

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAMILA MACIEL DE SOUSA

**Análise de fatores celulares e moleculares envolvidos na
trombocitopenia da infecção pelo vírus dengue**

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CAMILA MACIEL DE SOUSA

**Análise de fatores celulares e moleculares envolvidos na
trombocitopenia da infecção pelo vírus dengue**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Professor Doutor Luis Hildebrando
Pereira da Silva

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa, Camila Maciel de.

Análise de fatores celulares e moleculares envolvidos na trombocitopenia da infecção pelo vírus dengue / Camila Maciel de Sousa; orientador Luis Hildebrando Pereira da Silva. – Ribeirão Preto, 2008.

111 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Dengue. 2. Trombocitopenia. 3. Plaquetas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Maciel de Sousa

Análise de fatores celulares e moleculares envolvidos na trombocitopenia da infecção pelo vírus dengue

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Com muito amor dedico este trabalho aos meus pais, Fátima Cristina Gimenez e Jorge Bauléo e, a minha avó materna Aparecida Reigota Gimenez, pelo apoio incondicional que têm sido a grande razão e o maior incentivo para a realização desta tese e da minha carreira profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os Professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e de outras instituições com as quais tive contato durante esses anos de doutorado. Todos eles, de forma direta ou indiretamente, contribuíram para o meu aprendizado e para o bom andamento do meu trabalho. Entre eles gostaria de agradecer especialmente:

Ao *Professor Doutor Luis Hildebrando Pereira da Silva*, agradeço pela confiança, pelo incentivo, pelas oportunidades de aprendizado e por toda sua contribuição para meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por me conduzir pelos caminhos, ora floridos, ora espinhosos dessa jornada. Toda a minha gratidão pelo zelo com que cuidou do meu caminhar através dessa estrada tortuosa que é a Ciência. Agradeço pelos momentos de crescimento, mas também pelas conversas e pelos momentos de alegria e descontração passados nos deliciosos jantares com “pato” no tucupi.

Aos Professores *Doutor Benedito Antônio Lopes da Fonseca*, *Doutor Luis Tadeu Moraes Figueiredo*, *Doutor Victor Hugo Aquino Quintana*, *Doutor Sérgio Oliveira de Paula* e *Doutora Arlete Aparecida Martins Coelho Castelo*, agradeço a atenção no breve contato que tivemos, pelas sugestões que contribuíram para a finalização desse trabalho e também por participarem da avaliação do meu trabalho

Ao *Professor Doutor Douglas Golenbock*, agradeço por sua colaboração, pela disponibilidade, pelas sugestões e por ter me fornecido os anticorpos para os experimentos de Citometria de Fluxo.

Ao *Professor Doutor Ricardo Gazzinelli*, agradeço pela sua disponibilidade em ajudar sempre que necessário e por ter me acolhido em seu laboratório, apesar da minha curta estadia.

Ao *Professor Doutor Mauro Martins Teixeira*, agradeço a oportunidade de aprendizado em Imunologia e pelo investimento na minha formação profissional durante as semanas que eu fiquei em seu laboratório na Universidade Federal de Minas Gerais. Agradeço pela convivência agradável.

À *Professora Doutora Lis Antonelli*, agradeço por ter me acolhido tão gentilmente em seu laboratório na Universidade Federal de Minas Gerais, agradeço pela disponibilidade e pela oportunidade de aprendizado sobre Citometria de Fluxo. Agradeço pela convivência agradável, e apesar da minha curta estadia em seu laboratório, foi com certeza um momento de muito aprendizado.

Ao *Professor Doutor Antônio Rossi Filho*, agradeço a atenção e disponibilidade em todos os momentos que eu necessitei, pelo o apoio e o auxílio na minha ida para Porto Velho.

À *Professora Doutora Vera Engrácia*, agradeço por ser sempre tão atenciosa e disponível, pelo convite para ministrar as aulas no MTC-I, pelas conversas e por sempre me auxiliar nos momentos em que eu precisei.

Ao *Doutor Mauro Tada*, agradeço pela convivência agradável, pela amizade e pela disponibilidade para ajudar sempre que eu precisei.

Ao *Doutor Dhélio Batista Pereira* e sua esposa *Christiane Pereira*, agradeço pela amizade sincera, por estarem ao meu lado me apoiando em momentos de dificuldade, obrigada.

Ao *Professor Doutor Juan Miguel Villalobos Salcedo*, agradeço pelo seu constante interesse e por ter sido sempre muito atencioso e prestativo comigo e com meu trabalho.

Ao *Professor Doutor Weber Cheli Batista*, agradeço pela receptividade e pela delicadeza com que me tratou durante o tempo em que fiquei no Laboratório de Virologia e por me ceder vírus sempre que preciso.

Ao *Professor Doutor Eduardo Honda*, agradeço pela convivência sempre muito agradável e pelas conversas que tornam o trabalho no laboratório melhor.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, agradeço por serem sempre tão atenciosos e disponíveis. Em especial à *Maria Ivone Campos Fonseca*, por estar alegre e disponível para ajudar sempre que preciso mesmo a três mil quilômetros de distância.

À minhas queridas amigas *Carolina Bioni, Izaltina Silva Jardim, Kellen Günther e Patrícia Vicente*, agradeço pela amizade sincera, por estarem sempre ao meu lado me apoiando em momentos de dificuldade e compartilhando comigo momentos de alegria. Em especial à *Flávia Serrano* pelo convívio amigo onde pude encontrar apoio em momentos de dificuldade e partilhar momentos de alegria e realizações.

Às Amigas *Deusilene Souza Vieira, Glauciane da Silva Bifano e Quéssia Mamani*, agradeço pela amizade, pelo convívio e por sempre me auxiliarem nos momentos em que eu precisei.

Aos funcionários do CEPEM e IPEPATRO em especial a *Rosi, Vânia Barros Vieira, Marlene Donato, Ercília Holanda Silva e Paulo de Lima Santos*, agradeço pela convivência agradável e por serem tão atenciosos e disponíveis.

À Faculdade São Lucas, agradeço pelo apoio em minhas viagens para as aulas e experimentos da pós-graduação. Em especial às coordenações dos cursos de Ciências Biológicas, Fisioterapia, Medicina, Nutrição e Odontologia pela compreensão e apoio.

Ao *Alexandre Andrade Canosa*, agradeço pelo amor, carinho, por ser uma pessoa muito especial, por me entender, pelo menos na maioria das vezes, e me incentivar sempre. Por estar sempre perto nos momentos em que precisei.

Agradeço à minha família pela força e incentivos constantes e, sobretudo pela confiança depositada em mim. Acima de tudo agradeço aos meus pais, Fátima e Jorge, que sempre me incentivaram a seguir meus ideais e nunca deixaram que eu desistisse dos meus sonhos. Eles me ampararam em todos os momentos de dificuldade, me alegrando e me dando ânimo nos momentos de tristeza.

E agradeço também a todos que direta ou indiretamente me ajudaram no decorrer do meu trabalho e que por esquecimento, neste momento de tantas atribulações, não estão aqui citados.

RESUMO

SOUSA, C. M. **Análise de fatores celulares e moleculares envolvidos na trombocitopenia da infecção pelo vírus dengue**. 2008. 111f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

As plaquetas na circulação normalmente não aderem ao endotélio vascular. Algumas vezes, em resposta a distúrbios na hemostasia por injúria vascular ou a fatores imunológicos, as plaquetas ativadas aderem às células endoteliais estimuladas. O aumento da aderência das plaquetas ativadas as células do endotélio vascular estimuladas pode contribuir para a trombocitopenia observada em muitas patologias inclusive na infecção pelo vírus dengue. Em nosso estudo, verificamos um aumento na aderência das plaquetas em HUVEC e CHO, transfectadas com genes dos receptores CD36, ICAM-1 ou VCAM-1 quando estas foram infectadas pelo vírus dengue sorotipo 3 ou estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados pelo mesmo vírus. Além da aderência plaquetária foi avaliado, por citometria de fluxo em CHO, a presença dos receptores CD36, ICAM-1 e VCAM-1. Nossos resultados sugerem que em uma infecção pelo vírus dengue a resposta imunológica do hospedeiro causa distúrbios na hemostasia que ocasionam um seqüestro das plaquetas via moléculas de adesão do endotélio vascular para o espaço pericapilar, contribuindo assim com a trombocitopenia e em consequência disto as hemorragias ocasionadas nesta virose.

Palavras chaves: dengue, trombocitopenia e plaquetas.

ABSTRACT

SOUSA, C. M. **Analysis of the cellular and molecular factors involved in thrombocytopenia in dengue virus infections.** 2008. 111f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Platelet in circulation normally does not adhere to the vascular endothelium. Some times, in reply the riots in the hemostasis for vascular injury or immunological factors, platelets activated adhere in stimulated endothelial cells. The increase of the adhesion of platelets activated in stimulated cells of the vascular endothelium can also contribute for the thrombocytopenia observed in much pathology, in infection for dengue virus, for example. In our study, we verify an increase in the adhesion of platelets in HUVEC and CHO, transfected with genes of receptors CD36, ICAM-1 or VCAM-1 when these had been infected by the serotype 3 dengue virus or stimulated with supernatants of macrophages infected for the same virus. Beyond the adhesion of platelets it was evaluated, for flow cytometry in CHO, the presence of receptors CD36, ICAM-1 and VCAM-1. Our results suggest that in an infection for the dengue virus affection the immunological reply of the host cause riots in the hemostasis that cause a kidnapping of platelets it saw molecules of adhesion of the vascular endothelium space to pericapillary it, thus contributing with the thrombocytopenia and in consequence of this the hemorrhages caused in this infection.

Keywords: dengue, thrombocytopenia and platelets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imunopatologia da DHF/DSS.....	28
Figura 2 – Esquema do endotélio onde foi perdida a regulação da permeabilidade vascular e da hemostasia, em função de uma resposta inflamatória e imunológica.....	32
Figura 3 – Esquema das moléculas de adesão de células endoteliais e seus principais receptores.....	36
Figura 4 – Reação de imunofluorescência indireta em HUVEC infectadas pelo DENV-3.....	59
Figura 5 – Ensaio de adesão de plaquetas em HUVEC.....	62
Figura 6 – Ensaio de adesão de plaquetas em CHO/CD36.....	67
Figura 7 – Ensaio de adesão de plaquetas em CHO/ICAM-1.....	67
Figura 8 – Ensaio de adesão de plaquetas em CHO/VCAM-1.....	68
Figura 9 – Ensaio de adesão de plaquetas em CHO745.....	68
Figura 10 – Ensaio de adesão de plaquetas em CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 infectadas pelo DENV-3.....	70
Figura 11 – Ensaio de adesão de plaquetas em CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3.....	72
Figura 12 – Análise do citometro de fluxo quanto ao tamanho e granulosidade da linhagem celular CHO.....	75
Figura 13 – Análise do receptor CD36 em CHO/CD36 infectadas pelo DENV-3.....	75

Figura 14 – Análise do receptor VCAM-1 em CHO/VCAM-1 infectadas pelo DENV-3.....	76
Figura 15 – Análise do receptor ICAM-1 em CHO/ICAM-1 infectadas pelo DENV-3.....	76
Figura 16 – Análise das CHO745, infectadas pelo DENV-3, quanto aos receptores CD36, ICAM-1 e VCAM-1 em sua superfície.....	77
Figura 17 – Análise do receptor CD36 em CHO/CD36 estimulada com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3.....	79
Figura 18 – Análise do receptor ICAM-1 em CHO/ICAM-1 estimulada com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DEN-3.....	79
Figura 19 – Análise do receptor VCAM-1 em CHO/VCAM-1 estimulada com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3.....	80
Figura 20 – Análise das CHO745, estimulada com sobrenadante de macrófagos, quanto aos receptores CD36, ICAM-1 e VCAM-1 em sua superfície.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil das linhagens CHO utilizadas.....	46
Tabela 2 – Ensaio de adesão de plaquetas em linhagem CHO infectada com DENV-3.....	64
Tabela 3 - Ensaio de adesão de plaquetas em linhagem CHO estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados com DENV-3.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Aumento Dependente de Anticorpo
CHO	Célula Ovariana de Hamster
CSA	Sulfato de Condroitina A
D.O.	Densidade Óptica
DHF	Febre Hemorrágica da Dengue
DSS	Síndrome do Choque da Dengue
DENV-3	Vírus Dengue Sototipo 3
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GP	Glicoproteínas Plaquetárias
HUVEC	Célula Endotelial da Veia Umbilical Humana
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
mAc	Anticorpos Monoclonais
MIAF	<i>Mouse Immuneascitic Fluid</i>
PAF	Fator Ativador Plaquetário
PBS	Tampão Salina Fosfato
PECAM	Molécula de Adesão de Plaquetas e Células Endoteliais
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
SFB	Soro Fetal Bovino

SH	Soro Humano
TMB	3, 3', 5, 5' Tetrametil Benzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VCAM	Molécula de Adesão da Célula Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O VÍRUS DENGUE	19
1.2 ASPECTOS HISTÓRICOS DO VÍRUS DENGUE	22
1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	23
1.4 PATOGENIA DA DENGUE E QUADRO CLÍNICO	24
1.5 ENDOTÉLIO VASCULAR	29
1.6 MOLÉCULAS DE ADESÃO	33
1.7 TROMBOCITOPENIA	37
1.8 ADESÃO PLAQUETÁRIA	38
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 VÍRUS	44
3.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DA VEIA UMBILICAL HUMANA	44
3.3 CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER	46
3.4 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO POR DENSIDADE	47
3.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE MONÓCITOS	48
3.6 OBTENÇÃO DE SORO HUMANO	48
3.7 PLAQUEAMENTO DE CHO E HUVEC	49
3.8 INFECÇÃO DA CULTURA DE CHO E HUVEC COM DENV-3	49
3.9 INFECÇÃO DA CULTURA DE MACRÓFAGOS COM DENV-3	50

3.10 REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA	51
3.11 SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM DENV-3 EM MONOCAMADAS DE CHO E HUVEC	52
3.12 BIOTINILAÇÃO DAS PLAQUETAS	52
3.13 ENSAIO DE ADESÃO PLAQUETÁRIA	53
3.14 CITOMETRIA DE FLUXO	54
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4 RESULTADOS	57
4.1 INFECÇÃO DE HUVEC COM DENV-3	58
4.2 ANÁLISE DA ADERÊNCIA PLAQUETÁRIA EM HUVEC INFECTADAS PELO DENV-3 OU ESTIMULADAS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS PELO DENV-3	60
4.3 ADERÊNCIA PLAQUETÁRIA EM CHO INFECTADAS PELO DENV-3 OU ESTIMULADAS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR DENV-3	63
4.4 COMPARAÇÃO DA ADERÊNCIA PLAQUETÁRIA ENTRE CHO ESTIMULADAS DIRETAMENTE, POR DENV-3, LPS OU MEIO RPMI, COM AS CÉLULAS QUE RECEBERAM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS	66
4.5 COMPARAÇÃO DA ADERÊNCIA PLAQUETÁRIA ENTRE CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 E CHO/VCAM-1 INFECTADAS POR DENV-3	69
4.6 COMPARAÇÃO DA ADERÊNCIA PLAQUETÁRIA ENTRE CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 E CHO/VCAM-1 ESTIMULADAS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR DENV-3	71
4.7 ANÁLISE DOS RECEPTORES NA MEMBRANA DAS CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 E CHO/VCAM-1 INFECTADAS PELO DENV-3	73

4.8 ANÁLISE DOS RECEPTORES NA MEMBRANA DAS CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 E CHO/VCAM-1 ESTIMULADAS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS PELO DENV-3	78
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Considerações gerais sobre o vírus dengue

A dengue é atualmente a doença mais importante causada por um arbovírus no mundo, as arboviroses são infecções virais provenientes de artrópodes. Anualmente as infecções com o vírus dengue vêm ocasionando mais de 50 milhões de casos de dengue clássico, aproximadamente 250 mil casos da dengue hemorrágica/síndrome do choque da dengue (DHF/DSS) e 2,5 a 3 bilhões de pessoas correm o risco de contrair a infecção (GUBLER, 2004; BENTE; RICO-HESSE, 2006). Nos últimos vinte anos tem sido observado um aumento significativo na atividade epidêmica, expansão da distribuição geográfica, transmissão contínua de vários sorotipos e emergências de febre hemorrágica em áreas onde a doença não era prevalente.

A dengue é a virose de transmissão vetorial mais relevante em termos de morbidade e mortalidade, sendo transmitida no repasto sanguíneo pela fêmea do mosquito do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti* (FIGUEIREDO; BENEDITO In: FOCACCIA; VERONESI, 2002). Esta virose está presente nos grandes centros urbanos de várias regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, sob a forma de surtos epidêmicos de grande magnitude ou sob a forma hiperendêmica, nos lugares onde há um ou mais sorotipos circulantes do vírus (TEIXEIRA et al., 1999).

O vírus dengue é esférico envelopado e com projeções em sua superfície, onde a proteína E é a maior proteína do envelope viral, é glicosilada e seus resíduos de cisteína formam pontes dissulfídicas que são importantes determinantes antigênicos. O vírus dengue classifica-se em quatro sorotipos antigenicamente distintos, denominados dengue sorotipo 1, dengue sorotipo 2, dengue sorotipo 3 e dengue sorotipo 4 segundo Scherer (1968 apud FOCACCIA; VERONESI, 2002), estando classificados como um complexo dentro da família

Flaviviridae. Cada um desses sorotipos possui diversos genótipos que diferenciam entre si por variações na seqüência de nucleotídeos. Apesar da variação de nucleotídeos ocorrer em todo o genoma, essa variação é mais estudada nos genes que constituem a proteína E, do envelope viral e, da junção dessa proteína com a proteína não estrutural 1 (NS1) (CALISHER et al., 1989), uma das sete proteínas não estruturais que é responsável pela maturação do vírus, sendo ainda responsável pela fixação do complemento (MACKENZIE et al., 1996). Os virions maduros apresentam genoma viral constituído de RNA de fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 11 kilobases e com peso molecular de $3,3 \times 10^6$ daltons. Medem aproximadamente 50 nm de diâmetro, apresentam capsídeo de simetria icosaédrica e são envoltos por uma membrana lipoprotéica (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos pode produzir manifestações que variam desde uma síndrome viral inespecífica apresentando um quadro febril, até um quadro grave e algumas vezes fatal de febre hemorrágica, que é caracterizado por uma desordem na hemostasia e aumento da permeabilidade vascular, ou ainda, a DSS, que sem um tratamento adequado pode levar o paciente a óbito em até seis horas. Segundo Tauil (2001). São fatores de risco para os casos graves: a cepa do sorotipo do vírus infectante, o estado imunológico, a concomitância com outras doenças prévias por outro sorotipo viral da doença, a idade e a genética do indivíduo.

As manifestações da dengue podem se apresentar como infecções assintomáticas, mas são os quadros graves da doença hemorrágica os principais responsáveis pelos altos índices de morbidade e mortalidade, sendo uma das principais causas de mortalidade infantil no sudeste asiático. Nas Américas, sendo todos os grupos etários ainda suscetíveis, mesmo à forma menos grave da doença, a dengue é responsável por uma grande perda econômica, pois afeta principalmente a população economicamente ativa. Clinicamente as formas mais graves da dengue são de difícil diagnóstico, sendo confundidas com outras doenças caracterizadas por

distúrbios da permeabilidade capilar (HENCHAL; PUTNAK, 1990). O extravasamento vascular é uma marca na febre hemorrágica da dengue, onde o endotélio vascular serve como uma peneira molecular que a água e pequenos solutos cruzam livremente, enquanto fica restrita a passagem de moléculas maiores (MICHEL, 1998). Essa barreira vascular é essencial para a manutenção da concentração de proteínas no plasma assim como no fluido intersticial.

O pico da viremia nos estágios iniciais da infecção tem correlação com a fase mais grave da doença, e os fatores virais e do hospedeiro se apresentam como determinantes no sucesso da replicação viral (VAUGHN et al., 2000). Há considerações evidenciando que a circulação prévia de anticorpos anti-dengue é um fator de risco predominante na predisposição a DHF, aumentando a infecção via anticorpos dependente, pelo aumento da penetração viral em células dispendo de receptores Fc, como por exemplo, os macrófagos (HALSTEAD, 1988).

Os fatores responsáveis pelo aparecimento da dengue e da DHF, como um problema de saúde pública são apontados como sendo: as mudanças sociais, o aumento da densidade demográfica acompanhada de uma urbanização descontrolada, o decaimento na infraestrutura da saúde pública e a não implementação de um controle efetivo do mosquito nas áreas onde o dengue é endêmico, principalmente nos países tropicais em desenvolvimento (GUBLER, 1987; GUBLER; CLARK, 1994; GUBLER,1997). Outro fator citado como responsável pela emergência global da dengue e da DHF seria o aumento das viagens aéreas entre centros populacionais do mundo, como mecanismo de transporte do vírus dengue ou de outros patógenos incubados nos passageiros (GUBLER, 1987; GUBLER; CLARK, 1994; RIGAU-PÉREZ et al., 1994; GUBLER,1997).

O diagnóstico definitivo da infecção pelo vírus dengue pode ser realizado hoje somente em laboratório, pelo isolamento viral, detecção de antígenos virais e RNA em soro

ou tecidos do paciente, ou ainda, da detecção de anticorpos específicos no soro dos indivíduos contaminados (KING et al., 1991; GUZMAN; KOURI, 1996).

Cinco testes sorológicos básicos têm sido utilizados para diagnóstico da infecção por dengue, inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, teste de neutralização, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) tipo captura e sanduíche. Porém mesmo estes possuem limitação, tal como, a necessidade de altos títulos de anticorpos específicos para diagnosticarem a doença. Além disto, os níveis de anticorpos na infecção por dengue apenas começam a ser detectado, em média após o quinto dia do contágio, inviabilizando desta forma um precoce diagnóstico.

