viral no sobrenadante. Contudo, KAR et al. (2017) não observaram secreção de partículas virais até 72 horas após a infecção.

A NS1, além de ser encontrada nas células infectadas, na forma de um complexo de replicação juntamente com outras proteínas não estruturais, é a única proteína viral secretada pela célula infectada (CHEN; LAI; YEH, 2018). Estudos já demonstraram a presença de altos níveis de NS1 no plasma de pacientes com DHF e em risco de evoluir para DHF, além de uma relação direta entre os níveis de NS1 e a viremia, sugerindo o envolvimento desta proteína ou do aumento da replicação viral na patogênese da dengue (LIBRATY et al., 2002; YOUNG et al., 2000). Nossos dados mostram que plaquetas de voluntários saudáveis infectadas com DENV2 são capazes de promover a síntese *de novo* de NS1 do DENV2. Um estudo de Simon et al. (2015) também demonstra que plaquetas infectadas com DENV são capazes de sintetizar NS1, corroborando nossos resultados. Além disso, o acúmulo de NS1 de maneira tempo-dependente no sobrenadante de plaquetas infectadas com DENV2 demonstra que as plaquetas são capazes de secretar a NS1 sintetizada. Estes dados em conjunto mostram que as plaquetas são capazes de traduzir o RNA do DENV2, sintetizando a NS1, além de secretar esta proteína para o meio extracelular. Contudo, novos estudos serão realizados para investigar se a NS1 secretada por

plaquetas é capaz de interagir com outras células ou com as próprias plaquetas, contribuindo para a patogênese da dengue.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados nos mostram que a NS1 do DENV2 é capaz de promover ativação plaquetária, levando à translocação de α -grânulos contendo a molécula de adesão P-selectina e mediadores inflamatórios para a superfície da célula (Figura 16). Além disso, a ativação plaquetária induzida por NS1 do DENV2 promove a secreção das citocinas IL-1 α e MIF e das quimiocinas PF4/CXCL4 e RANTES/CCL5, mas não do TGF- β , caracterizando um perfil pró-inflamatório, podendo contribuir para o processo inflamatório na dengue (Figura 16).

Somado a isso, os resultados anteriores mostram que as plaquetas infectadas pelo DENV2 conseguem traduzir o RNA viral, levando à síntese de NS1, além de secretarem esta proteína para o meio extracelular (Figura 16). Outrossim, as plaquetas são capazes de replicar o genoma viral, porém não conseguem montar ou secretar as partículas virais. Assim, as plaquetas promovem uma replicação abortiva, que no entanto, contribui para os níveis secretados de NS1 que podem amplificar a resposta imuno-inflamatória durante a dengue. Finalmente, nossos resultados demonstram que o receptor TLR4 está envolvido na ativação plaquetária por NS1 do DENV2. Contudo, outros receptores celulares também podem estar envolvidos na ativação das plaquetas pela NS1.

