

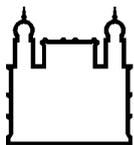
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

PERFIL HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR DO
ENVOLVIMENTO PULMONAR NAS FORMAS FATAIS DE DENGUE

FERNANDA CAPELO BARROSO

Fortaleza
Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

FERNANDA CAPELO BARROSO

Perfil Histopatológico e Molecular do Envolvimento Pulmonar nas Formas Fatais de
Dengue

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Medicina Tropical

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Flávia Barreto dos Santos
Prof^a. Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu

FORTALEZA

Julho de 2017

Barroso, Fernanda Capelo.

Perfil Histopatológico e Molecular do Envolvimento Pulmonar nas Formas Fatais de Dengue / Fernanda Capelo Barroso. - Rio de Janeiro, 2017.
144 f.; il.

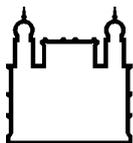
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Flávia Barreto dos Santos.

Co-orientadora: Margarida Maria de Lima Pompeu.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Arbovirose. 2. Dengue. 3. Edema. 4. Hemorragia. 5. Pneumonite. I.
Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: FERNANDA CAPELO BARROSO

**PERFIL HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR DO ENVOLVIMENTO
PULMONAR NAS FORMAS FATAIS DE DENGUE**

ORIENTADORAS: Prof^a. Dr^a. Flávia Barreto dos Santos
Prof^a. Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu

Aprovada em: 20/07/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Filipe Aníbal Carvalho Costa – Presidente (FIOCRUZ-RJ)
Prof^a. Dr^a. Cristiane Cunha Frota (Universidade Federal do Ceará – UFC)
Prof. Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira (FIOCRUZ-BA)
Prof. Dr. Marcelo Alcântara Holanda (Universidade Federal do Ceará – UFC)

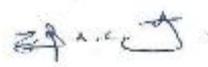
Fortaleza, 20 de Julho de 2017



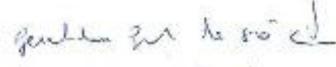
Ministério da Saúde

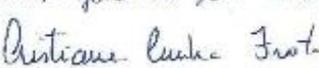
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Fernanda Capelo Barroso**, sob orientação da Dr^a. Flavia Barreto dos Santos e Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu. Ao vigésimo dia do mês de julho de dois mil e dezessete, realizou-se às oito horas, no Auditório do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Perfil histopatológico e molecular do envolvimento pulmonar nas formas fatais de dengue”** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina - Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias, na linha de pesquisa: Infecções e Doenças produzidas por Virus. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira – IGM/FIOCRUZ, Dr^a. Conceição Aparecida Domelas – UFC/CE, Dr^a. Cristiane Cunha Frota – UFC/CE, Dr. Marcelo Alcantara Holanda - UFC/CE e como suplentes: Dr. Pedro Felipe Carvalheiro de Bruin – UFC/CE e Dr^a. Vera Luiza Capelozzi – USP/SP. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Medicina está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 20 de Julho de 2017.

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Presidente da Banca): 

Dr^a. Conceição Aparecida Domelas (Membro da Banca): 

Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira (Membro da Banca): 

Dr^a. Cristiane Cunha Frota (Membro da Banca): 

Dr. Marcelo Alcantara Holanda (Membro da Banca): 

Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa): 

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte eterna de luz.

Ao meu Pai, por ter me ensinado o amor infinito ao ser humano e à Medicina.

À minha Mãe, pela dedicação incondicional às filhas.

Às minhas irmãs Odúlia, Dolores, Amélia, Anastácia e sobrinhos, que são os verdadeiros exemplos de união e amor.

À minha sobrinha Sarinha, pela colaboração na pesquisa.

Às minhas primas Andréa e Milena, pelo apoio em todos os momentos.

Às minhas amigas Eliane, Ana Sílvia, Regina, Inês, Nitinha e Teresa Neuma, pelo incentivo constante.

Aos maravilhosos amigos que conquistei no doutorado, em especial à Emília, pelo convívio intenso na busca do conhecimento.

Às minhas orientadoras Dra. Flávia Barreto e Dra. Margarida Pompeu, por terem aceitado caminhar comigo no presente trabalho.

Aos Coordenadores do DINTER do Instituto Oswaldo Cruz e da Universidade Federal do Ceará, Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa e Dra. Cristiane Cunha Frota, pela colaboração durante todo o trajeto.

Ao Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa, pela ajuda de grande relevância na observação dos resultados e estudo estatístico.

À Dra. Deborah Nunes Braga, pela dedicação na checagem das informações contidas nas fichas dos pacientes, lâminas e blocos, ponto de partida inicial para as outras etapas da pesquisa.

À grande Socorinha, experiente profissional do laboratório de histologia.

Às funcionárias Sandrinha e Esmeralda do Laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, não somente pelo belíssimo trabalho nas confecções das imuno-histoquímicas, mas também pela amizade e carinho.

À Aline do Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela precisão na confecção das microsecções de tecido (*tissue microarray*).