1.2 – Aspectos históricos do vírus dengue

O vírus dengue e o vírus da febre amarela foram uns dos primeiros microrganismos a serem denominados vírus e descritos como agentes filtráveis e submicroscópicos em 1902 e 1907. Durante a primeira década do século XX, o vírus dengue mostrou ser transmitido por artrópodes, mas não foi isolado até o ano de 1943 (FIELDS et al., 2001). Somente mais tarde, foi que se alcançou o conhecimento e a tecnologia necessária para o desenvolvimento de pesquisas laboratoriais com esses agentes. As primeiras evidências do ciclo de transmissão do dengue foram publicadas por Bancroft (1906 apud FOCACCIA; VERONESI, 2002), que levantou a hipótese do mosquito da espécie *Aedes aegypti* ser o vetor da infecção, o que depois foi confirmado por Siler et al. (1926 apud FOCACCIA; VERONESI, 2002) e Simmons et al. (1931 apud FIELDS et al., 2001). Com isso, foi possível estabelecer os elos epidemiológicos envolvidos na transmissão da doença: mosquito infectado, homem

susceptível, homem infectado, mosquito infectado novamente (MARTINEZ-TORRES, 1990 apud TEIXEIRA et al., 1999).

O isolamento do vírus dengue só ocorreu na década de 40, por Kimura (1943) e por Hotta (1944), tendo-se denominado esta cepa Mochizuki (HOTTA; KIMURA, 1952 apud FIELDS, 2001). Sabin e Schlesinger em 1945 isolaram a cepa Hawaii, sendo que, neste mesmo ano Sabin ao identificar outro vírus em Nova Guiné, observou que as cepas tinham características antigênicas diferentes da primeira cepa isolada (SABIN, 1952 apud FOCACCIA; VERONESI, 2002). Em 1956 no curso da epidemia pelo vírus dengue no sudeste asiático, novos isolados apresentaram novamente características antigênicas diferentes (MARTINEZ-TORRES, 1990 apud TEIXEIRA et al., 1999).

Em 1968, já havia milhares de isolamentos do vírus dengue e uma grande confusão em relação à classificação dos mesmos. Foi quando Scherer sugeriu ao comitê da Organização Mundial da Saúde a classificação do vírus dengue em quatro tipos distintos, agrupados com base na relação antigênica entre eles, assim denominou-se as primeiras cepas descritas sorotipo 1, a cepa da Nova Guiné sorotipo 2 e aos isolados no sudeste asiático como sendo sorotipos 3 e 4 (SCHERER, 1968 apud FOCACCIA; VERONESI, 2002).

1.3 – Aspectos epidemiológicos

Nas Américas, o *Aedes aegypti* é o único transmissor do vírus dengue com importância epidemiológica. Esta espécie de mosquito é originária da África, onde se adaptou ao ambiente doméstico criado pelo homem, tornando-se antropofílico (DYE, 1992 apud TEIXEIRA et al., 1999). As larvas do mosquito vetor são encontradas em depósitos artificiais

de água, tais como caixas d'água, pneus, garrafas, enfim tudo que acumule água. Estas características de adaptação do vetor permitiram que se tornassem abundantes nas cidades e facilmente transportados para outras áreas por meio de transportes terrestres, aéreos ou marítimos, o que fez que aumentasse a sua competência vetorial, ou seja, sua habilidade em se infectar, se reproduzir e transmitir o vírus dengue (ROSEN, 1988).

O *Aedes albopictus* é uma espécie oriunda das selvas asiáticas e até recentemente restrita aquele continente, nos últimos anos disseminou-se pelas Américas através do transporte marítimo intercontinental (RODHAIN et al. apud TEIXEIRA et al., 1999).

A distribuição e a frequência das infecções pelo vírus dengue estão intrinsecamente relacionadas com a plasticidade de adaptação do *Aedes aegypti* ao ambiente habitado pelo homem, e distingue-se de outras doenças infecciosas e parasitárias, pois sua ocorrência não está relacionada com más condições sociais e econômicas das populações (BARRETO et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2003).

É complexa a inter-relação dos fatores envolvidos na dinâmica da circulação dos quatro isotipos do vírus dengue, o que gera incertezas sobre os determinantes das suas apresentações epidemiológicas.

1.4 – Patogenia da dengue e quadro clínico

Em crianças mais velhas e adultos jovens a infecção com o vírus dengue frequentemente produz uma síndrome característica referida como dengue clássico, que apresenta febre alta, acompanhada de cefaléia, dor retrocular, mialgias, artralgias afetando os punhos, dedos, tornozelos e artelhos, embora as articulações maiores também possam ser

atingidas; algumas vezes cursa com anorexia, náuseas e vômito (WATERMAN; GUBLER, 1989; HAYES; GUBLER, 1992). Observa-se também, o aparecimento de manifestações hemorrágicas leves ou graves, tais como exantema, epistaxe e petéquias após o terceiro dia, sendo proeminente no tórax, no dorso, nos braços e nas pernas (KURANE et al., 1992; MONATH; HEINZ, 1996 apud FIELDS, 2001). A fase aguda dura de 3 a 7 dias, porém, a convalescença pode-se prolongar por semanas e estar associada com prostração e depressão, especialmente em adultos.

Acredita-se que existam duas formas opostas de resposta imunológica ao vírus dengue, a primeira previne e propicia a recuperação nas infecções e a segunda relaciona-se a imunopatologia da dengue hemorrágica (HALSTEAD, 1988).

A primeira forma de resposta esta relacionada com a infecção primária pelo dengue que estimula a produção de anticorpos do isotipo IgM, detectáveis a partir de 2 a 3 dias após o início dos sintomas, atingindo um nível mais elevado por volta de 7 a 8 dias e a partir daí sofre um lento declínio, passando a não ser mais detectado após alguns meses. A partir do quarto dia após o início dos sintomas os anticorpos do isotipo IgG são observados em baixos níveis, mas elevam-se gradualmente atingindo altos valores em 2 semanas e mantém-se detectáveis por vários anos, conferindo imunidade contra o sorotipo do vírus infectante, provavelmente por toda vida.

A segunda forma da resposta imunológica ao vírus dengue é paradoxal, pois prejudica o hospedeiro previamente infectado, sendo responsável pela DHF/DSS, esta resposta, a base de IgG, não é restrita a anticorpos neutralizantes do vírus, mas sua afinidade é suficiente para fixar a partícula viral e facilitar sua penetração em células através do receptor Fc (KURANE et al., 1992; HALSTEAD, 1971 apud FOCACCIA; VERONESI, 2002; WELSH; ROTHMAN, 2003).

Alguns indivíduos infectados com o vírus dengue desenvolvem uma síndrome grave e algumas vezes fatal. O quadro clínico da DHF inicia-se de forma similar ao dengue clássico. Os fenômenos hemorrágicos surgem no segundo ou terceiro dia da doença, com petéquias na face, véu palatino, axilas e extremidades. Podem ainda ocorrer púrpuras e grandes equimoses na pele, epistaxes, gengivorragias, metrorragias e hemorragias digestivas moderadas. A esplenomegalia, hematêmese e dor abdominal indicam mal prognósticos, com provável evolução para choque (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 1988).

Os sintomas relacionados à DSS costumam surgir entre o terceiro e o sétimo dia da doença, mantendo-se neste estado crítico por 12 a 24 horas. Os pacientes mostram-se agitados e em alguns casos refere à dor abdominal, posteriormente tornam-se letárgicos, sem febre e com sinais de insuficiência circulatória como: pele fria, manchada e congestionada, cianose perioral, pulso rápido e sudorese fria. A pressão arterial torna-se convergente, baixa ou imensurável. Instala-se a acidose metabólica e a coagulação intravascular disseminada, com a ausência de tratamento o óbito costuma ocorrer de quatro a seis horas (NOGUEIRA et al., 1991; VASCONCELOS et al., 1994). A DHF/DSS tem como base fisiopatológica uma resposta imunológica anômala envolvendo leucócitos, citocinas e imuno-complexos, causando aumento da permeabilidade por má função do endotélio vascular, sem destruição do mesmo, mas com queda da pressão arterial e manifestações hemorrágicas associadas à trombocitopenia (HOBER et al., 1993).

A patogênese da forma hemorrágica da dengue não está bem definida e várias hipóteses existem (Figura 1). A maior aceitação refere-se a um fenômeno denominando “aumento da infecção mediada por anticorpos” fenômeno comum a outras infecções virais, como por exemplo, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (TAKEDA; ENNIS, 1990). Esta hipótese defende a idéia de que anticorpos adquiridos em infecções

prévias por um determinado sorotipo do vírus dengue não seriam neutralizantes ou teriam títulos muito baixos para eliminarem o sorotipo responsável pela atual infecção. Estes anticorpos se ligariam a outros epítomos do sorotipo responsável pela infecção atual, comuns aos 4 sorotipos virais, formando então, complexo vírus-anticorpo que facilitaria a penetração do vírus nas células monocitárias, células alvo em nosso organismo para replicação viral (LEI et al., 2001). A facilidade de penetração do vírus nestas células resulta em uma maior carga viral, maior intensidade da resposta imunológica a esta infecção, com aminas vasoativas e em consequência sintomas mais graves da doença (HALSTEAD, 1988).

Têm sido publicados estudos bem conduzidos que suportam o conceito do envolvimento do sistema imunológico na patogênese da infecção pelo vírus dengue que resulta na forma hemorrágica da doença (HOBER, et al.,1993; BETHELL et al., 1998). Foi sugerido que citocinas e mediadores químicos como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-1, IL-2, IL-3, interferon- γ (IFN- γ), fator de ativação plaquetária (PAF), C3a, C5a e histamina, produzidos pelos linfócitos ativados e/ou monócitos infectados, estão envolvidos nos mecanismos imunopatogênicos que induzem o aumento da permeabilidade vascular observada em pacientes com dengue hemorrágica (HOBER, et al.,1993; BETHELL et al., 1998). Rothman e Ennis (1999) propuseram um modelo de imunopatogênese com base nessas observações. Nesse modelo, infecções por vírus dengue de monócitos/macrófagos são aumentadas pelo fenômeno do ADE (aumento dependente de anticorpo) e facilitada pela síntese de IFN- γ por linfócitos T CD4+ vírus específico, que aumenta a expressão de receptores Fc. Quanto maior o número de monócitos/macrófagos infectados, maior ativação de linfócitos T, portanto, níveis maiores de citocinas e mediadores químicos. O efeito sinergista dessas proteínas induz o aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e disfunção do sistema de coagulação, conduzindo a hemorragias.

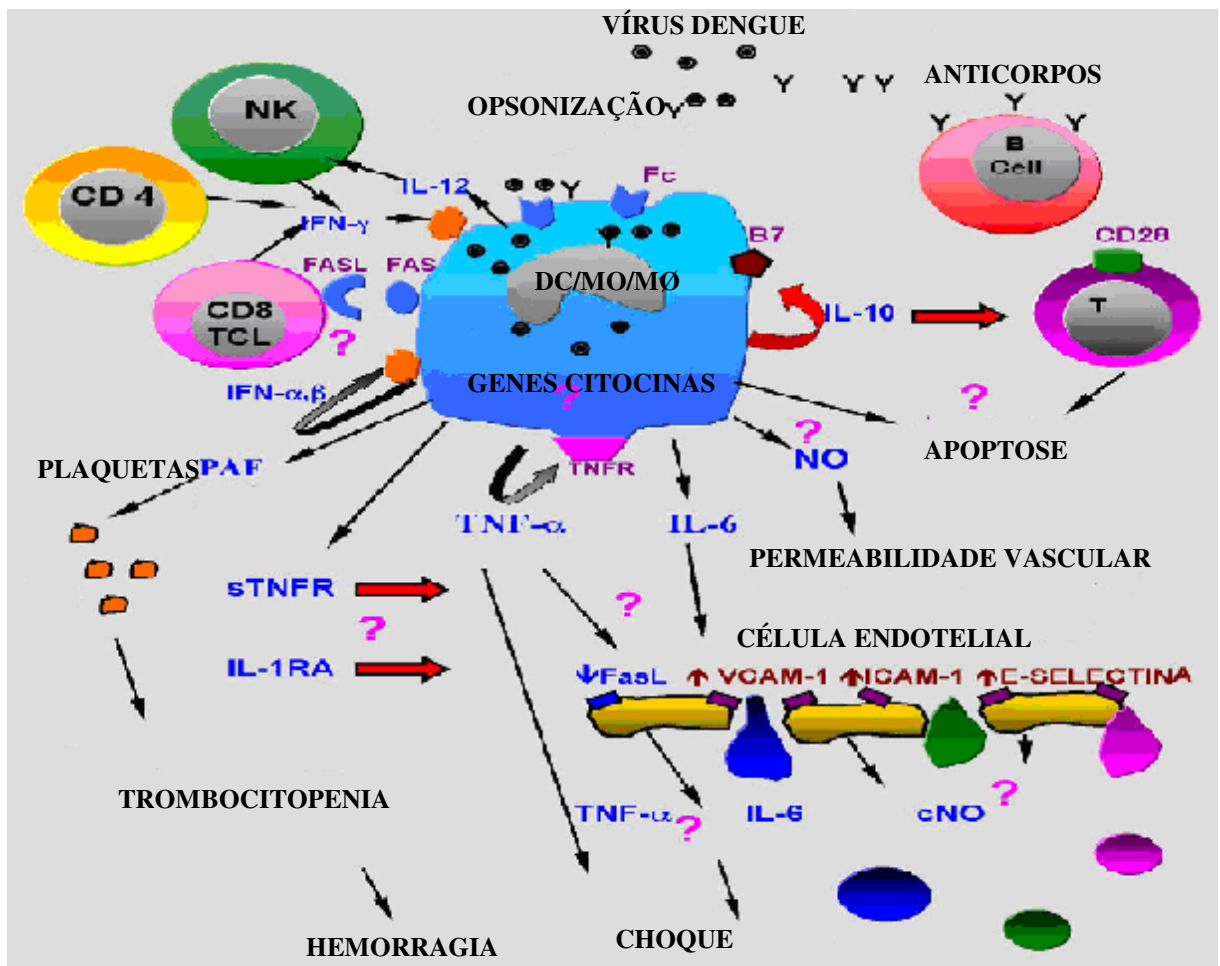


Figura 1. Imunopatologia da DHF/DSS (FIOCRUZ, 2007).

1.5 – Endotélio vascular

O endotélio vascular foi considerado durante muitos anos como uma simples barreira entre o sangue e os tecidos vizinhos. Além do endotélio atuar como uma membrana semipermeável, permitir o transporte de macromoléculas do sangue para o espaço intersticial, atualmente, é reconhecido como um sensor de mudanças das forças hemodinâmicas e da concentração de hormônios circulantes ou de substâncias vasoativas locais. Em resposta a estímulos, as células endoteliais sintetizam e liberam diversas substâncias biologicamente ativas. Os produtos de secreção endotelial atuam como sinais químicos que possibilitam a comunicação das células endoteliais não apenas entre si, mas também com células do sangue, estabelecendo uma importante inter-relação funcional. Por meio de seus produtos de secreção, o endotélio vascular participa na regulação do tônus e da permeabilidade vascular, na hemostasia, em respostas proliferativas de células e em mecanismos de defesa como as respostas inflamatória e imunológica (Figura 2). Todas essas propriedades funcionais nos obrigam a considerar que as alterações na função do endotélio, como mecanismos fisiopatológicos, são cruciais no desenvolvimento das doenças.

O endotélio mantém um delicado equilíbrio entre os fatores que regulam a agregação plaquetária, a coagulação e a fibrinólise. A célula endotelial inibe a agregação plaquetária mediante a liberação de óxido nítrico e de prostaciclina, que diminuem o Ca^{2+} citosólico das plaquetas (MONCADA et al., 1976). As plaquetas circulantes no sangue permanecem inativas, portanto, não interagem com o endotélio íntegro. Este fato é importante para a manutenção da adesão plaquetária. Em condições normais as células endoteliais não atuam como uma superfície trombogênica, mas em certas condições, essas células provocam um aumento da aderência das plaquetas (RODGERS, 1988). As células endoteliais lesadas

secretam o fator de von Willebrand, que leva a ativação das plaquetas e conseqüentemente sua adesão ao endotélio.

O endotélio participa ativamente no desenvolvimento da resposta inflamatória. Os fatores inflamatórios aumentam a síntese de proteínas de adesão na membrana da célula endotelial como as selectinas, as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e as moléculas de adesão da célula vascular (VCAM). Estas moléculas atuam como receptores que fixam leucócitos. Os leucócitos aderidos são ativados, liberam substâncias como ânion superóxido, que estimula a síntese de moléculas de adesão, que dessa forma migram para o espaço subendotelial em resposta a estímulos quimiotáticos (LUSTER, 1998).

O aumento da permeabilidade vascular, que leva a migração celular, também favorece o escape de um líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício, esta é a marca registrada da inflamação aguda. A perda de líquido rico em proteína a partir do plasma reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta a pressão osmótica intersticial. Este fenômeno leva a uma acentuada fuga de líquidos e seu acúmulo no espaço intersticial.

A reorganização citoesquelética e juncional ou retração endotelial, resulta em lacunas interendoteliais, que podem ser induzidas *in vitro* por mediadores citocínicos, como a IL-1, o TNF e o IFN- γ (BRETT et al., 1989). Estas citocinas geram uma reorganização estrutural do citoesqueleto, de tal modo, que as células endoteliais se retraem umas em relação às outras ao longo de suas junções; este fato conduz à perda de continuidade endotelial. Em contraste ao efeito da histamina, que é imediata e dura cerca de 15 a 30 minutos, essa resposta é um pouco tardia, perdurando por mais tempo.

O extravasamento do plasma prolongado e tardio que ocorre através da descontinuidade endotelial é relativamente comum, envolvendo tanto as vênulas quanto os capilares. Este tipo de aumento da permeabilidade pode ser provocado por certas toxinas bacterianas, por exemplo. Também caracterizado por uma desordem na hemostasia e aumento

da permeabilidade vascular, são as manifestações clínicas presentes na infecção pelo vírus dengue. O mecanismo subjacente a este tipo de extravasamento não foi esclarecido, possivelmente seria o resultado de um efeito direto do agente agressor, que pode conduzir uma lesão celular tardia ou dos efeitos das citocinas inflamatórias.

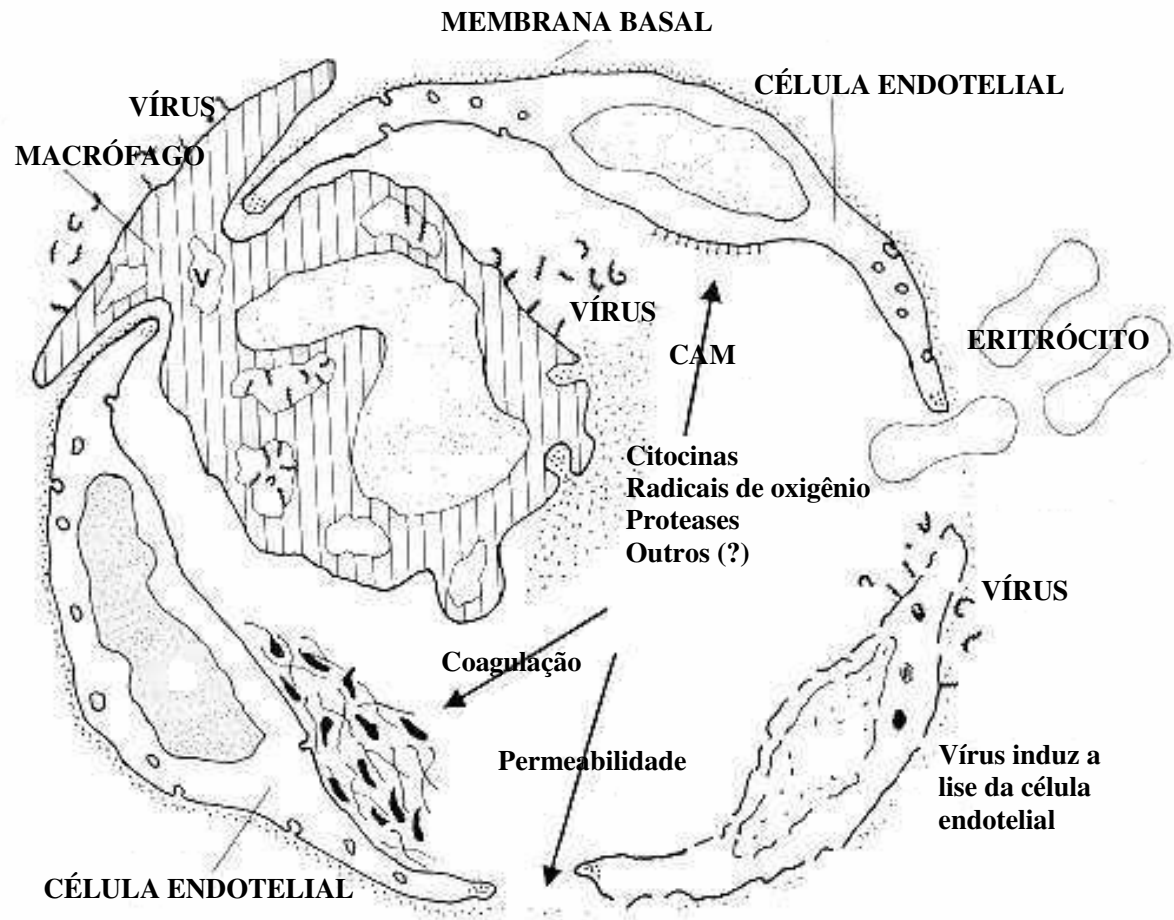


Figura 2. Esquema do endotélio onde foi perdida a regulação da permeabilidade vascular e da hemostasia, em função de uma resposta inflamatória e imunológica (UTMB, 2007).

1.6 – Moléculas de adesão

A aderência e a transmigração celular são, em grande parte, determinadas pelas ligações entre moléculas de adesão complementares nos leucócitos e nas células endoteliais e os mediadores químicos, fatores quimiotáticos e algumas citocinas, afetam estes processos por promoverem uma modulação na expressão superficial ou na avidéz destas moléculas de adesão (COCHRANE; GIMBRONE, 1992; COTRAN, 1993).