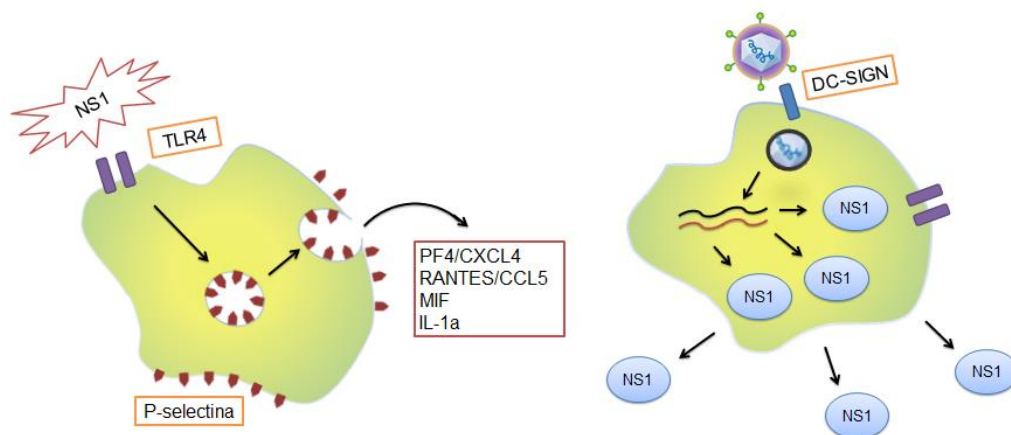


Figura 16: Esquema representativo da ativação plaquetária com NS1 do DENV2 e replicação abortiva do DENV2 em plaquetas.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; PADMANABHAN, R. *De Novo* Synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-dependent RNA Polymerase Exhibits Temperature Dependence at the Initiation but Not Elongation Phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39926–39937, 26 out. 2001.

ADIKARI, T. N. et al. Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 184, n. 1, p. 90–100, abr. 2016.

AHMED, N. H.; BROOR, S. Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase. **Journal of vector borne diseases**, v. 51, n. 3, p. 194–9, set. 2014.

AKEY, D. L. et al. Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection. **BioEssays**, v. 37, n. 5, p. 489–494, maio 2015.

ALAYLI, F.; SCHOLLE, F. Dengue virus NS1 enhances viral replication and pro-inflammatory cytokine production in human dendritic cells. **Virology**, v. 496, p. 227–236, set. 2016.

ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376–81, fev. 2002.

ALI, R. A.; WUESCHER, L. M.; WORTH, R. G. Platelets: essential components of the immune system. **Current trends in immunology**, v. 16, p. 65–78, 2015.

ALLISON, S. L. et al. Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4268–4275, 1 maio 2001.

ALLONSO, D. et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. **Journal of virological methods**, v. 175, n. 1, p. 109–16, jul. 2011.

AMÂNCIO, F. F. et al. Dengue virus serotype 4 in a highly susceptible population in Southeast Brazil. **Journal of infection and public health**, v. 7, n. 6, p. 547–52, nov. 2014.

AMARASINGHE, A. et al. Dengue Virus Infection in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 1349–54, ago. 2011.

ANDONEGUI, G. et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2417–2423, 1 out. 2005.

APPANNA, R. et al. Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. **PloS one**, v. 5, n. 9, p. e13029, 28 set. 2010.

APPANNA, R. et al. Cytokine factors present in dengue patient sera

induces alterations of junctional proteins in human endothelial cells. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 5, p. 936–42, 7 nov. 2012.

ASLAM, R. et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 637–41, 15 jan. 2006.

ASSUNÇÃO-MIRANDA, I. et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 1, p. 218–28, jan. 2010.

AVIRUTNAN, P. et al. Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. e183, nov. 2007.

AZEREDO, E. et al. Characterisation of Lymphocyte Response and Cytokine Patterns in Patients with Dengue Fever. **Immunobiology**, v. 204, n. 4, p. 494–507, dez. 2001.

BALSITIS, S. J. et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 3, p. 416–24, mar. 2009.

BARCELLOS, C.; LOWE, R. Expansion of the dengue transmission area in Brazil: the role of climate and cities. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 2, p. 159–168, fev. 2014.

BARTENSCHLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 155–165, abr. 2008.

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, p. 304ra141-304ra141, 9 set. 2015.

BERTHET, J. et al. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. **Clinical Immunology**, v. 145, n. 3, p. 189–200, dez. 2012.

BHARDWAJ, S. et al. Biophysical Characterization and Vector-Specific Antagonist Activity of Domain III of the Tick-Borne Flavivirus Envelope Protein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 4002–4007, 15 abr. 2001.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 7 abr. 2013.

BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. **Blood reviews**, v. 23, n. 4, p. 177–89, jul. 2009.

BOZZA, F. A. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 86, 25 jun. 2008.

BRABANT, M. et al. A flavivirus protein M-derived peptide directly

permeabilizes mitochondrial membranes, triggers cell death and reduces human tumor growth in nude mice. **Apoptosis**, v. 14, n. 10, p. 1190–1203, 20 out. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016. 2017a. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classica-ate-2016.pdf> . Acesso em: 23/08/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos graves confirmados, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016. 2017b. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Graves-ate-2016.pdf> . Acesso em: 23/08/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Óbitos por Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/obitos-ate-2016.pdf> . Acesso em: 23/08/2018.