Os receptores de adesão envolvidos pertencem a três famílias de moléculas, as selectinas, as integrinas e as imunoglobulinas (SPRINGER, 1994).

As selectinas, assim denominadas por se caracterizarem por um domínio extracelular na extremidade N-terminal, relacionado com as lectinas que ligam açúcares presentes em células de mamíferos consistem em: E-selectina, também conhecida como ELAM-1, fica confinada ao endotélio; P-selectina, também denominada GMP140, está presente no endotélio e nas plaquetas; L-selectina, também denominada LAM-1, está presente na maioria dos leucócitos. As selectinas P e E se ligam, através de seu domínio selectina, a oligossacarídeos, que por sua vez, fazem ligações covalentes com diversas glicoproteínas da superfície celular. A L-selectina se liga a glicoproteínas semelhantes à mucina (GliCAM-1 e CD34).

Da família das imunoglobulinas incluem-se duas moléculas de adesão endotelial: ICAM-1 e VCAM-1, sendo que ambas interagem com integrinas.

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas adesivas, compostas por cadeias alfa e beta, que também atuam como receptores para a matriz extracelular. Os principais receptores de integrina para ICAM-1 são as β_2 -integrinas LFA-1 e MAC-1 (CD11a/CD18 e CD11b/CD18) e para a VCAM-1, a β_1 -integrina VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -integrina) (Figura 3).

A P-selectina se redistribui normalmente na membrana de grânulações endoteliais intracitoplasmáticas específicas, são os denominados corpúsculos de Weibel-Palade. Ao ser estimulada pela histamina, trombina ou PAF, a P-selectina é rapidamente redistribuída na superfície da célula (Bevilacqua, 1993). Este processo ocorre em questão de minutos no sangue circulante e serve para levar moléculas de adesão pré-formadas, logo que elas sejam necessárias à superfície.

Alguns mediadores da inflamação, em especial as citocinas IL-1 e TNF, induzem a síntese de moléculas de adesão endotelial. Este processo exige a síntese de novas proteínas e costuma iniciar-se após 1 a 2 horas (POBER; COTRAN, 1990). A E e P-selectinas, por exemplo, não estão presentes no endotélio normal, são induzidas pela IL-1 e TNF, duas citocinas derivadas de macrófagos. O pico desta indução é atingido após 4 a 6 horas, e a E-selectina medeia a adesão dos neutrófilos através da ligação a seus receptores. Estas mesmas citocinas também aumentam a expressão da ICAM-1 e VCAM-1, que se encontram presentes em baixas quantidades no endotélio normal.

O aumento da avidéz da ligação é o mecanismo de maior relevância na interação das integrinas. A LFA-1, por exemplo, está normalmente presente nos neutrófilos, monócitos e linfócitos, mas não adere a seu ligante ICAM-1 no endotélio. Quando os neutrófilos são ativados por agentes quimiotáticos ou por outros estímulos, a LFA-1 é convertida de um estado de baixa afinidade para um de alta afinidade de ligação em relação a ICAM-1, em virtude de uma alteração na conformação da molécula. Durante a inflamação, a maior afinidade da LFA-1 no leucócito ativado, associado ao aumento da expressão da ICAM-1 no endotélio, induzida pelas citocinas, cria condições para uma forte ligação entre LFA-1 e ICAM-1 gerando uma firme adesão ao endotélio (TRAVIS, 1993). Os neutrófilos, monócitos, eosinófilos e diversos tipos de linfócitos empregam moléculas diferentes na adesão e esta

adesividade pode ser modulada pelo estado de ativação do leucócito e do endotélio (BUTCHER, 1991).

A molécula de adesão CD36 é uma glicoproteína presente em plaquetas, monócitos maduros, macrófagos e células endoteliais. Tem como funções conhecidas a participação na fagocitose das células apoptóticas e a adesão plaquetária. Trabalhando com um modelo murino de malária cerebral, Wassmer et al. (2004), sugerem que as plaquetas servem de ponte ligando o eritrócito infectado com a célula endotelial via molécula de adesão CD36 no processo de seqüestro observado na infecção por *Plasmodium falciparum*. Observações *in vitro*, reforçam essa teoria, mostrando uma quantidade significativamente menor do seqüestro de eritrócitos infectados na placenta (GYSIN et al., 1999; FRIED; DUFFY, 1996; BEESON et al., 1999), resultado explicado pelos autores pela ausência de CD36 no sinciciotrofoblasto (GYSIN et al., 1999; MAUBERT, 1997).

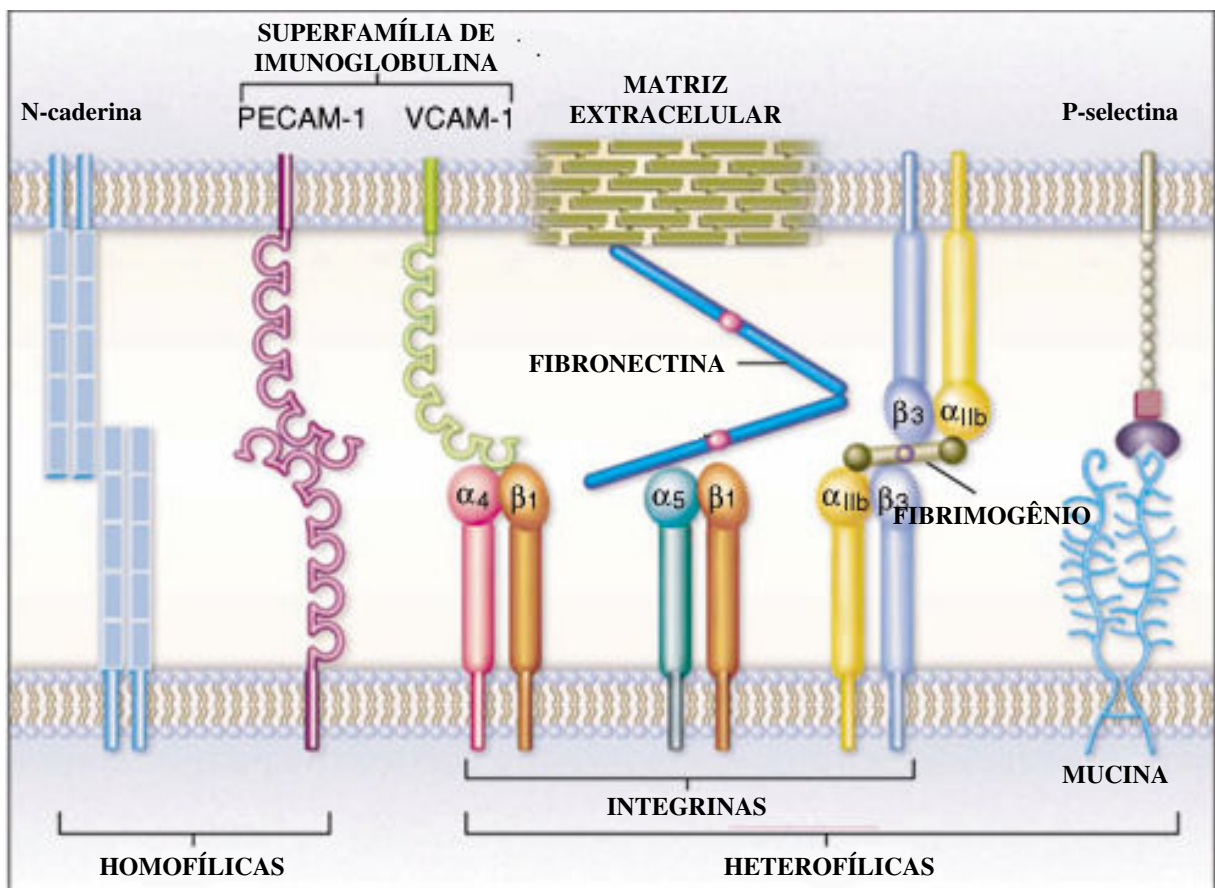


Figura 3. Esquema das moléculas de adesão de células endoteliais e seus principais receptores (CBRINSTITUTE, 2007).

1.7 – Trombocitopenia

A redução do número de plaquetas constitui uma causa importante de hemorragias generalizadas. A contagem plaquetária normalmente se situa entre 150.000 e 300.000 por mm^3 , e uma contagem inferior a 100.000 plaquetas por mm^3 geralmente é considerada como uma trombocitopenia. Entretanto, a hemorragia espontânea só fica evidente quando a contagem cai abaixo de 20.000 plaquetas por mm^3 .

Faz-se necessário reiterar que as plaquetas são vitais para a hemostasia quando constituem tampões temporários e participam na reação de coagulação. Assim, a trombocitopenia caracteriza-se principalmente por sangramento, em geral partindo de pequenos vasos. As localizações comuns destas hemorragias são a pele e as mucosas dos tratos gastrintestinal e geniturinário, onde o sangramento costuma se associar com o desenvolvimento de pequenas petéquias. O sangramento intracraniano é outro perigo em pacientes trombocitopênicos com plaquetometrias acentuadamente baixas.

As muitas causas de trombocitopenia podem ser classificadas segundo quatro principais categorias: redução da produção de plaquetas, redução da sobrevivência plaquetária, dilucional e seqüestro.

Existem evidências que correlacionam a trombocitopenia e infecções virais. A trombocitopenia pós-viral aguda pode desenvolver-se em crianças após recuperação de um exantema viral ou infecção das vias respiratórias superiores. Por motivos que ainda não foram totalmente esclarecidos, algumas espécies de vírus induziriam a formação de anticorpos antiplaquetários, que conduziriam a uma auto-imunidade plaquetária. Ao contrário da trombocitopenia idiopática auto-imune, a doença é auto limitada e se resolve espontaneamente em 4 a 6 semanas.

A trombocitopenia pode surgir de modo imprevisível em qualquer paciente que apresente uma esplenomegalia acentuada, quadro clínico denominado hiperesplenismo. Normalmente, o baço seqüestra entre 30 a 40 % da massa de plaquetas circulantes e, quando aumenta, chega a seqüestrar até 90 % do total de plaquetas.

Segundo alguns investigadores, a perturbação do endotélio tem importância primordial na patogenia de algumas doenças que cursam com trombocitopenia (RUGGENENTI; REMUZZI, 1991). Em apoio a isso, foram documentadas várias anormalidades, inclusive a redução na síntese de prostaciclina e um déficit da geração de óxido nítrico, os quais impedem a agregação plaquetária e causam vasodilatação. Postula-se que a alteração endotelial também seja excepcionalmente responsável pelo aumento na quantidade do fator de von Willebrand circulante. Estes fatores podem causar agregação patológica de plaquetas e predispor à trombose na microcirculação ou o desenvolvimento de uma miríade de agregados plaquetários que induz a trombocitopenia.

1.8 – Adesão plaquetária

Em condições fisiológicas normais, as plaquetas circulantes não interagem com o endotélio não ativado (MAY et al., 1999). Se por algum motivo o endotélio sofre alguma alteração, este pode levar a um efeito imediato de adesão plaquetária e agregação no local da injúria (CLEMETSON, 1999). O mecanismo molecular envolvido na interação plaqueta-endotélio não foi totalmente identificado, mas existem algumas evidências que glicoproteínas plaquetárias (GP) IIb/IIIa (integrina α IIb β 3) (LI et al., 1996; BOMBELI et al., 1998), PECAM-1 (ROSENBLUM et al., 1996), fibrinogênio (MASSBERG et al., 1999), e a

integrina $\beta 1$ (BOMBELI et al., 1999) estão envolvidas neste processo, dependente da ativação endotelial. Em adição, diferentes receptores estão envolvidos de acordo com o estado de ativação da plaqueta.

Trabalhando a interação de plaquetas com vênulas de mesentério de camundongo André et al. (2000), demonstraram que quando os vasos eram estimulados com cálcio, este induzia dentro de 15 segundos, a adesão plaquetária e a translocação sem a formação de agregados. Do início ao final do processo levava o tempo máximo de 1 minuto, quando aproximadamente 25.000 plaquetas aderiam em 1 mm^2 a interação diminuía progressivamente. Este processo de adesão plaquetária era dependente do fator de von Willebrand e independente de P-selectina. A análise histológica desse experimento demonstrou que as células endoteliais das vênulas não apresentavam alterações morfológicas sugerindo que as plaquetas aderem pela secreção do fator de von Willebrand e pela face luminal das células endoteliais. O tratamento das células endoteliais com histamina mostrou uma adesão similar. A adesão plaquetária não diminuía quando as plaquetas eram tratadas com anticorpos anti-PECAM-1 ou anti-PSGL-1, indicando que essas moléculas não estão envolvidas na interação plaqueta-endotélio. Ainda o mesmo trabalho mostrou que a adesão era mediada pela GPIIb α , porque as plaquetas murinas utilizadas expressavam exclusivamente a GPIIb α humano, e quando as plaquetas eram tratadas com uma protease de veneno de serpente que cliva GPIIb α , diminuía drasticamente a concentração plaquetária ao longo do vaso.

Lagadec et al. (2003), usando plaquetas humanas ou plaquetas murinas e CD47^{-/-}, demonstraram que CD47 expressa nessas plaquetas contribui significativamente para a adesão plaquetária quando as células endoteliais são estimuladas com TNF- α . As moléculas CD36 e GPIIb α estão também envolvidas, visto que as plaquetas quando são bloqueadas com anticorpos monoclonais contra estes receptores diminui a adesão plaquetária.

HUVEC infectada com vírus dengue 2, em comparação com as células estimuladas com lipopolissacarídeo apresentaram um aumento significativo na adesão das plaquetas, estes dados demonstram que as plaquetas aderem em HUVEC infectadas com o vírus dengue e esta interação pode contribuir com a trombocitopenia observada durante a infecção (KRISHNAMURTI et al., 2002).

A diminuição da função e do número das plaquetas contribui para uma forma mais grave de algumas infecções causadas por vírus, como a por vírus dengue, por exemplo, onde uma característica predominante é a trombocitopenia. Em pacientes com a febre hemorrágica da dengue, estudos de biopsia não revelaram injúria nas células endoteliais (HALSTEAD, 1989), caracterizando o aumento da permeabilidade vascular como uma consequência da ação de mediadores inflamatórios devido à resposta imune a infecção pelo vírus.

Dessa forma a alteração do endotélio pode ser o principal fator envolvido no aumento da permeabilidade vascular e na trombocitopenia da infecção ocasionada pelo vírus da dengue. Diante disso, nossa proposta é utilizar um modelo *in vitro* de endotélio para identificar a cinética das moléculas de adesão durante a infecção pelo vírus dengue 3 ou o estímulo com o sobrenadante de macrófagos infectados por dengue 3.

2 – OBJETIVOS

A diminuição da função e do número das plaquetas contribui para uma forma mais severa de algumas infecções virais, como a febre hemorrágica da dengue, onde uma característica predominante é a trombocitopenia. Uma das hipóteses seria a interação das plaquetas com o endotélio vascular provocada pela infecção viral. No presente trabalho, nos propusemos elucidar alguns aspectos da adesão plaquetária associada a infecção pelo vírus da dengue utilizando um modelo *in vitro* de endotélio e moléculas de adesão vascular. Assim os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1 – Verificar se o vírus dengue foi capaz de infectar células provenientes da veia umbilical humana;
- 2 – Verificar se ocorreu um aumento da adesão plaquetária em células provenientes da veia umbilical humana infectadas com o vírus dengue;
- 3 – Verificar se ocorreu um aumento da adesão plaquetária em células provenientes da veia umbilical humana expostas ao sobrenadante de macrófagos infectados com o vírus dengue;
- 4 – Verificar se o fenômeno pode ser reproduzido em modelo celular utilizando a linhagem CHO transfectada com os receptores de adesão celular CD36, ICAM-1 ou VCAM-1 e infectadas com o vírus dengue e,
- 5 – Verificar se ocorreu um aumento da adesão plaquetária na linhagem CHO transfectada com os receptores de adesão celular CD36, ICAM-1 ou VCAM-1, e expostas ao sobrenadante de macrófagos infectados com o vírus dengue.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Vírus

O vírus dengue sorotipo 3 (DENV-3), provenientes da viroteca do Laboratório de Virologia do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), foram previamente isolados de pacientes com dengue (VIEIRA et al., 2007), e gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Weber Cheli Batista.

3.2 - Obtenção e manutenção das células da veia umbilical humana

As células endoteliais foram isoladas da veia do cordão umbilical humano como descrito por Jaffe et al. (1973). Após a obtenção de 25 cm de cordão umbilical humano proveniente de uma cesariana, o cordão umbilical foi lavado externamente com água e sabão anti-séptico antes de ser armazenado na solução tampão de cordão onde foi mantido de 2 a 8 °C por 24 horas. A solução tampão de cordão foi preparada com 80 g de NaCl, 1,4 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄, 3 g de KCl, 20 g de glicose e 20 g/ml de albumina humana (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), e a esta mistura foi acrescentado 800 ml de água deionizada. O pH foi acertado para 6,5, o volume foi completado para 1000 ml, a solução foi filtrada com uma membrana de nitrocelulose de poro de 0,22 µm de diâmetro (TPP, Switzerland) e armazenada de 4 °C. No momento do uso a solução tampão de cordão foi diluído 10 vezes e refiltrado.

No laboratório o cordão umbilical foi transferido para uma placa de petri e suas extremidades foram clampadas (Cientific, Brasil), o cordão foi colocado em um copo de

Béquer contendo álcool a 70 % por 30 segundos. As extremidades com *clamp* foram cortadas e o cordão umbilical foi lavado com solução tampão salina fosfato (PBS). Uma das extremidades da veia do cordão umbilical foi canulada e a veia lavada com a solução tampão de cordão, em seguida a outra extremidade do cordão foi clampada e pela extremidade canulada foi adicionado a veia 200 U/mg de colagenase tipo 1 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) diluída em solução tampão de cordão e outro *clamp* foi colocado nesta extremidade do cordão umbilical. Na seqüência o cordão umbilical foi colocado em um frasco contendo solução tampão de cordão e foi colocado a 37 °C por 30 minutos. Após este passo o cordão umbilical foi colocado em uma placa de petri e as extremidades foram cortadas para a retirada dos *clamps*. A veia foi canulada novamente e lavada com meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). A suspensão celular foi recolhida em um tubo de 50 ml, e centrifugada a 400 g por 10 minutos. O precipitado celular foi suspenso em 10 ml do meio de cultura. A suspensão celular foi transferida para uma garrafa de cultura de 25 cm³ (TPP, Switzerland) e incubada a 37 °C a 5% de CO₂ por aproximadamente 7 dias.

O meio utilizado para o cultivo das células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foi o meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 20% de SFB, previamente inativado a 56 °C por 30 minutos, (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 U/ml de penicilina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 90 U/ml de heparina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml de hidrocortizona (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 2 µl/ml de fluconazol (Hipolabor Farmacêutica Ltda., Borges Sabará, MG, Brasil), 0,1 % de gelatina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 10 ng/ml de fator de crescimento de células endoteliais (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 10 ng/ml de fator de crescimento de endotélio vascular (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e 10

ng/ml de fator de crescimento epidermal (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). O meio completo foi filtrado em membrana de nitrocelulose de poro 0,22 µm de diâmetro (TPP, Switzerland) e armazenado a 4 °C. O meio da cultura celular foi trocado a cada 2 dias.

3.3 - Células de ovário de hamster

As linhagens celulares especiais utilizadas em nossos experimentos foram cedidas gentilmente pelo Doutor Arthur Scherf do Instituto Pasteur, França. A linhagem original da célula ovariana de hamster (CHO) expressa o receptor sulfato de condroitina A (CSA). A linhagem CHO745 não expressa o receptor de CSA (ESKO et al., 1985; ESKO et al., 1987), pois o gene da via de biossíntese de CSA foi nocauteado. Por técnica de transfecção, na linhagem CHO745, foram introduzidos genes que são responsáveis pela expressão dos receptores, CD36, molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) ou molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (HASLER et al., 1993). Como observado na tabela 1.

Tabela 1 – Perfil das linhagens CHO utilizadas.

Linhagem Celular	Transfecção	Fenótipo
CHO/CD36	+ gene CD36	CD36
CHO/ICAM-1	+ gene ICAM-1	ICAM-1
CHO/VCAM-1	+ gene VCAM-1	VCAM-1
CHO745	—	—

O meio utilizado para o cultivo das CHO foi o meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) conforme descrito anteriormente para as HUVEC.

3.4 - Separação de células mononucleares de sangue periférico por densidade

Foi coletado 20 ml de sangue periférico humano de 4 doadores saudáveis em tubo de coleta contendo heparina (Becton Dickinson, Plymouth, UK, USA). O sangue heparinizado foi centrifugado a 400 g por 10 minutos. Em seguida com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o plasma, a camada de células brancas sobre as hemácias e um pouco de hemácias foram coletados, diluídos e homogeneizados em PBS na proporção de 1 para 1 em um volume final de 10 ml. Em outro tubo acrescentou-se 1 porção de ficoll (Amersham Biosciences, Sweden) para 2 porções da suspensão sangüínea em um volume final de 9 ml. A suspensão sangüínea foi escorrida vagarosamente pela parede do tubo sobre o ficoll com auxílio da pipeta Pasteur. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 400 g. Após centrifugação coletou-se a porção opaca, anel de células mononucleadas, e transferiu-se para um novo tubo onde foi adicionado o volume 5 vezes maior de PBS e centrifugado a 400 g por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e a lavagem foi repetida. O precipitado celular foi suspenso em 5 ml do meio de cultura e transferido para uma garrafa cultura com 25 cm³ (TPP, Switzerland) que foi incubada a 37 °C a 5% de CO₂.

3.5 - Obtenção de macrófagos a partir de monócitos

De acordo com Pryor et al. (2001), monócitos de 2 doadores diferentes foram selecionados a partir de células mononucleares de sangue periférico por aderência em garrafa de cultura. Após 3 horas de incubação as células mononucleares não aderidas foram retiradas e as células aderidas foram lavadas rigorosamente com PBS. Estas células aderidas foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de SFB, previamente inativado a 56 °C por 30 minutos, (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 U/ml de penicilina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e 10 % de soro humano (SH). O meio completo foi filtrado em membrana de nitrocelulose de poro de 0,22 µm de diâmetro (TPP, Switzerland) e armazenado a 4 °C. As células foram mantidas a 37 °C a 5% de CO₂. De acordo com Pryor et al. (2001), após 5 dias de cultivo as células mononucleares diferenciadas em macrófagos são de 85 % a 90 % e estão prontas para a infecção.

3.6 - Obtenção de soro humano

Foram coletados 20 ml de sangue periférico humano de um doador saudável e não fumante em tubo de vidro (Becton Dickinson, Plymouth, USA). O sangue foi centrifugado a 1200 g por 10 minutos, o soro foi coletado e inativado a 56 °C por 30 minutos. Em seguida, foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 µm de diâmetro (TPP, Switzerland), aliquotado e armazenado a -70 °C.

3.7 - Plaqueamento de CHO e HUVEC

As células derivadas da cultura de CHO e HUVEC foram descoladas da garrafa mecanicamente com auxílio de pipeta e PBS gelado. As células foram transferidas para um tubo de 50 ml, e centrifugadas a 400 g por 10 minutos. Em seguida, o número de células presentes no tubo foi quantificado em câmara hemocitométrica do tipo Neubauer espelhada (Boeco, Alemanha) sob microscópio de luz com aumento de 400 vezes. O cálculo do número de células/ml foi feito utilizando-se a seguinte fórmula: número de células = média dos 4 quadrantes x inverso da diluição da amostra x 10^4 .

Cerca de 10^5 células/poço em 200 μ l de meio de cultura foram plaqueadas em placas de 24 poços, para o experimento no FACS, ou em placas de 96 poços, para o experimento de adesão plaquetária. O meio de cultura foi trocado periodicamente até as células formarem uma monocamada confluyente, momento ideal para a infecção das células com o DENV-3 ou exposição ao sobrenadante de macrófagos infectados como DENV-3.

3.8 - Infecção da cultura de CHO e HUVEC com DENV-3

A infecção com DENV-3 em cultura de CHO e HUVEC foi realizada com 50 μ l de sobrenadante de cultura de células C6/36 (células de linhagem contínua provenientes do *Aedes albopictus*) infectadas com DENV-3 em volume final de 90 μ l por poço contendo meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), sem soro, com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 2 por 2,5 horas a 37°C a 5% de CO₂. A placa foi delicadamente agitada a

cada 15 minutos. Após a infecção, o sobrenadante foi removido e as células lavadas por 3 vezes com PBS. Em seguida foi adicionado o meio específico para a célula. Após 72 horas de infecção as células estavam prontas para os experimentos utilizando o citômetro de fluxo e os experimentos de adesão plaquetária. Nos controles foram utilizados o mesmo volume de meio RPMI-1640 sem soro ou meio RPMI-1640 sem soro com 1 µg/ml de lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

3.9 - Infecção da cultura de macrófagos com DENV-3

Após 5 dias de cultura as células mononucleares diferenciadas em macrófagos foram descoladas da garrafa, mecanicamente, com o auxílio de uma pipeta e PBS gelado. As células foram transferidas para um tubo de 50 ml e centrifugadas a 400 g por 10 minutos. Em seguida, o número de células presentes no tubo foi quantificado em câmara hemocitométrica do tipo Neubauer espelhada (Boeco, Alemanha) como descrito anteriormente. Cerca de 2×10^5 células/poço em 500 µl de meio de cultura foram plaqueadas em placas de 24 poços.

A infecção com DENV-3 em cultura de macrófago foi realizada com 50 µl de sobrenadante da cultura de C6/36 infectadas com DENV-3 em um volume final de 90 µl por poço de meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), sem soro, com uma MOI de 2 por 2,5 horas a 37°C a 5% de CO₂. A placa foi delicadamente agitada a cada 15 minutos. Após a infecção, o sobrenadante foi removido e as células lavadas 3 vezes com PBS. Em seguida, foi adicionado meio específico para macrófagos. Após 48 horas de infecção o sobrenadante de macrófagos infectados foi coletado e utilizado nos experimentos. Nos

controles foram utilizados o mesmo volume de meio RPMI-1640 sem soro ou meio RPMI-1640 sem soro e com 1 µg/ml de LPS (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

3.10 - Reação de imunofluorescência indireta

Para confirmação da infecção das HUVEC, CHO e macrófagos, empregou-se a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) utilizando anticorpos policlonais anti vírus dengue. Esta técnica confirmou a infecção das células pelo vírus dengue pela interação detectável de anticorpos específicos com antígenos virais. Para isso, utilizou-se anticorpos denominados primário e secundário que caracterizam o teste de IFI. O primário interage diretamente com os antígenos virais. O secundário, conjugado a um revelador, é uma imunoglobulina anti-IgG e interage com o primário. O anticorpo primário utilizado foi cedido gentilmente pelo Doutor Vincent Deubel do Instituto Pasteur, França. Constituiu-se de líquido ascítico de camundongo rico em anticorpos policlonais contra vários antígenos de vírus dengue, derivando daí sua denominação fluido ascítico hiperimune ou MIAF. Já em relação ao anticorpo secundário, utilizou-se imunoglobulina de carneiro anti-IgG de camundongo conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) como substância reveladora (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

As células foram raspadas do fundo da garrafa de cultura e suspensas em meio de cultura. Em seguida, 20 µl de cada suspensão foi transferida para os *spots* das lâminas de vidro próprias para imunofluorescência. Estas foram deixadas secar a temperatura ambiente e em seguida, as células foram fixadas com acetona gelada por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 20 µl de MIAF policlonal, diluído 1/500 em PBS e incubado a 37 °C em câmara úmida por 30 minutos, na seqüência, as lâminas foram lavadas com PBS e deixadas secar

novamente. Em seguida, foi acrescentado 20 µl de anti-IgG camundongo FITC diluído em PBS na diluição anteriormente padronizada de 1/2000, contendo azul de Evans 1/1000 e incubadas novamente por 30 minutos a 37 °C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS, e deixadas secar. Na seqüência, foi montada a lamínula com glicerol tamponado, sendo feita a leitura em seguida em microscópio de imunofluorescência.

3.11 - Sobrenadante de macrófagos infectados com DENV-3 em monocamadas de CHO e HUVEC

As culturas de CHO e HUVEC foram lavadas com RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e posteriormente expostas a 150 µl de sobrenadante de macrófagos infectados com DENV-3, sobrenadante de macrófagos com LPS ou sobrenadante de macrófagos com meio RPMI-1640, por 6 horas, a 37 °C, com 5% de CO₂. A seguir, o sobrenadante foi aspirado e descartado, as células foram lavadas com PBS.

3.12 - Biotinilação das plaquetas

Segundo procedimentos descritos por Li *et al.*, (1996), foi coletado 5 ml do sangue de um doador saudável em tubo plástico contendo citrato de sódio (Becton Dickinson, Plymouth, USA). O sangue foi centrifugado a 400 g por 10 minutos. Após a centrifugação foi coletado o plasma rico em plaquetas (PRP). Em 2 ml de PRP foi adicionado a 2 ml de biotina (Sigma

Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (1,6 g de biotina-X-NHS foi dissolvida em 40 µl de dimetil sulfoxida (DMSO) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)) em solução tampão carbonato (0,106 g/l de Na₂CO₃ e 2,46 g/l de NaHCO₃, pH 8,0 – 8,5). A solução foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente.

Para remover a biotina não ligada as plaquetas, estas foram suspensas em solução tampão citrato (128 mmole/l de NaCl, 4,3 mmole/l de NaH₂PO₄-H₂O, 7,5 mmole/l de Na₂HPO₄, 4,8 mmole/l de citrato de sódio, 2,4 mmole/l de ácido cítrico, 11 mmole/l de glicose e 0,35 % de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), pH 6,5) e centrifugadas a 1200 g por 10 minutos. Esse procedimento foi realizado 2 vezes.

O precipitado de plaquetas biotiniladas foi suspenso em solução tampão Hepes-Tyrode modificado (137 mmole/l de NaCl, 2,8 mmole/l KCl, 1 mmole/l de MgCl₂, 12 mmole/l de NaHCO₃, 0,4 mmole/l de Na₂HPO₄, 0,35 % de BSA, 10 mmole/l de hepes (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e 5,5 mmole/l de glicose, pH 7,4). A concentração final de plaquetas foi igual a encontrada no PRP, 300 milhões de plaquetas/ml.

3.13 - Ensaio de adesão plaquetária

O sobrenadante da cultura de CHO e/ou HUVEC foi aspirado e desprezado. As células foram lavadas por 2 vezes com PBS. Dez milhões de plaquetas biotiniladas contidas em 100 µl de solução tampão Hepes-Tyrode foram alicotadas em poços de placas com 96 poços contendo monocamadas de HUVEC ou CHO. As células com as plaquetas foram incubadas por 1 hora, a 37 °C, com 5% de CO₂. Em seguida, as plaquetas não aderentes foram

eliminadas por lavagem com PBS e as células foram fixadas com 100 µl de 4 % de formalina em PBS, por 20 minutos, a temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas com PBS e a placa foi bloqueada com 300 µl por poço de PBS contendo 10% de albumina. A placa foi incubada por 2 horas, a temperatura ambiente. Após o bloqueio foi adicionado 100 µl do conjugado avidina-peroxidase (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) por 30 minutos reagindo no escuro. As células foram lavadas por 5 vezes com PBS. A reação foi revelada com um *kit* utilizando como substrato o 3, 3', 5, 5' tetrametil benzidina (TMB) (Pierce, USA) onde se misturou um volume igual da solução de TMB com a solução de peróxido de hidrogênio. Desta solução 100 µl foi colocado por poço na placa, à temperatura ambiente, por 5 minutos. A reação foi bloqueada com 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 0,5 molar por poço. A leitura foi realizada utilizando filtro de leitura de 450 nm e a placa foi lida em leitor de ELISA (Multiskan Ascent, Uniscience).

3.14 – Citometria de fluxo

Os anticorpos monoclonais (moAc) FITC anti-humano CD36 e o moAc PE anti-humano CD54 (ICAM-1), foram obtidos da Bio Legend, USA. Os moAc FITC mouse anti-humano CD106 (VCAM-1) e o controle de isotipo não específico FITC mouse IgG_{1K} mAc, foram adquiridos da Southern Biotech, USA.

Durante os experimentos as células e os respectivos moAc foram organizadas da seguinte forma: as células CHO745/CD36, receberam moAc FITC anti-humano CD36; as células CHO745/ICAM-1, receberam moAc PE anti-humano CD54; as células CHO745/VCAM-1, receberam moAc FITC mouse anti-humano CD106 e as células CHO745

foram testadas com os três moAc. Cada tipo celular ainda foi incubado com um controle de isotipo não específico, moAc FITC mouse IgG_{1K}.

As células em placas de 24 poços derivadas da cultura das quatro linhagens de CHO infectadas com DENV-3 ou expostas ao sobrenadante de macrófago infectado por DENV-3, foram descoladas do poço mecanicamente com o auxílio da pipeta e 1 ml de PBS gelado. As células foram transferidas para tubos próprios para FACS e centrifugadas a 400 g por 8 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular suspenso em 1 ml de solução tampão de FACS (1% de SFB (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em PBS). Novamente a suspensão celular foi centrifugada a 400 g por 8 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, o precipitado celular foi suspenso em 25 µl de solução tampão de FACS e a ele adicionado 4 µl de moAc específico, por 30 minutos, no escuro. A seguir, foi adicionado 3 ml de solução tampão de FACS por tubo e as células foram centrifugadas a 400 g, por 8 minutos. O precipitado celular foi suspenso em 100 µl de solução tampão de FACS e a ele foi adicionado 100 µl de formaldeído 4 % em PBS, por 20 minutos, a temperatura ambiente. Após a fixação das células, foi adicionado 3 ml de solução tampão de FACS por tubo e a suspensão foi centrifugada a 400 g, por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular suspenso em 400 µl de solução tampão de FACS. Depois de finalizado o protocolo, as células foram analisadas em um citômetro de fluxo (FACScan; Becton Dickinson). Todos os dados foram processados utilizando o programa de computador BD Cell QuestTM.

3.15 – Análise estatística

O estudo da densidade óptica (D.O.) das plaquetas aderidas nas HUVEC e CHO estimuladas pelo DENV-3, LPS e meio RPMI-1640, ou ainda, estimuladas com o sobrenadante de macrófagos que previamente foram tratados com os mesmos estímulos, foi realizado pelo teste de hipóteses e significância (SPIEGEL, 1993). Todas as comparações foram consideradas no nível de 5% de significância. Em todas as situações estudadas, as estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Infecção de HUVEC com DENV-3

As HUVEC foram coletadas a partir da digestão, por colagenase, do endotélio da veia do cordão umbilical humano, extraído do recém nascido. Para a obtenção do cordão umbilical foram escolhidos os partos cesarianos e as mães saudáveis para diminuir o risco de contaminação das células. Para ser feita a coleta do cordão umbilical o projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Base do município de Porto Velho, RO.

Após a extração das células da veia umbilical humana estas foram incubadas por sete dias ate formar uma monocamada confluyente, como mostra a Figura 4.A. Estas células foram inoculadas com 50 µl do sobrenadante de cultura de células C6/36 infectadas previamente com o DENV-3. Após 72 horas de incubação, uma reação de IFI foi realizada para determinar a presença da infecção viral na cultura celular.

Nossos resultados evidenciaram que todas inoculações com DENV-3 em células provenientes da veia umbilical humana, o vírus foi capaz de infectar HUVEC (Figura 4.B), e portanto reagir a IFI realizada para esta confirmação. O controle negativo da infecção (Figura 4.C) não fluoresceu mostrando que as únicas células que reagiam a IFI foram as infectadas pelo DENV-3.

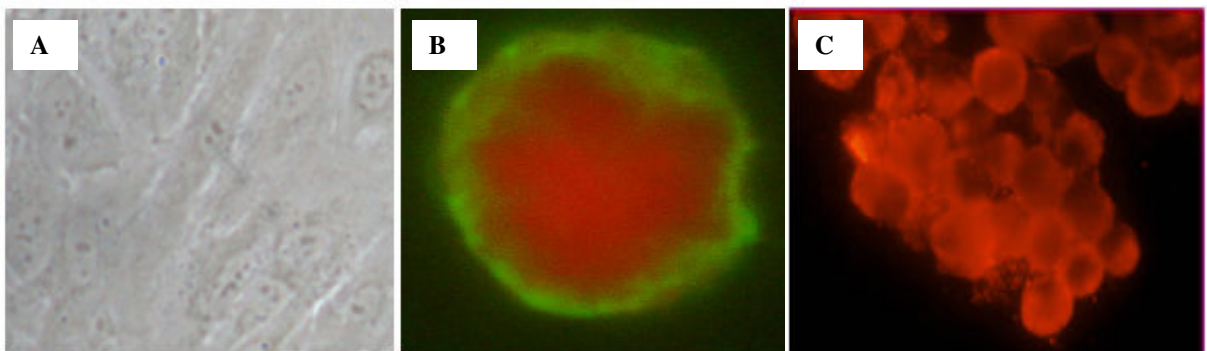


Figura 4. Reação de imunofluorescência indireta em HUVEC infectadas pelo DENV-3. (A) Monocamada celular confluyente. (B) IFI positiva em célula infectada com DENV-3. (C) IFI negativa.

4.2 - Análise da aderência plaquetária em HUVEC infectadas pelo DENV-3 ou estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3

A linhagem celular proveniente da veia umbilical humana foi a escolhida para representar um modelo de endotélio vascular nos ensaios *in vitro* de adesão plaquetária após infecção pelo DENV-3. No decorrer do trabalho, questionamos o mecanismo da adesão plaquetária, assim simulando o que ocorre na infecção normal, resolvemos trabalhar com mais uma variável, sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3, também como estímulo para a adesão de plaquetas nas células endoteliais.

Após duas semanas em cultura, as HUVEC formavam uma monocamada confluenta. Nesta fase foi possível realizar os ensaios de infecção celular e de adesão plaquetária. As células endoteliais foram lavadas e então infectadas com DENV-3. Paralelamente foram também colocadas em placas de cultura as células que receberiam o sobrenadante de macrófagos infectados pelo mesmo vírus e nas mesmas condições que as HUVEC.

As plaquetas foram obtidas de doadores saudáveis e que não ingeriram aspirina ou outra droga anti-plaquetária em um prazo anterior a dez dias. Essas plaquetas foram biotinizadas e na seqüência, colocadas em contato com as HUVEC infectadas pelo DENV-3 ou estimuladas pelo sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3. A revelação das plaquetas foi realizada com o conjugado avidina-peroxidase. O número de plaquetas foi quantificado pela intensidade da coloração. A reação foi revelada com TMB e peróxido de hidrogênio, a coloração azul da reação foi bloqueada e a leitura realizada.

O teste de hipóteses e significância foi aplicado a D.O. registrada pelo leitor de ELISA em três experimentos realizados em datas diferentes e com amostras em triplicata. A média entre as triplicatas dos três experimentos mostrou que a adesão das plaquetas em células

infectadas com DENV-3 foi significativamente maior quando comparado com as células que foram incubadas com meio RPMI-1640, como pode ser observado na Figura 5. O mesmo aconteceu com as células endoteliais que foram estimuladas com o sobrenadante de macrófagos infectados com DENV-3 em comparação com as HUVEC que receberam sobrenadante de macrófagos não infectados (Figura 5). A análise estatística, ainda, constatou que não houve diferença significativa quando os dois métodos de estímulo foram comparados, células infectadas diretamente com as células que receberam o estímulo a partir do sobrenadante de macrófagos infectados (Figura 5).

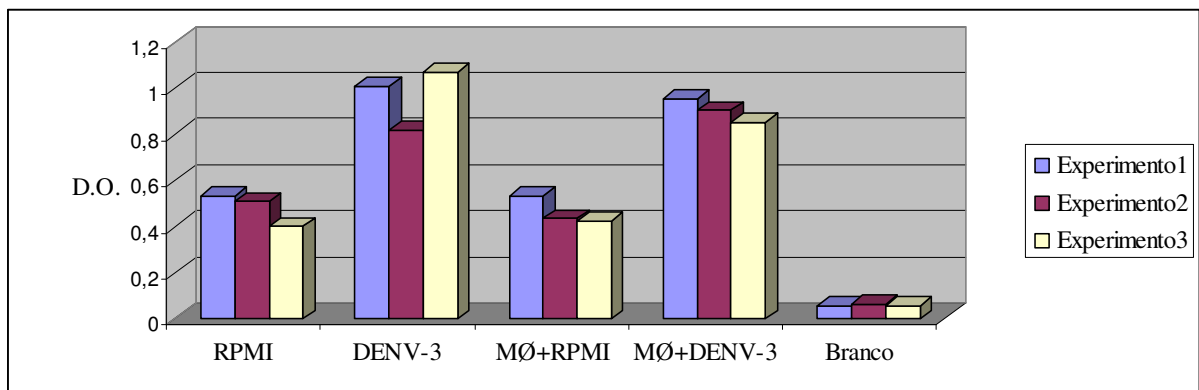


Figura 5. Ensaio de adesão de plaquetas em HUVEC.

4.3 - Aderência plaquetária em CHO infectadas pelo DENV-3 ou estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3

Na Figura 5 mostramos que plaquetas aderem ao nosso modelo de endotélio quando infectadas com DENV-3 ou estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados pelo mesmo. Partindo desse resultado procuramos trabalhar com uma linhagem celular que expressasse receptores conhecidos visando desvendar qual receptor estaria fazendo a conexão plaqueta-célula endotelial.

Trabalhando com as quatro linhagens de CHO (CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1), realizamos ensaios de adesão plaquetária onde as células foram infectadas diretamente com o DENV-3 ou receberam como estímulo o sobrenadante de macrófagos infectados pelo mesmo vírus. Nas Tabelas 2 e 3 apresentadas a seguir, estão representadas, a média entre as triplicatas de três experimentos diferentes utilizando como estímulo a infecção com DENV-3 diretamente (Tabela 2) ou o sobrenadante de macrófagos infectados com DENV-3 (Tabela 3).

Tabela 2. Ensaio de adesão de plaquetas em linhagem CHO infectada com DENV-3.

Célula		D.O.				
CHO	Estímulo	Experimento			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
CHO/CD36	RPMI	0,296	0,245	0,214	0,2517	0,04141
	LPS	1,359	1,278	1,350	1,3290	0,04440
	DV-3	1,375	1,250	1,667	1,4307	0,21400
CHO/ICAM-1	RPMI	0,319	0,410	0,390	0,3730	0,04782
	LPS	1,181	0,978	1,079	1,0793	0,10150
	DV-3	0,766	0,640	0,757	0,7210	0,07029
CHO/VCAM-1	RPMI	0,275	0,411	0,243	0,3097	0,08920
	LPS	1,187	1,043	0,824	1,0180	0,18279
	DV-3	0,952	1,061	0,859	0,9573	0,10111
CHO745	RPMI	0,515	0,509	0,414	0,4793	0,05666
	LPS	0,536	0,593	0,582	0,5703	0,03024
	DV-3	0,551	0,536	0,421	0,5027	0,07112

Tabela 3. Ensaio de adesão de plaquetas em linhagem CHO estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados com DENV-3.

Célula		D.O.				
CHO	Estímulo do MØ	Experimento			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
CHO/CD36	RPMI	0,577	0,466	0,665	0,5693	0,09972
	LPS	0,873	1,113	1,282	1,0893	0,20553
	DV-3	1,007	1,395	1,022	1,1413	0,21981
CHO/ICAM-1	RPMI	0,277	0,263	0,269	0,2697	0,00702
	LPS	0,675	0,771	0,827	0,7577	0,07687
	DV-3	0,763	0,738	0,932	0,8110	0,10553
CHO/VCAM-1	RPMI	0,334	0,329	0,387	0,3500	0,03214
	LPS	1,053	0,731	0,944	0,9093	0,16378
	DV-3	0,923	0,821	0,893	0,8790	0,05242
CHO745	RPMI	0,274	0,255	0,277	0,2687	0,01193
	LPS	0,481	0,477	0,467	0,4750	0,00721
	DV-3	0,325	0,347	0,34	0,3373	0,01124

A média entre as triplicatas dos três experimentos demonstrou que nas linhagens de células CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 houve um aumento significativo na adesão das plaquetas quando comparado o estímulo de LPS e a infecção pelo DENV-3 com o

meio RPMI, mas não houve diferença significativa quando comparamos a adesão plaquetária do estímulo por LPS com a infecção pelo DENV-3. Com a linhagem CHO745, não houve diferença significativa da adesão das plaquetas em nenhum dos estímulos utilizados.