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 8, p. e1760, 7 ago. 2012.

BRAY, M.; LAI, C. J. Dengue virus premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 505–8, nov. 1991.

BROGREN, H. et al. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. **Blood**, v. 104, n. 13, p. 3943–8, 15 dez. 2004.

BRUNDERT, M. et al. Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. **Journal of lipid research**, v. 52, n. 4, p. 745–58, abr. 2011.

CATTEAU, A. et al. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 10, p. 2781–2793, 1 out. 2003.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649–688, out. 1990.

CHAPMAN, L. M. et al. Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 916–923, 15 jul. 2012.

CHATTERJEE, M. et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3907–3911, 7 abr. 2011.

CHEN, H.-R. et al. Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. e0004828, 13 jul. 2016.

CHEN, H.-R. et al. Macrophage migration inhibitory factor is critical for dengue NS1-induced endothelial glycocalyx degradation and hyperpermeability. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1007033, 27 abr. 2018.

CHEN, H.-R.; LAI, Y.-C.; YEH, T.-M. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 1, p. 58, 24 dez. 2018.

CHEN, J.; NG, M. M.-L.; CHU, J. J. H. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1005053, 30 jul. 2015.

CHEN, L.-C. et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 74, n. 1, p. 142–7, jan. 2006.

CHEN, S. et al. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 291, 7 out. 2017.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature medicine**, v. 3, n. 8, p. 866–71, ago. 1997.

CHEN, Y. C.; WANG, S. Y.; KING, C. C. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 2650–7, abr. 1999.

CHEUNG, K. T. et al. Involvement of caspase-4 in IL-1 beta production and pyroptosis in human macrophages during dengue virus infection. **Immunobiology**, v. 223, n. 4–5, p. 356–364, abr. 2018.

CHUANG, Y.-C. et al. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 222–231, maio 2011.

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, 25 abr. 2007.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**, v. 80, n. 23, p. 11418–31, 1 dez. 2006.

COGNASSE, F. et al. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 2, p. 196–198, abr. 2005.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 155–170, 1 mar. 2015.

D'ATRI, L. P.; SCHATTNER, M. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 22, p. 1867–1883, 2017.

DE ARAÚJO, J. M. G. et al. Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 9, p. 952–4, set. 2009.

DE NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 181–189, ago. 2015.

DENIS, M. M. et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. **Cell**, v. 122, n. 3, p. 379–91, 12 ago. 2005.

DHANOVA, A. et al. Risk factors and clinical outcome of profound thrombocytopenia in adult patients with DENV infections. **Platelets**, v. 28, n. 7, p. 724–727, 3 out. 2017.

EGLOFF, M.-P. et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 11, p. 2757–2768, 3 jun. 2002.

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, 26 jun. 2014.

FARES, R. C. G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

FLAMAND, M. et al. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 6104–10, jul. 1999.

FRAGNOUD, R. et al. Differential proteomic analysis of virus-enriched fractions obtained from plasma pools of patients with dengue fever or severe dengue. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 518, 14 dez. 2015.

FURIE, B.; FURIE, B. C.; FLAUMENHAFT, R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. **Thrombosis and haemostasis**, v. 86, n. 1, p. 214–21, jul. 2001.

GARRAUD, O.; COGNASSE, F. Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells? **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 70, 20 fev. 2015.

GOPALA REDDY, S. B.; CHIN, W.-X.; SHIVANANJU, N. S. Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. **Biochemical Pharmacology**, v. 154, p. 54–63, ago. 2018.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100–3, fev. 2002.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 55–7, jun. 1995.

GUBLER, D. J.; MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Advances in virus research**, v. 53, p. 35–70, 1999.

GUIRAKHOO, F.; BOLIN, R. A.; ROEHRIG, J. T. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 921–31, dez. 1992.