Da mesma forma comparamos as linhagens celulares CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1, quando receberam como estímulo o sobrenadante de macrófagos estimulados por meio RPMI-1640, LPS e DENV-3. Onde houve um aumento significativo na adesão das plaquetas em comparação dos estímulos por LPS e infecção pelo DENV-3 com o meio RPMI-1640, mas não houve diferença significativa quando comparado a adesão plaquetária do estímulo de macrófagos por LPS com a infecção pelo DENV-3. Com a linhagem celular CHO745, não houve diferença significativa da adesão de plaquetas em nenhum dos estímulos utilizados nos macrófagos.

4.4 – Comparação da aderência plaquetária entre CHO estimuladas diretamente, por DENV-3, LPS ou meio RPMI, com as células que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados

A média entre as triplicatas dos três experimentos após a análise estatística demonstrou que foi igual a adesão das plaquetas em células CHO/CD36 infectadas com o DENV-3 em comparação com a mesma linhagem de células, que foram incubadas com sobrenadante de macrófagos infectados por DENV-3, o mesmo ocorreu quando o estímulo das células foi o LPS (Tabelas 1, 2 e Figura 6). Utilizando apenas meio RPMI como controle negativo as CHO/CD36 que receberam sobrenadante de macrófago apresentaram um aumento significativo na adesão das plaquetas quando comparado com as células que receberam meio RPMI diretamente (Tabelas 1, 2 e Figura 6).

Não foi obtida diferença estatística significativa em nenhum dos estímulos utilizados (DENV-3, LPS ou meio RPMI-1640), como demonstrado nas Figuras 7, 8 e 9, não houve diferença significativa na aderência das plaquetas, quando as linhagens CHO/ICAM-1, CHO/VCAM-1 e CHO745, foram diretamente estimuladas, por DENV-3, LPS ou meio RPMI, quando comparadas com as células que receberam o sobrenadante de macrófagos estimulados.

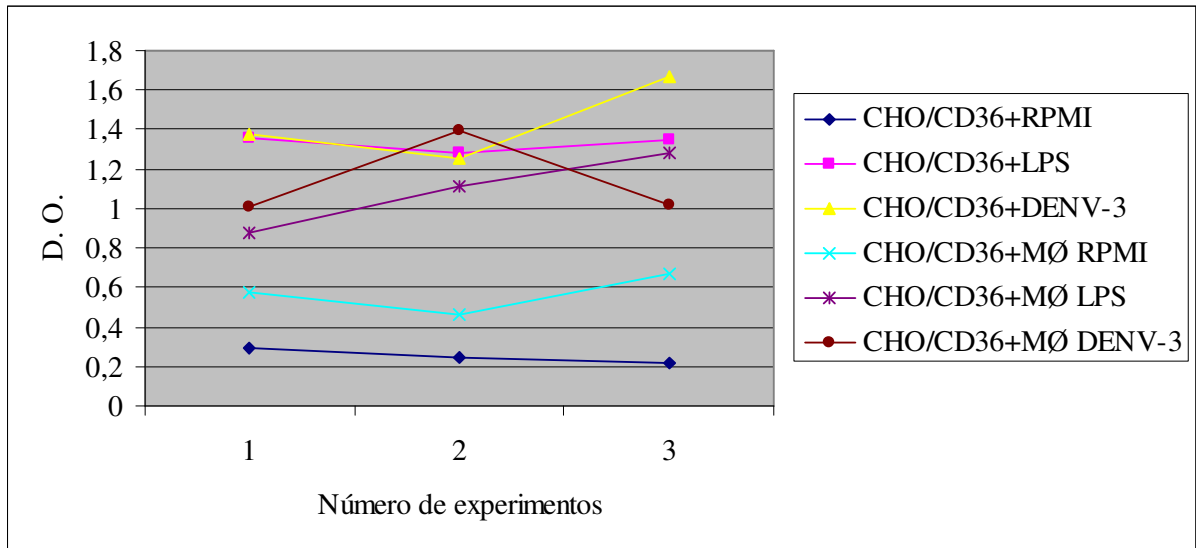


Figura 6. Ensaio de adesão de plaquetas em CHO/CD36.

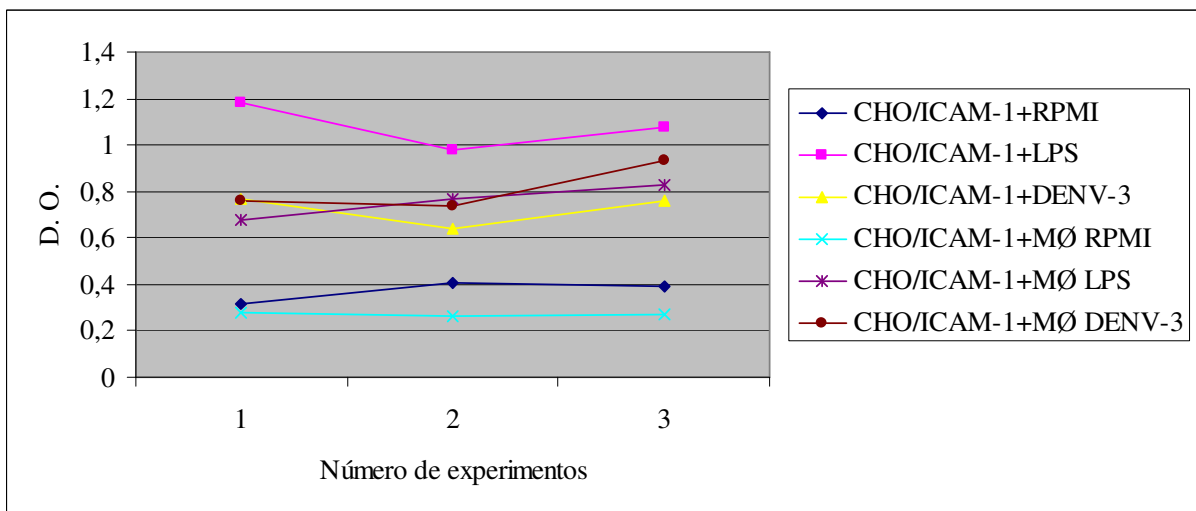


Figura 7. Ensaio de adesão de plaquetas em CHO/ICAM-1.

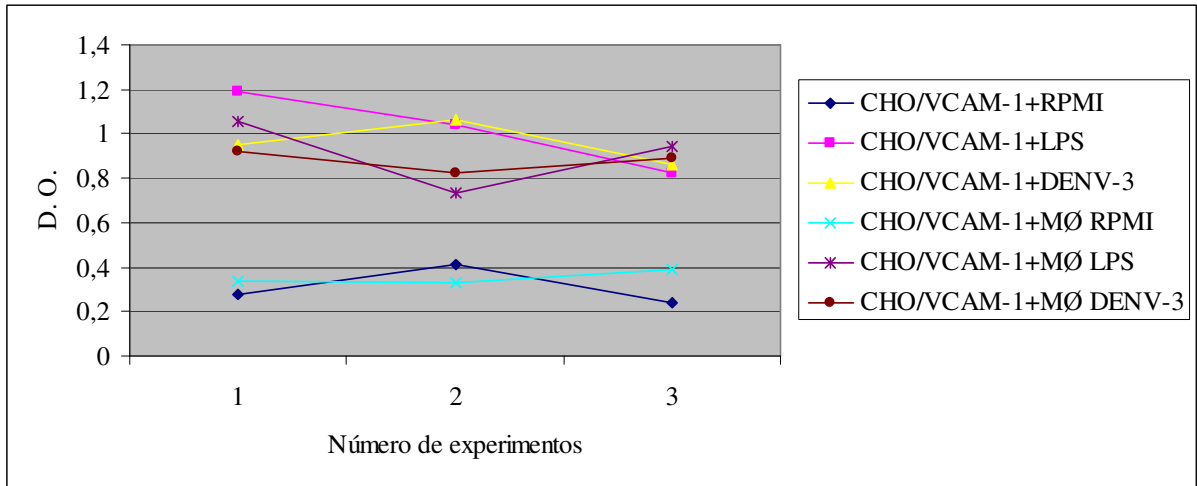


Figura 8. Ensaio de adesão de plaquetas em CHO/VCAM-1.

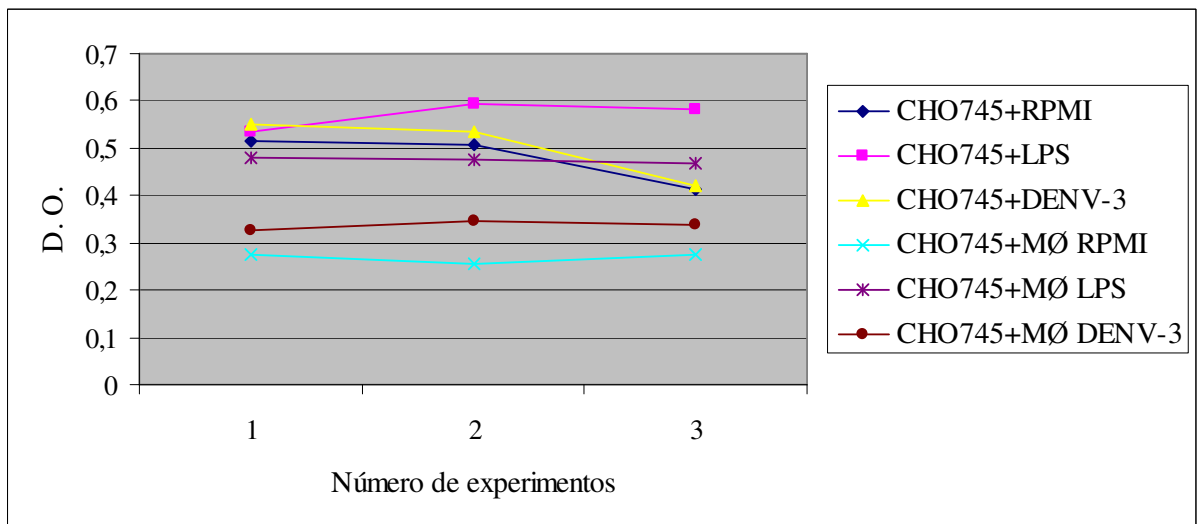


Figura 9. Ensaio de adesão de plaquetas em CHO745.

4.5 – Comparação da aderência plaquetária entre CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 infectadas por DENV-3

A média entre as triplicatas dos três experimentos após a análise estatística demonstrou, que quando comparamos as linhagens celulares CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 não há uma diferença significativa entre os valores obtidos da adesão das plaquetas entre estas células. Quando comparamos a adesão plaquetária nas células CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 com a linhagem CHO745, observamos que houve um aumento significativo da adesão de plaquetas nas linhagens CHO/CD36 e CHO/VCAM-1, mas não houve diferença significativa entre os valores de adesão das plaquetas entre as linhagens CHO745 e CHO/ICAM-1 (Tabela 2 e Figura 10).

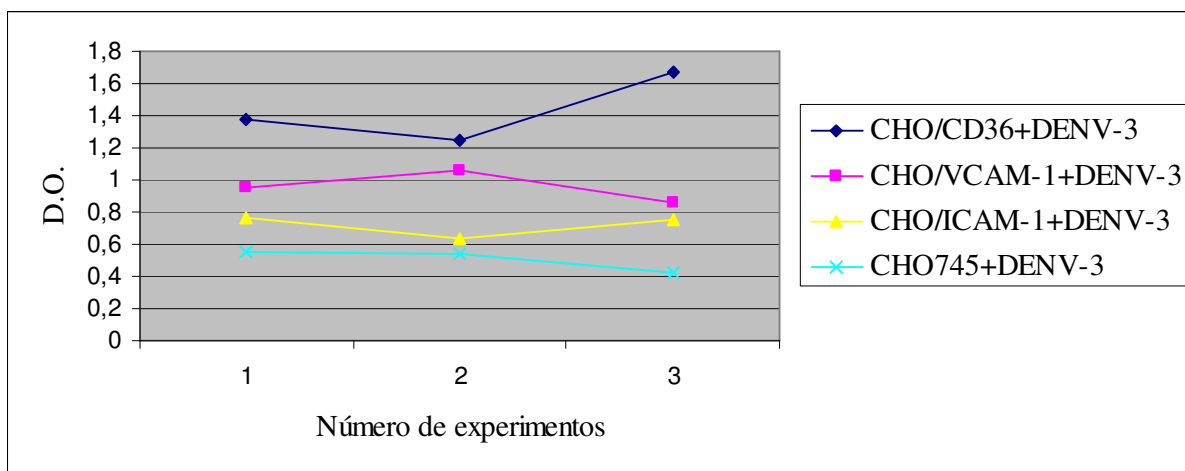


Figura 10. Ensaio de adesão de plaquetas em CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 infectadas pelo DENV-3.

4.6 – Comparação da aderência plaquetária entre CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados por DENV-3

A média entre as triplicatas dos três experimentos após a análise estatística demonstrou, que quando comparamos as linhagens celulares CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 não há uma diferença significativa entre os valores obtidos da adesão das plaquetas entre estas células. Quando comparamos a adesão plaquetária nas células CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 com a linhagem CHO745, observamos que houve um aumento significativo entre os valores obtidos nas linhagens transfectadas de adesão plaquetária em comparação com a linhagem CHO745 (Tabela 3 e Figura 11).

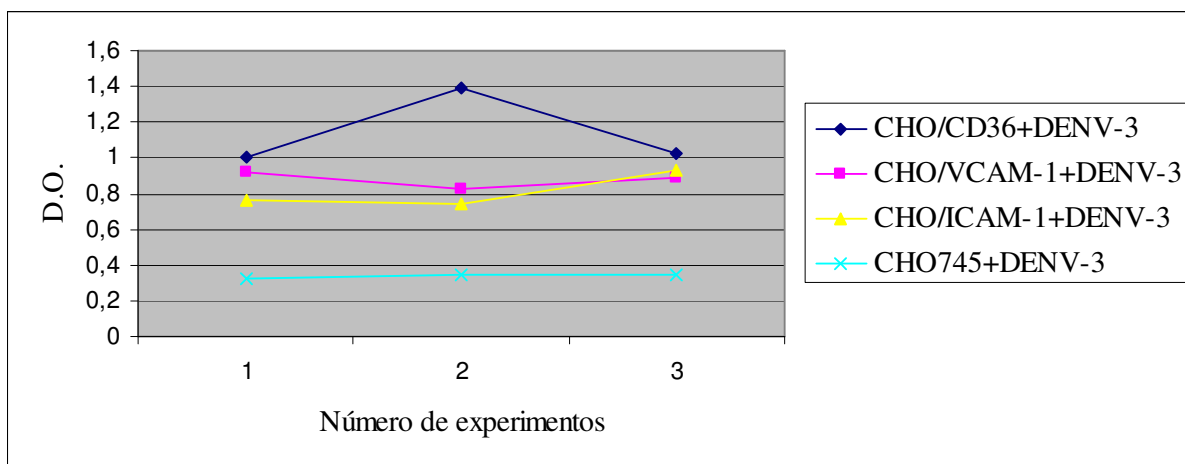


Figura 11. Ensaio de adesão de plaquetas em CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3.

4.7 – Análise dos receptores na membrana das células CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 infectadas pelo DENV-3

As quatro linhagens de CHO (CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1) infectadas com DENV-3, foram submetidas a experimentos de qualificação de receptores de adesão por FACS.

A linhagem CHO/CD36, recebeu moAc FITC anti-humano CD36; a CHO/ICAM-1, recebeu moAc PE anti-humano CD54; a CHO/VCAM-1, recebeu moAc FITC mouse anti-humano CD106 e, a linhagem celular CHO745, foram testadas com os três moAc. Cada linhagem celular, ainda, foi incubada com um controle de isotipo não específico, moAc FITC mouse IgG_{1K}.

A primeira análise feita no citometro de fluxo foi quanto ao tamanho e granulosidade da linhagem celular CHO, como demonstra a Figura 12. Com esse resultado, desenhamos um campo de células e a partir dele fizemos os outros experimentos. Dessa forma as células marcadas com os anticorpos monoclonais só valeriam para nossa amostra se estivessem dentro deste campo.

Quando comparamos a quantidade de receptores, CD36, VCAM-1 e ICAM-1 na membrana das respectivas linhagens celulares CHO/CD36, CHO/VCAM-1 e CHO/ICAM-1, infectadas por DENV-3 com as células que receberam o estímulo por LPS não observamos diferença. O mesmo não ocorreu quando a comparação foi com o meio RPMI, a quantidade de receptores CD36, na membrana das células CHO/CD36, aumentou dois logs no gráfico (Figura 13). Enquanto os receptores VCAM-1, na membrana das células CHO/VCAM-1, aumentou meio log (Figura 14) e, os receptores ICAM-1, na membrana das células CHO/ICAM-1, aumentou um log no gráfico (Figura 15).

Para mostrar a fidelidade de nossos resultados utilizamos a linhagem CHO745, que apresenta o gene da via de biossíntese de seu receptor nocauteado, como controle negativo para as outras linhagens celulares utilizadas em nossos experimentos. Não foi detectado fluorescência em nenhuma das amostras testadas, anti-CD36-FITC (Figura 16.A), anti-VCAM-1-FITC (Figura 16.B) e anti-ICAM-1-PE (Figura 16.C), como demonstrado nos *dot plots* da Figura 16.

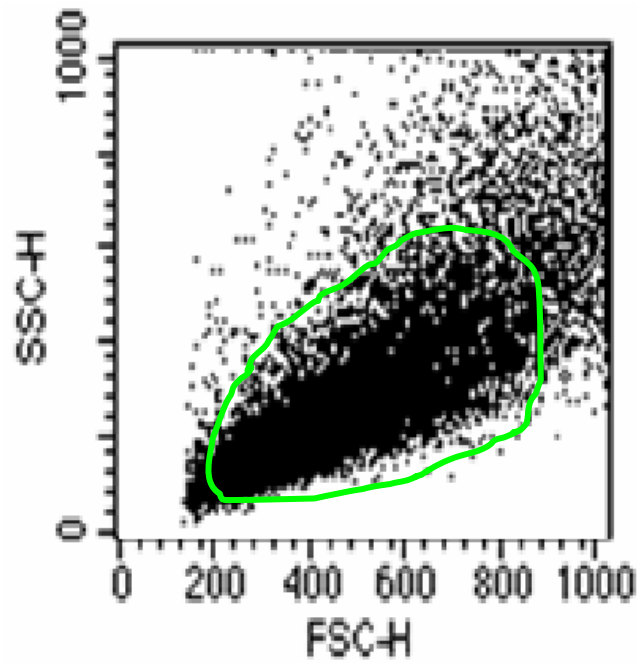


Figura 12. Análise do citometro de fluxo quanto ao tamanho e granulosidade da linhagem celular CHO.

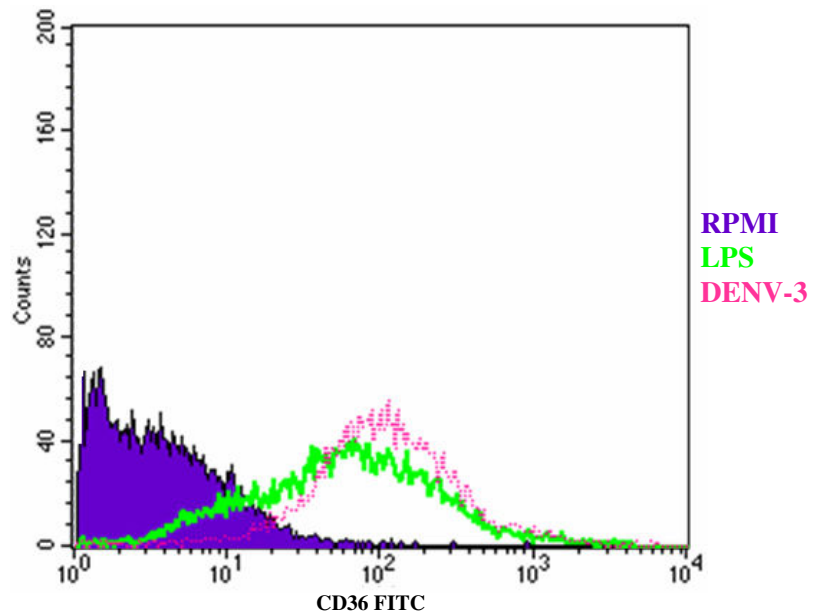


Figura 13. Análise do receptor CD36 em células CHO/CD36 infectadas pelo DENV-3.

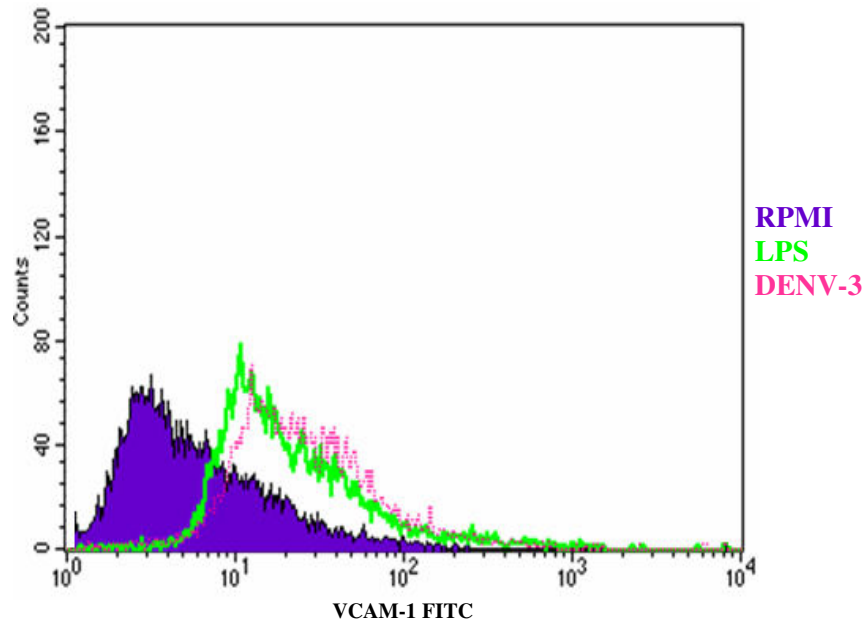


Figura 14. Análise do receptor VCAM-1 em células CHO/VCAM-1 infectadas pelo DENV-3.

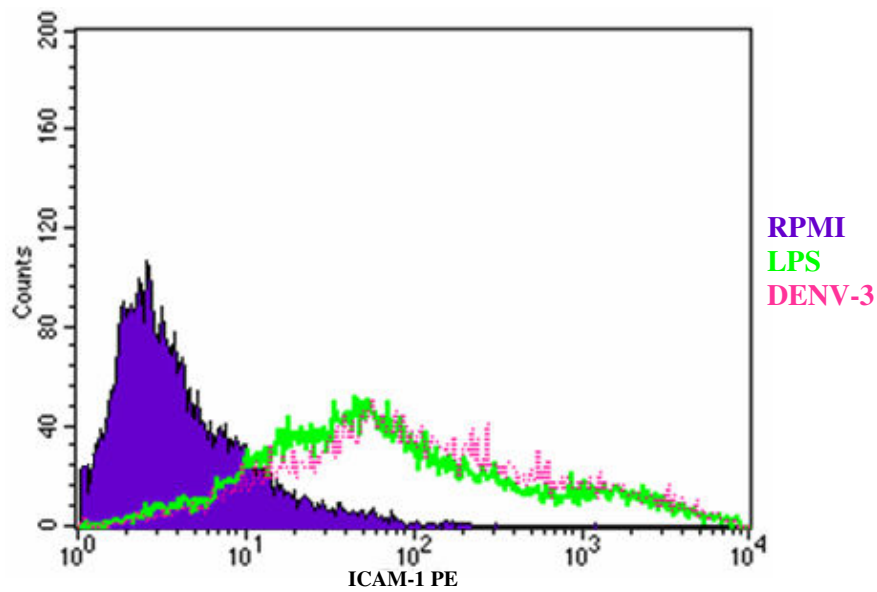
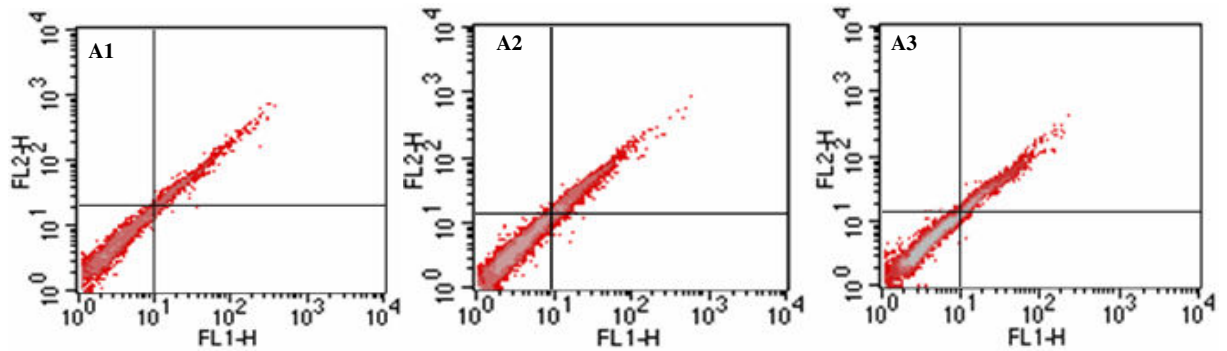
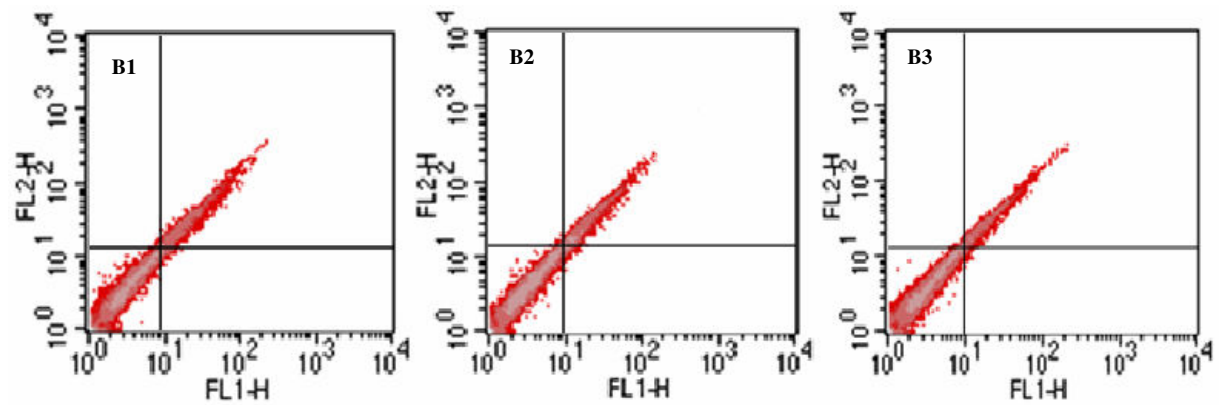


Figura 15. Análise do receptor ICAM-1 em células CHO/ICAM-1 infectadas pelo DENV-3.

A



B



C

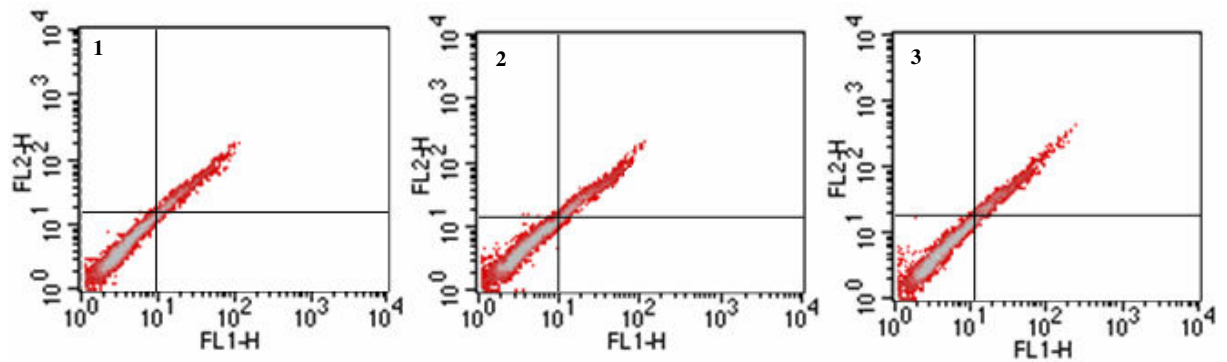


Figura 16. Análise das células CHO745, infectadas pelo DENV-3, quanto aos receptores CD36, VCAM-1 e ICAM-1 em sua superfície. Células CHO745 foram incubadas com anticorpos monoclonais: (A) anti-CD36-FITC, (B) anti-VCAM-1-FITC e (C) anti-ICAM-1-PE. Nas amostras (1) as células foram estimuladas com meio RPMI, nas de número (2) receberam LPS e nas amostras (3) as células foram infectadas com DENV-3.

4.8 – Análise dos receptores na membrana das células CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1 estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3

As quatro linhagens de CHO (CHO745, CHO/CD36, CHO/ICAM-1 e CHO/VCAM-1) estimuladas com o sobrenadante de macrófagos infectados com DENV-3, foram submetidas a experimentos de qualificação de receptores de adesão por FACS.

Quando comparamos a quantidade de receptores, CD36, VCAM-1 e ICAM-1 na membrana das respectivas linhagens celulares CHO/CD36, CHO/VCAM-1 e CHO/ICAM-1, estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados por DENV-3 com as células que receberam o estímulo de sobrenadante de macrófagos com LPS, não observamos diferenças. O mesmo não ocorreu quando a comparação foi com o sobrenadante de macrófagos com meio RPMI, a quantidade de receptores CD36, na membrana das células CHO/CD36, aumentou meio log no gráfico (Figura 17), de maneira semelhante ocorreu com os receptores ICAM-1, na membrana das células CHO/ICAM-1 (Figura 18). Enquanto, os receptores VCAM-1, na membrana das células CHO/VCAM-1, aumentou um log (Figura 19).

Para demonstrar a fidelidade de nossos resultados utilizamos a linhagem CHO745, conforme descrito anteriormente, como controle negativo para as outras linhagens celulares utilizadas em nossos experimentos. Não foi detectado fluorescência em nenhuma das amostras testadas, anti-CD36-FITC (Figura 20.A), anti-VCAM-1-FITC (Figura 20.B) e anti-ICAM-1-PE (Figura 20.C), como demonstrado nos *dot plots* da Figura 20.

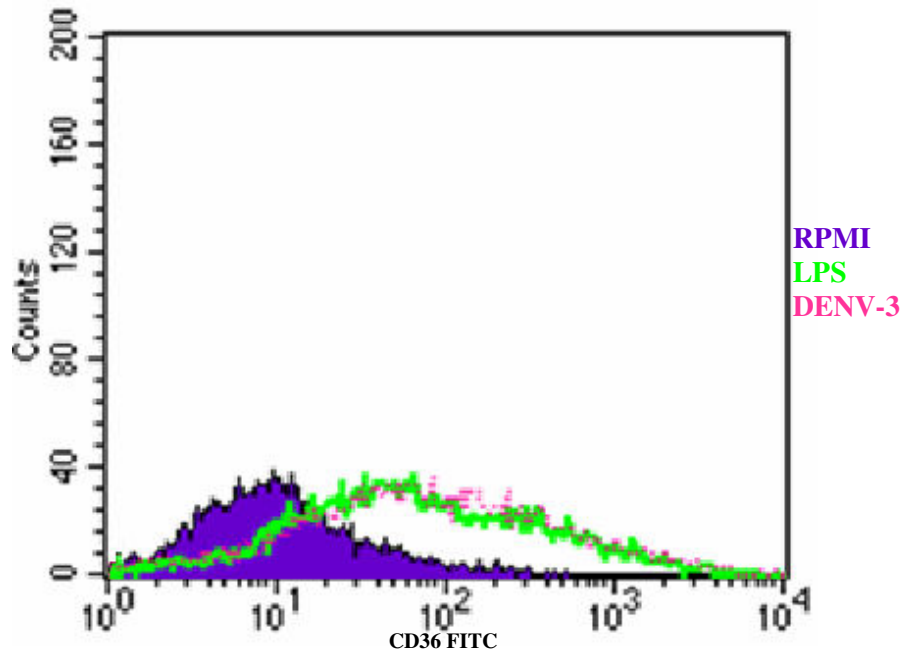


Figura 17. Análise do receptor CD36 em células CHO/CD36 estimulada com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3.

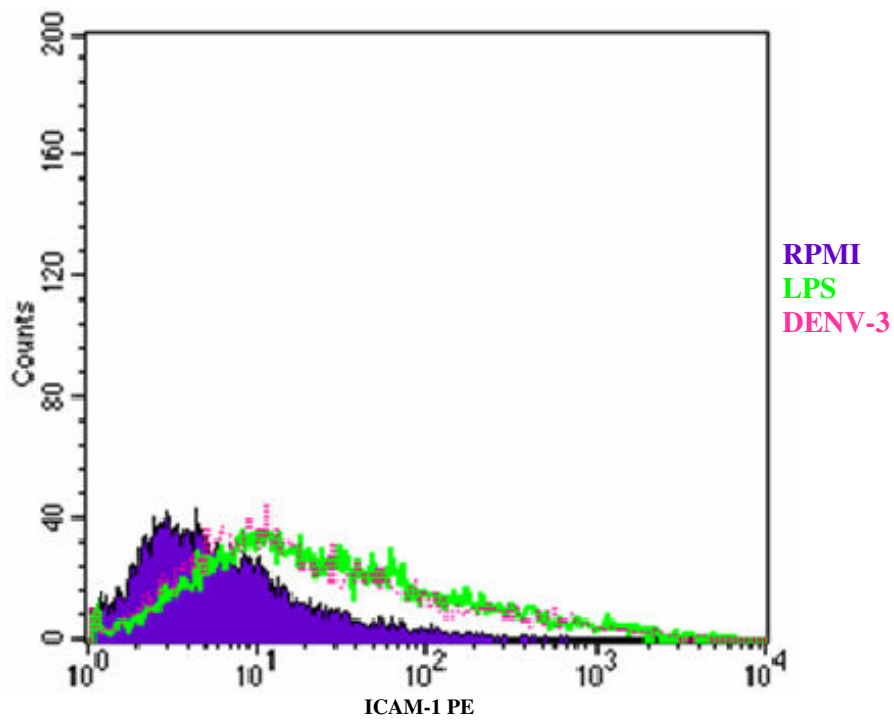


Figura 18. Análise do receptor ICAM-1 em células CHO/ICAM-1 estimulada com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3.

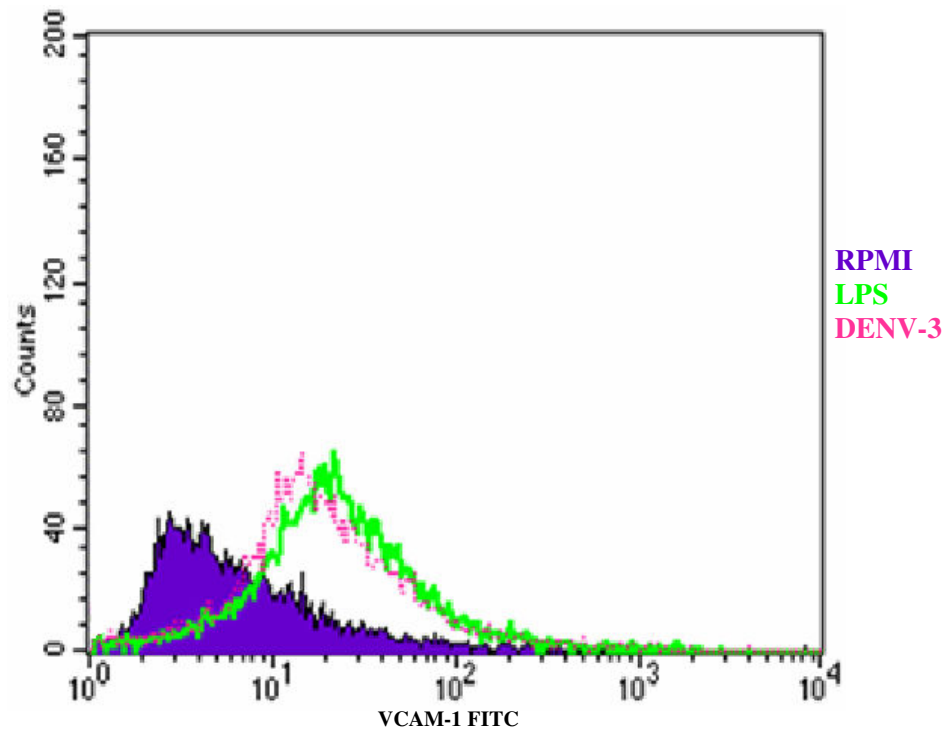
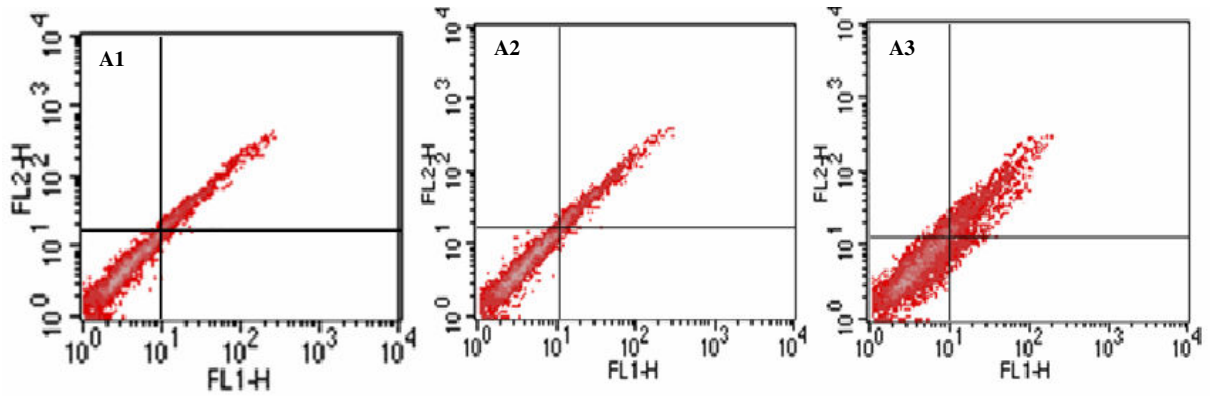
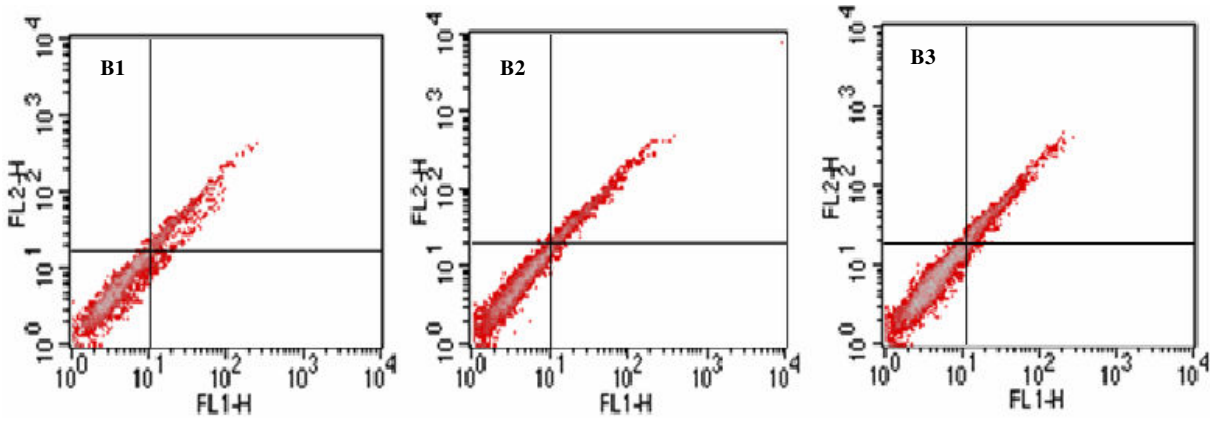


Figura 19. Análise do receptor VCAM-1 em células CHO/VCAM-1 estimulada com sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3.

A



B



C

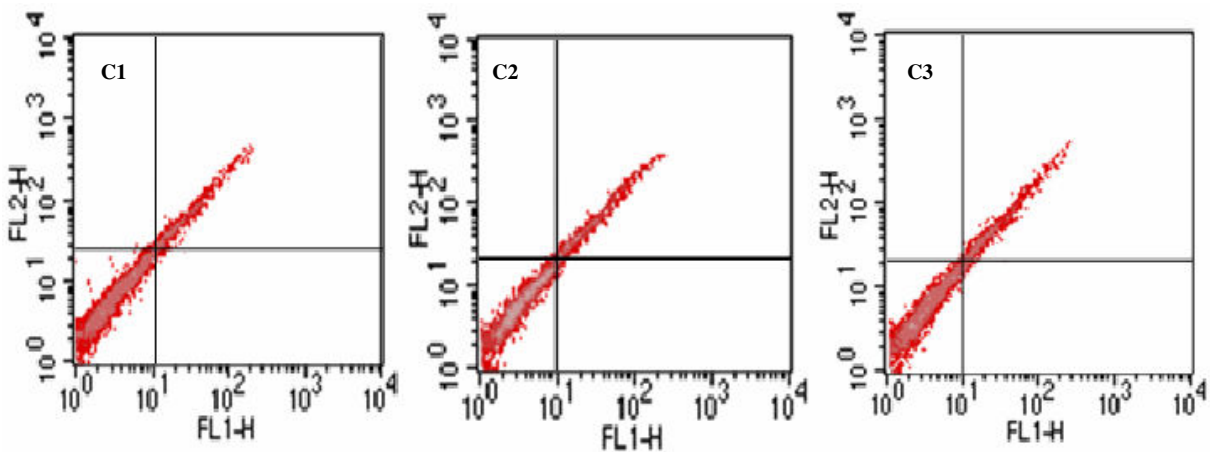


Figura 20. Análise das células CHO745, estimulada com sobrenadante de macrófagos, quanto aos receptores CD36, VCAM-1 e ICAM-1 em sua superfície. Células CHO745 foram incubadas com anticorpos monoclonais: (A) anti-CD36-FITC, (B) anti-VCAM-1-FITC e (C) anti-ICAM-1-PE. Nas amostras (1) os macrófagos foram estimulados com meio RPMI, nas de número (2) receberam LPS e nas amostras (3) os macrófagos foram infectados com DENV-3.

5 - DISCUSSÃO

A dengue é provavelmente a doença viral transmitida por um vetor artrópode de maior importância em termos de morbidade e de mortalidade. A fisiopatologia da trombocitopenia e da hemorragia causada pelo dengue é um dos fatores mais importantes nesta patologia. Os mecanismos da trombocitopenia e coagulopatias são complexos envolvendo a ativação das plaquetas, procoagulantes e anticoagulantes, sistema de coagulação, sistema complemento, citocinas e células endoteliais, sendo que a contagem das plaquetas normalmente está relacionada com as hemorragias (SCHEXNEIDER; REEDY, 2005).