GUTSCHE, I. et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 19, p. 8003–8008, 10 maio 2011.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12supp, p. S7–S16, dez. 2010.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Archives of virology**, v. 158, n. 7, p. 1445–59, 8 jul. 2013.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 31 jan. 2015.

HADINEGORO, S. R. S. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? **Paediatrics and International Child Health**, v. 32, n. sup1, p. 33–38, 12 maio 2012.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 42, n. 5, p. 350–62, abr. 1970.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4839, p. 476–81, 29 jan. 1988.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Advances in virus research**, v. 60, p. 421–67, 2003.

HAMBURGER, S. A.; MCEVER, R. P. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. **Blood**, v. 75, n. 3, p. 550–4, 1 fev. 1990.

HEIJNEN, H.; VAN DER SLUIJS, P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, n. 12, p. 2141–2151, dez. 2015.

HIDARI, K. I. P. J.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S37–S43, dez. 2011.

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 2013a.

HOTTZ, E. D. et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3405–3414, 14 nov. 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, 15 ago. 2014.

HOTTZ, E. D.; BOZZA, F. A.; BOZZA, P. T. Platelets in Immune Response to Virus and Immunopathology of Viral Infections. **Frontiers in Medicine**, v. 5, p. 121, 30 abr. 2018.

ISLAM, R. et al. Dengue epidemiology and pathogenesis: images of the future viewed through a mirror of the past. **Virologica Sinica**, v. 30, n. 5, p. 326–43, 20 out. 2015.

ISTÚRIZ, R. E.; GUBLER, D. J.; BREA DEL CASTILLO, J. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. **Infectious disease clinics of North America**, v. 14, n. 1, p. 121–40, ix, mar. 2000.

IVANYI-NAGY, R. et al. RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 3, p. 712–25, fev. 2008.

JAY, A. G. et al. CD36 Binds Oxidized Low Density Lipoprotein (LDL) in a Mechanism Dependent upon Fatty Acid Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 8, p. 4590–4603, 20 fev. 2015.

JESSIE, K. et al. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 15 abr. 2004.

JINDADAMRONGWECH, S.; THEPPARIT, C.; SMITH, D. R. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. **Archives of Virology**, v. 149, n. 5, p. 915–927, 1 maio 2004.

JONES, C. T. et al. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. **Journal of virology**, v. 77, n. 12, p. 7143–9, jun. 2003.

JONNALAGADDA, D.; IZU, L. T.; WHITEHEART, S. W. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. **Blood**, v. 120, n. 26, p. 5209–5216, 20 dez. 2012.

JUFFRIE, M. et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 702–7, fev. 2000.

KALAYANAROOJ, S. et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. **The Journal of infectious diseases**, v. 176, n. 2, p. 313–21, ago. 1997.

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. ofx051, 2017.

KATZELNICK, L. C. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 929–932, 17 nov. 2017.

KITTIGUL, L. et al. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of virological methods**, v. 90, n. 1, p. 51–7, out. 2000.

KLEMA, V. J. et al. Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 2, p. e1005451, 19 fev. 2016.

KOURI, G. P. et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 67, n. 4, p. 375–80, 1989.

KRAEMER, B. F. et al. Novel Anti-bacterial Activities of β -defensin 1 in Human Platelets: Suppression of Pathogen Growth and Signaling of Neutrophil Extracellular Trap Formation. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002355, 10 nov. 2011.

KRISHNAMURTI, C. et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 6, p. 840–7, dez. 2001.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–25, 8 mar. 2002.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, 14 jan. 2011.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 30, n. 5–6, p. 329–40, set. 2007.

LAN, N. T. P. et al. Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. e304, 1 out. 2008.

LANGER, H. F. et al. Platelets Recruit Human Dendritic Cells Via Mac-1/JAM-C Interaction and Modulate Dendritic Cell Function In Vitro. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 6, p. 1463–1470, jun. 2007.

LIBRATY, D. H. et al. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, 15 out. 2002.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4611–21, jun. 1999.