No presente estudo demonstramos que o vírus da dengue sorotipo 3 infecta células endoteliais por visualização de antígenos virais de dengue nestas células utilizando anticorpos policlonais anti-DENV-3. Experimentos demonstraram que o vírus dengue é capaz de infectar células endoteliais humanas através da ligação de glicoproteínas do envelope viral com polipeptídios da superfície celular (WEI et al., 2003; JESSIE et al., 2004). A disfunção do endotélio vascular na infecção pelo vírus dengue, bem como outras patologias que apresentam hemorragias, define a célula endotelial como um gatilho para a patogênese da doença.

A HUVEC foi a linhagem celular escolhida para representar um modelo de endotélio vascular nos ensaios *in vitro* de adesão plaquetária após infecção pelo DENV-3. No decorrer do trabalho, questionamos os mecanismos da adesão plaquetária, assim simulando o que ocorre na infecção normal, resolvemos trabalhar com mais uma variável, sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3, como estímulo para a adesão de plaquetas nas células endoteliais. Os resultados que obtivemos quando infectamos as células diretamente ou quando utilizamos o sobrenadante de macrófagos estimulados, foram sensivelmente maiores quando comparado com o controle de meio RPMI. É possível que a ativação da célula endotelial seja mediada pela infecção por vírus dengue e que esta ocorre de forma direta ou indireta, como um resultado da indução de citocinas inflamatórias. De forma semelhante realizando análises

em microarray, Warke et al. (2003) e Dewi et al. (2004) demonstraram, a ativação funcional de HUVEC em resposta a uma inflamação ou quando infectada pelo vírus dengue. Nestes trabalhos, três vias de sinalização foram identificadas na resposta inflamatória durante a infecção pelo vírus dengue: TNF- α , IL-1 β e IFN- α/β . Em trabalho com célula endotelial humana infectada pelo vírus dengue, foi constatado que estas células quando infectadas produziam IL-6 e IL-8, afirmaram ainda, que estas citocinas contribuíam para a patogênese da febre hemorrágica da dengue (HUANG et al., 2000; LEI et al., 2001; HUANG et al., 2003). Trabalhando com IL-8, Talavera et al. (2004), demonstraram que quando células endoteliais eram expostas a esta citocina, sofriam uma reorganização do citoesqueleto, conduzindo assim ao aumento da permeabilidade da monocamada de células endoteliais. Dewi et al. (2004), demonstraram o aumento da permeabilidade das células endoteliais devido ao efeito de citocinas inflamatórias como o fator de necrose TNF- α e IFN- γ , depois da infecção pelo vírus dengue. São muitas as hipóteses para tentar esclarecer a atuação e o aumento da permeabilidade nas células endoteliais, mas o mecanismo exato ainda não foi esclarecido. Possivelmente a infecção direta do vírus dengue ou então a indução de citocinas inflamatórias liberadas pelos macrófagos ou até mesmo pelas próprias células endoteliais, são os responsáveis por esta ativação.

Conhecendo a habilidade do vírus dengue em infectar HUVEC e macrófagos derivados de monócitos humanos, questionamos se não seria possível a infecção das HUVEC através do sobrenadante de macrófagos utilizado como estímulo para as células endoteliais. Esta questão foi investigada por Carr et al. (2003), onde o sobrenadante de macrófagos infectados pelo vírus dengue sorotipo 2 foi utilizado para estimular HUVEC sem induzir a infecção na célula endotelial. Neste estudo ainda foi verificado a produção de TNF- α pelos macrófagos humanos, e que a produção desta citocina explicaria o aumento da permeabilidade em monocamada de células endoteliais quando expostas ao sobrenadante de macrófagos. Este

mecanismo pode estar envolvido nos sintomas clássicos da dengue hemorrágica e do choque da dengue. Observando por este ângulo, em nossos experimentos utilizamos sobrenadante de macrófagos infectados pelo DENV-3 ou estimulados com LPS, e estes, quando comparados não apresentaram diferença significativa na aderência das plaquetas em HUVEC. Possivelmente em nossos experimentos a ativação das células endoteliais ocorre a partir da liberação de uma ou mais citocinas inflamatórias liberadas no sobrenadante de macrófagos depois da infecção pelo vírus ou estímulo de com LPS. Em resposta a uma injúria vascular ou produtos de processos inflamatórios, as plaquetas aderem as células endoteliais ativadas (CLEMETSON, 1999; RUGGERI; MENDOLICCHIO, 2007)

Apoiando esta hipótese Chen e Wang (2002), verificaram que os macrófagos derivado de monócitos humanos, quando infectados pelo vírus do dengue, secretam múltiplas citocinas e quimiocinas da imunidade inata como: TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-8, IL-12, MIP1- α e RANTES, demonstrando então que estas células maduras são funcionalmente competentes no contexto da infecção viral. A secreção de citocinas e quimiocinas da imunidade inata sugere que o acúmulo destes mediadores pode ocorrer em diferentes tecidos que tenha a disseminação do vírus dengue e desta forma gerar uma inflamação localizada. O aumento de TNF- α em sobrenadante de macrófagos derivados de monócitos humanos infectados pelo vírus dengue 2, também foi demonstrado por Espina et al. (2003), que observaram além do aumento de TNF- α o aumento de apoptose. O vírus induzindo o aumento da apoptose em macrófagos, contribui no mecanismo de defesa do hospedeiro contra o próprio vírus. O aumento da apoptose, aumenta a fagocitose de células apoptóticas infectadas e a produção de citocinas inflamatórias.

Para ocorrer a adesão das plaquetas são necessárias moléculas de adesão específicas, estas são responsáveis por mediar às interações plaqueta-plaqueta e plaqueta-endotélio, engajando seus receptores em células endoteliais ou ligantes não celulares do plasma e da

matriz. Para estudar moléculas de adesão envolvidas na interação plaqueta-endotélio, escolhemos a linhagem celular CHO que teve o gene da via de biossíntese do seu receptor nocauteado, e posteriormente por técnica de transfecção, foram introduzidos genes que são responsáveis pela expressão dos receptores, CD36, VCAM-1 ou ICAM-1. Como apresentado na introdução, as plaquetas podem aderir efetivamente a muitos receptores, justamente por isso o modelo experimental utilizando CHO transfectadas se torna muito bom, porque dessa forma pode ser analisado molécula por molécula sem ter que lidar com as HUVEC que tem obrigatoriamente tudo para aderir.

Moléculas de adesão vascular são intensamente e rapidamente induzidas por uma variedade de mediadores inflamatórios tais como: IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e LPS (BEVILACQUA et al., 1987). Normalmente estes receptores de adesão estão presentes na superfície de células como HUVEC de 4 a 6 horas depois da ativação e permanecem até 24 a 48 horas na superfície destas células. É claro que estes receptores podem não ser expressos do mesmo modo temporal e espacial dependendo do receptor *in vivo* ou *in vitro* e também das células endoteliais de micro vasos derivados de diferentes tecidos (TEDDER et al., 1995). Estes dados apresentados corroboram com o nosso trabalho, pois na padronização da infecção celular fizemos uma cinética de infecção para 24, 48 e 72 horas, (dados não apresentados), que demonstrou o aumento das moléculas de adesão na superfície das CHO quando infectadas por DENV-3. Andrews et al. (1978) e Funahara et al., (1987), relataram que os títulos do vírus do dengue aumentaram rapidamente até 48 horas em meio de cultura contendo células endoteliais infectadas. Krishnamurti et al. (2002), demonstraram que a aderência máxima das plaquetas às células endoteliais ocorreu também após 48 horas da infecção pelo vírus. Já Curwen et al. (1980), demonstraram que a máxima aderência das plaquetas nas células endoteliais ocorreu em 30 minutos, após isso a aderência das plaquetas ao endotélio diminuiu. De forma semelhante em um estudo realizado por Funahara et al. (1987), células endoteliais

infectadas pelo vírus dengue e incubadas com plaquetas demonstram um aumento na aderência em 10 minutos. Os experimentos devem progredir na identificação da expressão de diferentes genes das células endoteliais quando estimuladas por diferentes vias. Pois diferentes ligantes e/ou gatilhos estimulam diferentes condições inflamatórias e vias de sinalização.

Nosso primeiro experimento utilizando a linhagem CHO foi de adesão plaquetária, este experimento constatou que a quantidade de plaquetas que se ligou aos receptores CD36, ICAM-1 ou VCAM-1 presentes na superfície das células, foi semelhante quando estas foram infectadas por DENV-3. O resultado da adesão plaquetária pode depender da gravidade do distúrbio ocorrido no endotélio, mas se a ativação das plaquetas também ocorrer, então as plaquetas têm a capacidade de orquestrar uma resposta adicional. Isto vai depender do número e potencial de citocinas inflamatórias e conseqüentemente a modulação da função dos leucócitos (MOHLE et al., 1997). A estimulação por IL-1, TNF- α e o PAF pode iniciar o papel na regulação e/ou expressão de fatores envolvidos no aumento da aderência nas células endoteliais (MANTOVANI et al., 1992; SCHMID et al., 1995). Sendo assim, nossas células podem se ativar diretamente pela infecção do vírus, o que levaria a mudança e/ou aumento de moléculas em sua superfície e a liberação de citocinas, já as células que recebem o sobrenadante de macrófagos infectados seriam ativadas pelas citocinas inflamatórias liberadas pelos macrófagos. As citocinas presentes no meio podem ativar as plaquetas também o que facilitaria sua ligação às células.

Diversos trabalhos na literatura investigaram porque as plaquetas normalmente não aderem ao endotélio vascular dos vasos sanguíneos. Foi suposto como responsável pela falta de aderência das plaquetas ao endotélio vascular a inativação das plaquetas pela prostagladina PGI₂ liberada pelas próprias células endoteliais (DEJANA et al., 1979; CZERVIONKE et al.,

1979). Entretanto, esta hipótese não foi suportada pelo trabalho de alguns investigadores semelhantes a Curwen et al. (1980), e o papel de PGI₂ na prevenção da adesão das plaquetas.

Muitos estudos já demonstraram que as plaquetas aderem às células do endotélio vascular quando cultivadas na presença de trombina (CZERVIONKE et al., 1978; FRY et al., 1980; HOAK et al., 1980). As observações feitas em vídeo reforçam os resultados observados ao microscópio, sugerindo que a trombina pode estar envolvida nos danos e na formação de trombos formados pelas plaquetas nas células do endotélio vascular (ITOH et al., 1998). Além disso, um aumento de protrombina é um indicativo de um aumento na geração de trombina, que poderia também conduzir a uma ativação das células endoteliais e das plaquetas (KAPLAN et al., 1989; KRISHNAMURTI et al., 2001). No presente estudo não utilizamos nenhum estímulo para ativação da plaqueta, a não ser, que esta ocorra através da liberação de citocinas presentes no sobrenadante das células estimuladas.

No trabalho de Krishnamurti et al. (2002) a infecção das HUVEC com o vírus dengue sorotipo 2, apresentou um aumento significativo da aderência das plaquetas nas células infectadas em comparação com as células que foram estimuladas com LPS ou TNF- α . Em nosso estudo não encontramos diferença significativas das células que foram infectadas com o vírus e que receberam LPS como estímulo. Diferente do trabalho acima citado, em nosso estudo, não utilizamos citocinas recombinantes, parte de nossos experimentos foram realizados utilizando como fonte de estímulo o sobrenadante de macrófagos, previamente estimulados pelo vírus ou então LPS, presumindo que dessa forma o macrófago ativado liberaria citocinas inflamatórias e assim, podemos mimetizar *in vitro* o que ocorre *in vivo*.

Estudos já citados neste trabalho descrevem a habilidade na produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias por macrófagos derivados de monócitos humanos infectados previamente pelo vírus dengue, demonstrando então que estas células maduras são funcionalmente competentes no contexto da infecção viral. Em nosso sistema, CHO

transfectadas com genes de CD36, ICAM-1 ou VCAM-1 foram estimuladas com sobrenadante de macrófagos infectados pelo vírus DENV-3 ou estimulados com LPS. Em nosso estudo houve um aumento na expressão das moléculas CD36, ICAM-1 ou VCAM-1 na superfície das CHO. Nos experimentos utilizamos sobrenadante de macrófagos infectados pelo vírus DENV-3 ou estimulados com LPS, e estes estímulos, quando comparados não apresentaram diferença significativa na expressão das moléculas de adesão nas CHO transfectadas. Este fato pode ser explicado pela via de ativação do macrófago que deve ser a mesma para a infecção pelo vírus dengue e o LPS, que levaria a liberação das mesmas citocinas ou citocinas com funções semelhantes. As citocinas inflamatórias liberadas no sobrenadante da cultura de macrófagos seriam capazes de ativar células endoteliais e estas expressariam as moléculas de adesão, portanto, ligariam um maior número de plaquetas quando comparado ao o meio RPMI.

Com o uso de marcadores fluorescentes tais como CD42a e CD62a (ROTHWELL et al., 1998), demonstraram utilizando citometria de fluxo, que as plaquetas aderem as células endoteliais ativadas. Durante a inflamação, moléculas da adesão tais como E-selectin, P-selectin, VCAM-1 e ICAM-1 são induzidas e/ou estão altamente expressas nas células endoteliais (CARLOS; HARLAN, 1994). Em outro sistema de células endoteliais estimuladas, são marcadas com anticorpos específicos para E-selectin e P-selectin, ligantes de E-selectin e P-selectin são expressos na superfície das plaquetas (Frenette et al., 1998). É possível que selectinas de plaquetas e células endoteliais interajam superficialmente participando assim do processo inflamatório. Em nosso sistema, de CHO transfectadas com genes de CD36, ICAM-1 ou VCAM-1 houve um aumento na expressão dessas moléculas na superfície das CHO. Assim como não encontramos diferenças significativas, quanto à adesão plaquetária em HUVEC e CHO, quando infectamos estas células ou estimulamos com LPS, o

mesmo ocorreu com a expressão de CD36, ICAM-1 e VCAM-1 na superfície das CHO transfectadas.

Experimentos utilizando células endoteliais e infecção pelo vírus dengue demonstraram que a célula endotelial é capaz de liberar citocinas e quimiocinas e aumentar a expressão de ICAM-1 em sua superfície e a habilidade de aderir leucócitos (PEYREFITTE et al., 2005; LIN et al., 2005)

Bombeli et al. (1998), evidenciaram que as plaquetas se ligam a HUVEC usando fibrinogênio como mediador da ligação. Além do local de ligação da β_2 integrina e ICAM-1 endotelial tem sido mostrado a presença de um epitopo para a ligação do fibrinogênio para mediar a ligação do leucócito (LANGUINO et al., 1993; LANGUINO et al., 1995). O tratamento de HUVEC com anticorpos monoclonais bloqueando o local de ligação do fibrinogênio diminuiu a ligação das plaquetas ativadas em 50 % (BOMBELI et al., 1998). A utilização de anticorpos monoclonais anti-ICAM-1, que reconhece o epitopo da β_2 integrina também diminuiu a ligação das plaquetas, sugerindo uma reatividade cruzada com a ligação do fibrinogênio (BOMBELI et al., 1998). A região descrita foi localizada dentro do primeiro domínio de imunoglobulina da molécula de ICAM-1 (D'SOUZA et al., 1996) que está também envolvida na ligação dos leucócitos.

Além da integrina $\alpha_2\beta_3$ e ICAM-1 estarem envolvidas na adesão em células endoteliais, adicionalmente temos a GPIb α envolvida na ativação e ligação das plaquetas a monocamada de células endoteliais. A adesão plaquetária pode ser bloqueada significativamente quando as HUVEC são tratadas previamente com anticorpos monoclonais anti- GPIb α (BOMBELI et al., 1998).

No mesmo estudo Bombeli et al. (1998), mensurando a ligação das plaquetas em monocamadas de células endoteliais por citometria de fluxo, demonstraram que as plaquetas ativadas ligam-se diretamente a receptores nas células endoteliais, mais do que a proteínas

expostas pela matriz intercelular, evidenciando que a superfície da célula endotelial, e não as proteínas associadas a matriz intercelular estão envolvidas na ligação das plaquetas. Uma suspensão de HUVEC incubadas com anticorpos monoclonais que bloqueiam a interação das proteínas como o fator de von Willebrand, colágeno IV e fibronectina, não inibe a adesão plaquetária em monocamada de células endoteliais (BOMBELI et al., 1998). Testaram ainda, a contribuição da ativação das plaquetas dependentes de moléculas de adesão incluindo P-selectina, E-selectina e VCAM-1. Se tratando da molécula de adesão VCAM-1, em nossos experimentos utilizando a linhagem CHO transfectada com o gene para expressão de VCAM-1, quando infectada com o vírus dengue ou estimulada por macrófagos previamente infectados, as CHO/VCAM-1 apresentaram o menor aumento de receptores comparado com a expressão de CD36 e ICAM-1. Uma menor expressão de VCAM-1 pode ser explicada por uma pequena e/ou falta de indução para uma maior regulação deste receptor.

O envolvimento dos receptores das células endoteliais ICAM-1, integrina $\alpha_2\beta_3$ e GPIIb α na ativação e ligação das plaquetas sugerem que o bloqueio destes receptores pode agir com um efeito antitrombogênico, até mesmo porque as moléculas de adesão vascular são altamente reguladas por vários estímulos exógenos. Células endoteliais ativadas podem aumentar as moléculas de adesão e com elas a ligação das plaquetas ativadas e contribuir para a formação de trombos ou o seqüestro das plaquetas, e assim, a trombocitopenia.

Pacientes infectados com vírus dengue que desenvolveram a febre da dengue ou a febre hemorrágica da dengue apresentaram marcante trombocitopenia (KRISHNAMURTI et al., 2002). Em um esforço para explicar as causas da trombocitopenia em pacientes infectados pelo vírus da dengue, trabalhamos com um modelo *in vitro* que demonstrou um aumento significativo na aderência das plaquetas em culturas de células endoteliais infectadas pelo vírus da dengue ou estimuladas com o sobrenadante de macrófagos derivados de monócitos humanos infectados.

As manifestações clínicas da dengue são febre e hemorragia (BHAMARAPRAVATI et al., 1967). As manifestações hemorrágicas são relacionadas a diversos fatores incluindo a trombocitopenia. Defeitos nas funções das plaquetas e sua sobrevivência diminuída foram estudados para descrever esta coagulopatia (SRICHAIKUL et al., 1989; MITRAKUL et al., 1977; MITRAKUL, 1979). Estudos também demonstraram que a destruição das plaquetas parece ocorrer por causa da ativação do sistema complemento (MALASIT, 1987; MALASIT et al., 1990; WANG et al., 1995). Em estudo envolvendo crianças hospitalizadas com a febre da dengue e febre hemorrágica da dengue, sugeriram a hipótese que durante a infecção pelo dengue a fração principal das plaquetas circulantes se apresenta ativadas (KRISHNAMURTI et al., 2002). Conseqüentemente, as plaquetas ativadas são removidas da circulação ou perdem a habilidade de promover a formação dos coágulos. Outros dados sugerem que a alteração vascular pode ser o fator principal envolvido na associação da trombocitopenia com as hemorragias e a severidade da doença. A infecção pelo vírus dengue nas células endoteliais e as citocinas liberadas pelos macrófagos infectados, seriam capazes de modificar e/ou aumentar o repertório de moléculas na superfície das células facilitando a adesão de plaquetas previamente ativadas pelas citocinas no sobrenadante celular.

Em nosso sistema de CHO transfectadas com genes para receptores CD36, ICAM-1 ou VCAM-1 quando estas são infectadas pelo vírus dengue ou estimuladas por LPS; quando recebem o estímulo através do sobrenadante de macrófagos infectados ou estimulados por LPS, a expressão dos receptores diferem quanto ao tipo de estímulo que a célula sofreu, diretamente ou através do sobrenadante de macrófagos estimulados, e também quanto aos receptores que cada célula apresenta (CD36, ICAM-1 ou VCAM-1). Com relação à adesão plaquetária não ocorreu uma diferença significativa apresentada nos diferentes ensaios para os diferentes receptores. Mas quanto à expressão dos receptores, a molécula CD36 foi a que apresentou um maior aumento em nossos ensaios e este aumento foi ainda maior quando a

célula é infectada diretamente, fato semelhante a expressão da molécula ICAM-1 onde, também ocorreu um maior aumento de sua expressão quando esta célula é infectada diretamente. A expressão de VCAM-1 foi muito semelhante nos dois sistemas de estímulos utilizados, com um discreto aumento na expressão da molécula nas células que são incubadas com o sobrenadante de macrófagos estimulados. A diferença apresentada em nosso trabalho na expressão das moléculas de adesão pode ser explicada pela utilização de diferentes vias de sinalização para estes receptores e/ou o estímulo que serve de gatilho para iniciar a ativação celular e expressão de cada uma destas moléculas.

A molécula de adesão CD36 esta presente em plaquetas e células endoteliais, Wassmer et al. (2004), demonstraram com eritrócitos infectados pelo *Plasmodium falciparum*, que as plaquetas formavam uma ponte, ligando a célula endotelial ao eritrócito infectado, e que o CD36 foi responsável por fazer a ligação entre célula endotelial-plaqueta e plaqueta-eritrócito infectado, comprovando isso em experimentos realizados com células endoteliais que não expressavam CD36. De forma semelhante o CD36 auxilia na ligação da plaqueta a célula endotelial na infecção pelo vírus dengue. Possivelmente as citocinas inflamatórias que favorecem a expressão de CD36 nas células endoteliais na dengue são as mesmas na malária.

O fator de von Willebrand contribui para a função das plaquetas mediando o início da formação e progressão de trombos em locais de injúria tecidual, contribuindo para a adesão e ativação das plaquetas (RUGGERI, 2003; SOSOTHIKUL et al., 2007). André et al. (2000), descrevem uma grande interação entre as plaquetas e vênulas de mesentério *in vivo* onde seus efeitos são induzidos e posteriormente reversíveis. Neste estudo os autores verificaram que as plaquetas aderem passageiramente ao endotélio quando estimuladas e que este fenômeno é mediado pelo fator de von Willebrand, foi descrito também a existência de pequenos espaços entre as células endoteliais sugerindo a circulação e translocação das plaquetas através do

endotélio intacto. A adesão de plaquetas mediada pelo fator de von Willebrand foi também descrita *in vitro* em células endoteliais da veia umbilical humana infectadas com o vírus da herpes (ETINGIN et al., 1993).

Muitas situações expõem formas altamente reativas de moléculas de adesão que gera rapidamente uma importante acumulação local de plaquetas e leucócitos; isto pode ser explicado por uma variedade de estímulos, como a hipóxia (PINSKY et al., 1996), infecção viral ou bacteriana (ETINGIN et al., 1993; SPORN et al., 1991), trombina (CZERVIONKE et al., 1978; VENTURINI et al., 1989), mediadores inflamatórios (SCHORER et al., 1987; HAMILTON; SIMS, 1987), componentes do complemento C5b-9 (HATTORI et al., 1989), radicais de oxigênio (PATEL et al., 1991) ou deposição de fibrina (RIBES et al., 1987).

A adesão plaquetária, a trombocitopenia e as disfunções das plaquetas, têm sido muito estudadas na dengue e em outras viroses (MITRAKUL, 1979; FUNAHARA et al., 1987; HALSTEAD, 1989; LI et al., 1996; KRISHNAMURTI et al., 2001; KRISHNAMURTI et al., 2002; UPADHYA; STRASBERG, 2002; CARR et al., 2003; DESVARIEUX et al., 2005; IANNAcone et al., 2008). Em recente estudo foi mostrado que a infecção em camundongos pelo vírus da coriomeningite linfocítica causa trombocitopenia, disfunção das plaquetas e anemia hemorrágica, que é letal (IANNAcone et al., 2008). A originalidade do trabalho, é que a anemia hemorrágica letal depende da indução do vírus, para a produção de IFN- α/β , que é responsável pela disfunção das plaquetas nesta patologia.

Quando infectadas pelo DENV-3 ou estimuladas pelo sobrenadante de macrófagos infectados, HUVEC e CHO apresentam um aumento de CD36, ICAM-1 e VCAM-1 em sua superfície o que explica o aumento na adesão de plaquetas observado neste trabalho, o mesmo não ocorre com a linhagem CHO745 que não expressa estes receptores. É possível que ocorra a ativação da célula endotelial, quando ela é infectada pelo vírus dengue ou estimulada pelo sobrenadante de macrófagos infectados, isso ocasionaria o aumento da expressão de

receptores e/ou a liberação de agentes, tais como citocinas, que na seqüência ativa as plaquetas aumentando sua aderência ao endotélio e sua fuga para o espaço subendotelial. Este fenômeno acontecendo de forma generalizada no endotélio vascular pode explicar a trombocitopenia observada na doença ocasionada pelo vírus dengue.

6 - CONCLUSÕES

Neste trabalho concluímos que:

O vírus dengue sorotipo 3 é capaz de infectar células provenientes da veia umbilical humana.

As células provenientes da veia umbilical humana, quando infectadas pelo vírus dengue sorotipo 3 ou estimuladas por sobrenadante de macrófagos infectados, são capazes de aumentar a adesão das plaquetas em sua superfície.

As linhagens celulares CHO transfectadas com os receptores de adesão celular CD36, ICAM-1 e VCAM-1, são bons modelos para trabalhar com infecção pelo vírus dengue.

As linhagens celulares CHO transfectadas com os receptores de adesão celular CD36, ICAM-1 e VCAM-1, e estimuladas pelo vírus dengue sorotipo 3 ou sobrenadante de macrófagos infectados, são capazes de aumentar o número de moléculas e a aderência de plaquetas em sua superfície.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ, P. et al. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. **Blood**. v.96, p.3322-8, 2000.

ANDREWS, B.S. et al. Replication of dengue and junin viruses in cultured rabbit and human endothelial cells. **Infect. Immun.** v. 20, p.776-81, 1978.

BANCROFT, T.L. On the etiology of dengue fever. 1906. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2ª ed. São Paulo : Atheneu, 2002. Cap.13. p.204.

BARRETO, M.L.; CARMO, E.H. Situação de saúde da população brasileira: tendências históricas, determinantes e implicações para as políticas de saúde. **Informe Epidemiológico do SUS**. v.3, p.7-34, 1994.

BEESON, J.G. et al. *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. **J. Infect. Dis.** v.180, p.464-72, 1999.

BENTE D, D.A.; RICO-HESSE, R. Models of virus infection. **Drug Discov Today**. v.3, n.1, p.97-103, 2006.

BETHELL D.B. et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis.** v.177, p.778-82, 1998.

BEVILACQUA, M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annu. Rev. Immunol.** v.11, p.767, 1993.

BHAMARAPRAVATI, N.; TUCHINDA, P.; BOONPUCKNAVIK, V. Pathology of Thailand hemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v.61, p.500-10, 1967.

BOMBELI, T.; SCHWARTZ, B.R.; HARLAN, J.M. Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha\beta 3$ integrin, and GPIb α . **J. Exp. Med.** v.187, p.329-39, 1998.

BOMBELI, T.; SCHWARTZ, B.R.; HARLAN, J.M. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. **Blood**. v.93, p.3831-8, 1999.

BRETT, J. et al. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. **J. Exp. Med.** v.169, p.1977, 1989.

BUTCHER, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three or more steps to diversity and sensitivity. **Cell.** v.67, p.1033, 1991.

CBRINSTITUTE. CBR Institute for Biomedical Research. Disponível em: <<http://www.cbrinstitute.org/labs/wagner/media/images/image1.jpg>>. Acesso em: 24 out. 2007.

CALISHER, C.H. et al. Antigenic Relationships between *Flavivirus* as determined by cross-neutralizations tests with polyclonal antisera. **J. Gen. Virol.** v.70, p.37-73, 1989.

CARLOS, T.M.; HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood.** v.84, p.2068-101, 1994.

CARR, J.M. Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. **Journal of Medical Virology.** v.69, p.521-8, 2003.

CHEN, Y.C.; WANG, S.Y. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. **J. Virol.** v.76, p.9877-87, 2002.

CLEMETSON, K.J. Primary haemostasis: sticky fingers cement the relationship. **Curr Biol.** v.9, p.110-2, 1999.

COCHRANE, C.G.; GIMBRONE, M.A., Jr. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. In: **Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation.** San Diego : Academic Press, 1992.

COTRAN, R.S. Endothelial cells. In: Kelley, W.N. et al. **Textbook of Rheumatology.** 4th ed. Philadelphia : W.B. Saunders Co., 1993. p.327-36.

CURWEN, K.D.; GIMBRONE, M.A.; HANDIN, R.I. In vitro studies of thromboresistance: the role of prostacyclin (PGI₂) in platelet adhesion to culture normal and viral transformed human vascular endothelial cells. **Lab. Invest.** v.42, p.366-74, 1980.

CZERVIONKE, R.L. et al. Inhibition of prostacyclin by treatment of endothelium with aspirin: correlation with platelet adherence. **J. Clin. Invest.** v.63, p.1089-92, 1979.

DEJANA, E. et al. Effect of inhibition of PGI₂ production on platelet adherence to damaged and undamaged rabbit aortae *in vitro* and *in vivo*. **Fed. Proc.** v.38, p.1271, 1979.

DESVARIEUX, M. et al. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the oral infections and vascular disease epidemiology study. **Circulation.** v.111, p.576-82, 2005.

DEWI, B.E.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. [J Virol Methods.](#) v.121, n.2, p.171-80, 2004.

D'SOUZA, S.E. et al. Identification of an active sequence within the first immunoglobulin domain of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) that interacts with fibrinogen. **J. Biol. Chem.** v.271, p.24270-7, 1996.

DYE, C. The analysis of parasite transmission by blood sucking insects. Annual Review Entomology. v.37 p.1-19, 1992. In: TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M.L.; GUERRA, Z. **Epidemiologia e Medidas de Prevenção de Dengue.** 1999. p.7-8.

ESKO, J.D.; STEWART, T.E.; TAYLOR, W.H. Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.82, p.3197-201, 1985.

ESKO, J.D. et al. Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. **J Biol Chem.** v.262, p.12189-95, 1987.

ESPINA, L.M. et al. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor- α caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.68, p.48-53, 2003.

ETINGIN, O.R.; SILVERSTEIN, R.L.; HAJJAR, D.P. Von Willebrand factor mediates platelet adhesion to virally infected endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.90, p.5153-6, 1993.

FIELDS, B. et al. **Fields Virology.** 4^a ed. Philadelphia : Lippincott-raven publish, 2001. p.1043.

FIGUEIREDO, L.T.M.; FONSECA, B.A.L. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2ª ed. São Paulo : Atheneu, 2002. Cap.13. p.204.

FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz. Produced by Claire Kubelka. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br>>. Acesso em: 24 out. 2007.

FRENETTE, P.S. et al. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. **Blood**. v.91, p.1318-24, 1998.

FRIED, M.; DUFFY P.E. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. **Science**. v.272, p.1502-4, 1996.

FRY, G.L. et al. Platelet adherence to cultured vascular cells: influence of prostacyclin (PGI²). **Blood**. v.55, p.271-5, 1980.

FUNAHARA, Y. et al. Three possible triggers to induce thrombocytopenia in dengue virus infection. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. v.18, p.351-5, 1987.

GUBLER D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. P.R. **Health Sci. J**. v.6, p.107-11, 1987.

GUBLER D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York : CAB international, 1997. p.1-22.

GUBLER D.J. Cities spawn epidemic dengue viruses. **Nature**. v.10, n.2, p.129-30, 2004.

GUBLER D.J.; CLARK G.G. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. **Am J Trop Med Hyg**. v.50, p.50-60, 1994.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**. v. 3, p.621-7, 1996.

GYSIN, J. et al. Ex vivo desequestration of *Plasmodium falciparum* erythrocytes from human placenta by chondroitin sulfate A. **Infect Immun**. v.67, p.6596-602, 1999.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**. v.239, p.476-81, 1988.

HALSTEAD, S.B. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Rev. Infect. Dis.** v.11, p.S830-9, 1989.

HALSTEAD, S.B. Epidemiological aspects of dengue and chikungunya infections. 1971. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2º ed. São Paulo : Atheneu. Cap.13. p.204, 2002.

HAMILTON, K.K.; SIMS, P.J. Change in cytosolic Ca²⁺ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine: study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. **J. Clin. Invest.** v.79, p.600-8, 1987.

HASLER T. et al. An improved microassay for Plasmodium falciparum cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, p.332-47, 1993.

HATTORI, R. et al. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. **J. Biol. Chem.** V.264, p.9053-60, 1989.

HAYES E.B.; GUBLER D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Pediatr Infect Dis J.** v. 11, p.311-7, 1992.

HENCHAEEL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews.** v.3, p.376-96, 1990.

HOAK, J.C. et al. Interaction of thrombin and platelets with the vascular endothelium. **Fed. Proc.** v.39, p.2606-9, 1980.

HOBBER, D. et al. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) in dengue infected patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.48, n.3, p.324-31, 1993.

HOTTA, S.; MIKURA, R. Experimental studies on dengue 1: isolation identification and modification of the virus. **J. Infect. Dis.** v.90, p.1-9, 1952. In: FIELDS, B. et al. **Fields Virology**. 3ª ed. Philadelphia : Lippincott-raven publish. v.1, 2001.

HUANG, Y.H. et al. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.63, p.71-5, 2000.

HUANG, Y.H. et al. Tissue plasminogen activator induced by dengue virus infection of human endothelial cell. **J. Med. Virol.** v.70, p.610-6, 2003.

IANNACONE, M. et al. Platelet prevent IFN-alpha/beta induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus. **Proc Nat Acad. Sc. USA.** v.105 p.629-34, 2008.

ITOH, Y. et al. Platelet adhesion to aortic endothelial cells in vitro after thrombin treatment: observation with video enhanced contrast microscopy. **Thromb Rs.** v.91, p.15-21, 1998.

JAFFE, E.A. et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. **J. Clin. Invest.** v.52, p.2745-64, 1973.

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, p.1411-8, 2004.

KAPLAN, J.E. et al. Platelets adhere to thrombin-treated endothelial cells in vitro. **Am. J. Physiol. Soc.** v.257, p.423-33, 1989.

KING, A.; INNIS, B.L.; CAUDLE, L. B-cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. **FASEB J.** v.5, 1991.

KRISHNAMURTI, C. et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.65, p.840-7, 2001.

KRISHNAMURTI, C. et al. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.66, n.4, p.435-41, 2002.

KURANE, I.; EENNIS, F.E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Semin. Immunol.** v.4, p.121-7, 1992.

LAGADEC, P. et al. Involvement of a CD47-dependent pathway in platelet adhesion on inflamed vascular endothelium under flow. **Blood.** v.101, p.4836-43, 2003.

LANGUINO, L.R. et al. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. **Cell.** v.73, p.1423-34, 1993.

LANGUINO, L.R. et al. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1- fibrinogen recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.92, p.1505-9, 1995.

LEI H.Y. et al. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **J. Biomed. Sci.** v.8, p.377-88, 2001.

LI, J.M. et al. Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. **Journal of Surgical Research.** v.61, p.543-8, 1996.

LIN, C.F. et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induce by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. **The Journal of Immunology.** v.174, p.395-403, 2005.

LUSTER, A.D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.** v.338, p.436-45, 1998.

MACKENZIE, J. M.; JONES, J.M.; YOUNG, P. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology.** v.220, p.232-40, 1996.

MALASIT, P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** v.18, p.316-320, 1987.

MALASIT, P. et al. Surface associated complement fragments (C3a) on platelets from patients with dengue infection. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** v.21, p.705, 1990.

MANTOVANI, A.; BUSSONLINO, F.; DEJANA, E. Cytokine regulation of endothelial cell function. **FASEB J.** v.6, p.2591-9, 1992.

MARTINEZ-TORRES, M.E. Dengue hemorrágico em crianças. Havana, José Martí. p.180, 1990. In: TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M.L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS 1999.** v.8, n.4, p.5-33, 1999.

MASSBERG, S. et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. **Blood.** v.94, p.3829-38, 1999.

MAUBERT, B.; GUILBERT, L.J.; DELORON, P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular adhesion molecule 1 and chondroitin-4-sulfate expressed by the syncytiotrophoblast in the human placenta. **Infect Immun.** v.65, p.1251-7, 1997.

MAY, A.E.; NEUMANN, F.J.; PREISSNER, K.T. The relevance of blood cell-vessel wall adhesive interactions for vascular thrombotic disease. **Thromb Haemost.** v.82, p.962-70, 1999.

MICHEL, C.C. Capillaries, caveolae calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v.30, p.2541-6, 1998.

MITRAKUL, C. et al. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.26, p.975-84, 1977.

MITRAKUL, C. Bleeding diathesis in dengue hemorrhagic fever. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** v.10, p.434-7, 1979.

MOHLE, R. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.94, p.663-668, 1997.

MONATH, T.P.; HEINZ, F.X. *Flaviviruses*. 1996. In: FIELDS, B. et al. **Fields Virology**. 3.ed. Philadelphia : Lippincott-raven publish. v.1. 2001. p.961-1034.

MONCADA, S. et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature.** v.263, p.663-5, 1976.

NOGUEIRA, R.M.R.; ZAGNER, S.M.O.; MARTINS, I.S.M. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.86, p.269, 1991.

PATEL, K.D. et al. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. **J Cell. Biol.** v.112, p.749-59, 1991.

PEYREFITTE, C.N. et al. Dengue virus infection of human microvascular endothelial cell from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. **Journal of Medical Virology.** v.78, p.229-42, 2006.

PINSKY, D.J. et al. Reduced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies: a mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. **J. Clin. Invest.** v.97, p.493-500, 1996.

POBER, J.S.; COTRAN, R.S. Overview: The role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation.** v.50, p.537, 1990.

PRYOR, M.J. et al. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.65, p.427-34, 2001.

RIBES, J.A.; FRANCIS C.W.; WAGNER, D.D. Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. **J. Clin. Invest.** v.79, p.117-23, 1987.

RIGAU-PEREZ J.G. et al. Dengue severity throughout seasonal changes in incidence in Puerto Rico, 1989-1992. The Puerto Rico Association of Epidemiologists. **Am J Trop Med Hyg.** v.51, p.408-15, 1994.

RODGERS, G.M. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. **FASEB J.** v.2, p.116-23, 1988.

RODHAIN, F.; ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS 1999.** v.8, n.4, p.5-33, 1999.

ROSEN, L. Further observations on the mechanism of vertical transmission of *Flaviviruses* by *Aedes* mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.39, p.123-6, 1988.

ROSENBLUM, W.I. et al. Role of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) in platelet adhesion/aggregation over injured but not denuded endothelium in vivo and ex vivo. **Stroke.** v.27, p.709-11, 1996.

ROTHMAN A.L.; ENNIS F.A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology.** v.257, n.1, p.1-6, 1999.

ROTHWELL, S.W.; MAGLASANG, P.; KRISHNAMURTI, C. Survival of fresh human platelets in a rabbit model as traced by flow cytometry. **Transfusion.** v.38, p.550-6, 1998.

RUGGENENTI, P.; REMUZZI, G. Thrombotic microangiopathies. **Rev. Oncol. Hematol.** v.11, p.243, 1991.

RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. **J. Thromb. Haemost.** v.1, p.1335-45, 2003.

RUGGERI, Z.M.; MENDOLICCHIO G.L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circulation Research.** v.100, p.1673-85, 2007.

SABIN, A.B. Research on dengue during world war II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.1, p.30-50, 1952. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, 2ª ed. São Paulo : Atheneu. Cap.9. 2002. p.172.

SCHERER, W. F. The complexity of arbovirus nomenclature: a proposal to simplify it. *Am. J. Epidemiology* 88, p.145-146, 1968. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, 2ª ed. 2v. São Paulo : Atheneu. Cap.13. 2002. p.206.

SCHEXNEIDER, K.I.; REEDY, E.A. Thrombocytopenia in dengue fever. **Curr. Hematol. Rep.** v.4, p.145-8, 2005.

SCHMID, E. et al. Signaling By E-selection and ICAM-1 induces endothelial tissue factor production via autocrine secretion of platelet-activating factor and tumor necrosis factor alpha. **J. Interferon Cytokine Res.** v.15, p.819-25, 1995.

SCHORER, A.E.; MOLDOW, C.F.; RICK, M.E. Interleukin-1 or endotoxin increases the releases of von Willebrand factor from human endothelial cells. **Br. J. Haematol.** v.67, p.193-97, 1987.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. **Informativo Epidemiológico**, 1988.

SILER, J.F.; HALL, M.W.; KITCHENS, A.P. Dengue: Its history epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J. Sci.* v.29, p.1-304, 1926. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2ª ed. São Paulo : Atheneu. Cap.13. 2002. p.204.

SIMMONS, J.S.; St. JOHN, J.H.; REYNOLDS, F.H.K. Experimental studies of dengue. *Philippine J. Sci.* v.44, p.1-251, 1931. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; associate editors. **Fields Virology**. v.1. 4ª ed. Philadelphia : Lippincott Williams e Wilkins. Cap.33. 2001. p.1081.

SOSOTHIKUL, D. et al. Activation of endothelial cell, coagulation and fibrinolysis in children with dengue virus infection. **Thromb. Haemost.** v.97, p.627-34, 2007.

SPIEGEL, M.R. **Estatística**. 3ª ed. São Paulo : Makron Books. Cap.11. 2003. p.285-6.

SPORN, L.A. *Rickettsia rickettsii* infection of cultured endothelial cells induces release of large von Willebrand factor multimers from Weibel-Palade bodies. **Blood**. v.78, p.2595-602, 1991.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte circulation and leukocyte migration: The multistep paradigm. **Cell**. v.76, p.301, 1994.

SRICHAIKUL, T. et al. Platelet function during the acute phase of dengue hemorrhagic fever. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**. v.20, p.19-25, 1989.

TAKEDA, A.; ENNIS F.A. FcR-mediated enhancement of HIV-1 infection by antibody. **AIDS. Res Hum Retroviruses**, v.6, p.999-1004, 1990.

TALAVERA, D. et al. IL8 relelase, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induce by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. **J. Gen. Virol.** v.85, p.1801-13, 2004.

TAUIL, P.L. Urbanization and dengue ecology. **Cad. Saúde Pública**. n.17, p.99-102, 2001.

TEDDER, T.F. et al. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB J.** v.9, p.866-73, 1995.

TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M.L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**. v.8, p.5-33, 1999.

TEIXEIRA, M.G. et al. Dinâmica de circulação do vírus da dengue em uma área metropolitana do Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.12, n.2, p.87-97, 2003.

TRAVIS, J.T. Biotech gets a grip on cell adhesion. **Science**. v.26, p.906, 1993.

UPADHYA, G.A.; STRASBERG, S.M. Platelet adherence to isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation, **Transplantation**. v.73, n.11, p.1764-70, 2002.

UTMB. Graduate School of Biomedical Sciences at UTMB. Disponível em: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig72_4.JPG>. Acesso em: 24 out. 2007.

VASCONCELOS, P.F.; MENEZES, D.B.; MELO, L.P. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** 1994.

VAUGHN, D.W. et al. Dengue viremia titre, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J. Infect. Dis.** v.181, p.2-9, 2000.

VENTURINI, C.M. et al. Rat platelets adhere to human thrombin-treated rat lungs under flow conditions. **Thromb. Haemost.** v. 62, p.1006-10, 1989.

VIEIRA, D.S. et al. Characterization of dengue virus serotype 1 in epidemics in Porto Velho, Rondonia, in 2001-2003. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.40, p.268-71, 2007.

WANG, S. et al. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. **Virology**. v.213, p.254-7, 1995.

WARKE, R.V. et al. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. **J. Virol.** v.77, p.11822-32, 2003.

WASSMER, S.C. et al. Platelets reorient *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. **The Journal of Infectious Diseases**. v.189, p.180-9, 2004.

WATERMAN S.H.; GUBLER D.J. Dengue fever. **Clin Dermatol.** v.7, p.117-22, 1989.

WEI, Hui-Yong, et al. Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. **Journal of General Virology**. v.84, p.3095-8, 2003.

WELSH, R.M.; ROTHMAN, A.L. Dengue immune response: low affinity, high febrility.
Nature. v.9, n.7, p.820-2, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)