LITTAUA, R.; KURANE, I.; ENNIS, F. A. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 8, p. 3183–6, 15 abr. 1990.

LU, Y.-C.; YEH, W.-C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–151, maio 2008.

LUO, D. et al. Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 1, p. 173–183, 1 jan. 2008.

MAIRIANG, D. et al. Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito. **PloS one**, v. 8, n. 1, p.

e53535, 11 jan. 2013.

MALAVIGE, G. N. et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 341, 24 dez. 2013.

MARAKALALA, M. J.; NDLOVU, H. Signaling C-type lectin receptors in antimycobacterial immunity. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. e1006333, 22 jun. 2017.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 225, n. 1, p. 300–313, out. 2008.

MATSUURA, C. et al. Nitric oxide activity in platelets of dengue haemorrhagic fever patients: the apparent paradoxical role of ADMA and I-NMMA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 3, p. 174–179, mar. 2012.

MENDES-RIBEIRO, A. C. et al. DENGUE FEVER ACTIVATES THE L-ARGININE-NITRIC OXIDE PATHWAY: AN EXPLANATION FOR REDUCED AGGREGATION OF HUMAN PLATELETS. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 10, p. 1143–1146, out. 2008.

METRI, B.; JYOTHI, P. Correlation of serological markers and platelet count in the diagnosis of Dengue virus infection. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, n. 1, p. 26, 2015.

MICHELS, M. et al. Platelet function alterations in dengue are associated with plasma leakage. **Thrombosis and haemostasis**, v. 112, n. 2, p. 352–62, 4 ago. 2014.

MIDDLETON, E. A.; WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A. Platelets in Pulmonary Immune Responses and Inflammatory Lung Diseases. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1211–1259, out. 2016.

MILLER, J. L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e17, 8 fev. 2008.

MILLER, S. et al. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8873–8882, 23 mar. 2007.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 304ra142-304ra142, 9 set. 2015.

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, maio 2017.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–73, Table of Contents, abr. 2009.

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, 15 jul. 2003.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 6, p. 3821–9, 15 mar. 2006.

MONTEIRO, J.; LEPENIES, B. Myeloid C-Type Lectin Receptors in Viral Recognition and Antiviral Immunity. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 59, 22 mar. 2017.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 1 jan. 2005.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, maio 2013.

MUNOZ-JORDAN, J. L. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14333–14338, 25 nov. 2003.

MURTHY, P. et al. The NLRP3 inflammasome and bruton's tyrosine kinase in platelets co-regulate platelet activation, aggregation, and in vitro thrombus formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 483, n. 1, p. 230–236, 29 jan. 2017.

MUSTAFA, A. S. et al. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 30, n. 3, p. 229–33, abr. 2001.

NAKAO, S.; LAI, C. J.; YOUNG, N. S. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1235–40, set. 1989.

NAVARRO-NÚÑEZ, L. et al. The physiological and pathophysiological roles of platelet CLEC-2. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 109, n. 06, p. 991–998, 22 nov. 2013.

NAYAK, V. et al. Crystal Structure of Dengue Virus Type 1 Envelope Protein in the Postfusion Conformation and Its Implications for Membrane Fusion. **Journal of Virology**, v. 83, n. 9, p. 4338–4344, 1 maio 2009.

NISALAK, A. et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 2, p. 191–202, fev. 2003.

NISHAT, S.; WUESCHER, L. M.; WORTH, R. G. Platelets Enhance Dendritic Cell Responses against *Staphylococcus aureus* through CD40-CD40L. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 9, 18 jun. 2018.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiology**

and infection, v. 111, n. 1, p. 163–70, ago. 1993.

NOISAKRAN, S. et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 40, n. 2, p. 253–62, mar. 2009.

NUNES, P. C. G. et al. 30 years of dengue fatal cases in Brazil: a laboratorial-based investigation of 1047 cases. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 346, 27 dez. 2018.

O'REILLY, E. K.; KAO, C. C. Analysis of RNA-Dependent RNA Polymerase Structure and Function as Guided by Known Polymerase Structures and Computer Predictions of Secondary Structure. **Virology**, v. 252, n. 2, p. 287–303, 20 dez. 1998.

OJHA, A. et al. Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 41697, 31 dez. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue control: Epidemiology. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/> . Acesso em: 18/07/2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue and severe dengue. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> . Acesso em: 18/09/2018.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Dengue incidence rate. 2017a. Disponível em: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-regional-en/315-reg-dengue-incidence-en.html> . Acesso em: 23/08/2018.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Dengue mortality number and rate. 2017b. Disponível em: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-regional-en/262-reg-dengue-mortality-en.html> . Acesso em: 23/08/2018.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 1, p. 43–5, jan. 2007.

PEJAWAR, S. S.; PARKS, G. D.; ALEXANDER-MILLER, M. A. Abortive versus Productive Viral Infection of Dendritic Cells with a Paramyxovirus Results in Differential Upregulation of Select Costimulatory Molecules. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12, p. 7544–7557, 15 jun. 2005.

PERDOMO-CELIS, F.; SALGADO, D. M.; NARVÁEZ, C. F. Magnitude of viremia, antigenemia and infection of circulating monocytes in children with mild and severe dengue. **Acta Tropica**, v. 167, p. 1–8, mar. 2017.

PETTI, C. A. et al. Laboratory Medicine in Africa: A Barrier to Effective Health Care. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 3, p. 377–382, 1 fev. 2006.

PONG, W.-L. et al. RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-interacting proteins. **FEBS Letters**, v. 585, n. 16, p. 2575–2581, 19 ago. 2011.

PUERTA-GUARDO, H. et al. The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability. **Journal of virology**, v. 87, n. 13, p. 7486–501, 1 jul. 2013.

PUERTA-GUARDO, H.; GLASNER, D. R.; HARRIS, E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005738, 14 jul. 2016.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 131, 29 dez. 2016.

RATHAKRISHNAN, A. et al. Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52215, 20 dez. 2012.

RAYES, J.; WATSON, S. P.; NIESWANDT, B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 1, p. 12–23, 2 jan. 2019.

REIS, S. R. N. I. et al. An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 983–90, dez. 2007.

REYES-DEL VALLE, J. et al. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. **Journal of virology**, v. 79, n. 8, p. 4557–67, 15 abr. 2005.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244–51, 14 abr. 1997.

ROTHWELL, S. W.; PUTNAK, R.; LA RUSSA, V. F. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 54, n. 5, p. 503–10, maio 1996.

SANDER, H. J. et al. Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and beta thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 4, p. 1277–1287, 1 out. 1983.

SANGKAWIBHA, N. et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. **American journal of epidemiology**, v. 120, n. 5, p. 653–69, nov. 1984.

SCHMID, M. A.; DIAMOND, M. S.; HARRIS, E. Dendritic cells in dengue virus infection: targets of virus replication and mediators of immunity. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 647, 17 dez. 2014.

SCHWERTZ, H. et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 11, p. 2433–40, 30 out. 2006.

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, 18 ago. 2011.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO, J. E.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 264–274, 1 abr. 2011.

SHYU, L.-Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor induces ICAM-1 and thrombomodulin expression in vitro. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 1, p. 43–49, jan. 2012.

SILVEIRA, G. F. et al. Human T Lymphocytes Are Permissive for Dengue Virus Replication. **Journal of virology**, v. 92, n. 10, p. e02181-17, 15 mar. 2018.

SIMON, A. Y.; SUTHERLAND, M. R.; PRYZDIAL, E. L. G. Dengue virus binding and replication by platelets. **Blood**, v. 126, n. 3, p. 378–385, 16 jul. 2015.

SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 48–53, jan. 2005.

SOILLEUX, E. J. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 104, n. 4, p. 437–46, abr. 2003.

SRICHAIKUL, T. et al. Platelet function during the acute phase of dengue hemorrhagic fever. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 20, n. 1, p. 19–25, mar. 1989.

SRICHAIKUL, T.; NIMMANNITYA, S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 13, n. 2, p. 261–276, jun. 2000.

STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8475–81, nov. 1997.

STÄHL, A. et al. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 167–76, 1 jul. 2006.

STRÜSSMANN, T. et al. Platelets are a previously unrecognised source of MIF. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 110, n. 11, p. 1004–1013, 4 dez. 2013.

SUHARTI, C. et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. **Thrombosis and haemostasis**, v. 87, n. 1, p. 42–6, jan. 2002.

SUN, D.-S. et al. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. **Journal of**

Thrombosis and Haemostasis, v. 5, n. 11, p. 2291–2299, nov. 2007.

SWARBRICK, C. M. D. et al. NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 22, p. 12904–12920, 15 dez. 2017.

TASSANEETRITHEP, B. et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 7, p. 823–9, 7 abr. 2003.

TAYLOR, M. E. Recognition of complex carbohydrates by the macrophage mannose receptor. **Biochemical Society transactions**, v. 21, n. 2, p. 468–73, maio 1993.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. suppl 1, p. S7–S18, 2009.

THISYAKORN, U.; THISYAKORN, C. Dengue: a global threat. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet**, v. 98 Suppl 1, p. S118-22, jan. 2015.

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, 19 maio 2017.

TUISKUNEN BÄCK, A.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, n. 1, p. 19839, 30 jan. 2013.

VAN DE WEG, C. A. M. et al. Microbial Translocation Is Associated with Extensive Immune Activation in Dengue Virus Infected Patients with Severe Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2236, 23 maio 2013.

VIEIRA-DE-ABREU, A. et al. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 1, p. 5–30, 6 jan. 2012.

VILCARROMERO, S. et al. Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 is Associated with a Severe Dengue Outbreak in the Peruvian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 3, p. 611–620, 3 set. 2014.

VOGEL, S. et al. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. **Blood Advances**, v. 2, n. 20, p. 2672–2680, 23 out. 2018.

WANG, S.-H.; SYU, W.-J.; HU, S.-T. Identification of the homotypic interaction domain of the core protein of dengue virus type 2. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 8, p. 2307–2314, 1 ago. 2004.

WELSCH, S. et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, p. 365–375, 23 abr. 2009.

WENCEL-DRAKE, J. D. et al. Ultrastructural localization of human platelet

thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von Willebrand factor in frozen thin section. **Blood**, v. 65, n. 4, p. 929–38, abr. 1985.

WENGLER, G.; WENGLER, G. The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. **Virology**, v. 184, n. 2, p. 707–15, out. 1991.

WEYRICH, A. S. et al. Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 10, p. 5556–61, 12 maio 1998.

WEYRICH, A. S. et al. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 7, n. 2, p. 241–6, fev. 2009.

WONG, S.-S. et al. The dengue virus M protein localises to the endoplasmic reticulum and forms oligomers. **FEBS Letters**, v. 586, n. 7, p. 1032–1037, 5 abr. 2012.

XU, T. et al. Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4 Å. **Journal of Virology**, v. 79, n. 16, p. 10278–10288, 15 ago. 2005.

YAP, S. S. L. et al. Dengue Virus Glycosylation: What Do We Know? **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1415, 2017.

YEH, T.-M. 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**, v. 8, n. 1, p. e55018, 28 jan. 2013.

YONG, Y. K. et al. Aberrant monocyte responses predict and characterize dengue virus infection in individuals with severe disease. **Journal of translational medicine**, v. 15, n. 1, p. 121, 31 dez. 2017.

YOUN, S. et al. Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 13, p. 7360–7371, 1 jul. 2012.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053–7, mar. 2000.

ZHANG, Y. et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure (London, England : 1993)**, v. 12, n. 9, p. 1607–18, set. 2004.

ZHAO, L. et al. Slow resolution of inflammation in severe adult dengue patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 291, 14 dez. 2016.

YUNG, C.-F. et al. Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 92, n. 5, p. 999–1005, 6 maio 2015.