À Dra. Fernanda Montenegro, pela liberação das amostras do LACEN-CE.

À Priscila Conrado do Laboratório de Imunologia Viral da FIOCRUZ, pela colaboração nas pesquisas do vírus da dengue no tecido pulmonar.

Aos colaboradores do Instituto Evandro Chagas, em especial ao Valter Campos, pelo apoio técnico na confecção da imuno-histoquímica para o vírus da dengue no tecido pulmonar.

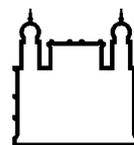
Aos participantes da pesquisa, que se foram devido à doença negligenciada, ressaltando as palavras de Karl Rokitanski: "*Mortui vivos docente*", ou seja, os mortos ensinam os vivos.

E por último, um agradecimento imenso à Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, amiga de longa data, que abriu as portas do seu laboratório para realização dos estudos imuno-histoquímicos. Sem esse auxílio esta pesquisa não teria sido realizada com o volume de informações testadas. A Dra. Vera é para mim mais que uma professora, é fonte constante de inspiração de trabalho.

Meu muito obrigado!

Quero deixar marcado um sulco da fundura do meu enxadeco.
Quero ter ensiado lições, onde a conversa tenha sido capaz de convencer.

Luiz Capelo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

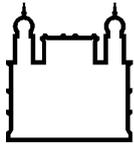
PERFIL HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR DO ENVOLVIMENTO PULMONAR NAS FORMAS FATAIS DE DENGUE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Fernanda Capelo Barroso

A Dengue é uma doença infecciosa viral emergente no mundo. Os quadros clínicos variam de assintomáticas a formas graves de dengue, atingindo todas as faixas etárias nas Américas. O objetivo desse estudo é descrever as alterações patológicas presentes nos pulmões nos óbitos por dengue no Estado do Ceará entre 2011 e 2013. O estudo foi do tipo série de casos incluindo 126 óbitos com diagnóstico confirmado de dengue e comparado com um grupo controle. A classificação clínica vigente na época para óbitos era de febre hemorrágica (FHD) da dengue ou dengue com complicações (DCC). As técnicas histopatológicas utilizadas foram hematoxilina-eosina, imunohistoquímica com anticorpos para CD4+, CD8+, CD68, Mastócito, VEGF e detecção da apoptose por TUNEL. A identificação dos sorotipos DENV no tecido pulmonar foi por *nested* RT-PCR. A pesquisa de antígenos virais no pulmão foi através imunohistoquímica com anticorpos anti-DENV, assim como anticorpos anti-NS1 e anti-NS3. A quantificação dos biomarcadores foi aferida por histomorfometria. A faixa etária prevalente foi de 30 a 59 anos. A febre e o desconforto respiratório foram os principais sinais observados. O peso dos pulmões em gramas apresentou valores superiores na FHD. Os padrões histopatológicos pulmonares descritos foram hemorragia, edema alveolar, pneumonite intersticial crônica, broncopneumonia, lesão pulmonar aguda, dano alveolar difuso exsudativo, dano alveolar difuso fibroproliferativo, pneumonia em organização fibrinosa aguda e doença pulmonar crônica prévia. A fração de área do edema e hemorragia foram significativamente maiores na FHD e DCC, quando comparada ao controle. As células T CD4+ exibiram a fração de área significativamente superior na forma clínica de DCC em relação a FHD e ao controle. A média da densidade da relação células T CD4+/ CD8+ encontra-se invertida nos grupos FHD e DCC em comparação ao grupo controle. A fração de área dos macrófagos apresenta uma diferença significativa entre a DCC e FHD em relação ao grupo controle. A imuno-marcação do VEGF demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre as duas formas de apresentação da dengue com $p=0,001$. A apoptose de células mononucleadas septais apresentou relação estatisticamente significativa na presença da proteína NS3 no parênquima pulmonar. Na comparação dos sorotipos DENV por padrão histopatológico a Pneumonite tem cerca de 9 vezes mais chances de ocorrer em indivíduos sorotipo DENV1 do que a Hemorragia/Edema, que ocorre bem mais nos sorotipos DENV4. O envolvimento pulmonar nas formas graves de dengue é importante para o desfecho letal, apresentando vários padrões histopatológicos compilados nessa casuística. A presença da replicação viral no pulmão resulta em maior lesão pulmonar.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HISTOPATHOLOGICAL AND MOLECULAR PROFILE OF PULMONARY INVOLVEMENT IN THE FATAL FORMS OF DENGUE

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Fernanda Capelo Barroso

Dengue is an emerging viral infectious disease in the world. Clinical conditions range from asymptomatic to severe forms of dengue, reaching all age groups in the Americas. The objective of this study is to describe the pathological changes present in the lungs in dengue deaths in the State of Ceará between 2011 and 2013. The study was a series of cases including 126 deaths with a confirmed diagnosis of dengue and compared to a control group. The current clinical classification for deaths was of hemorrhagic fever of dengue (DHF) or dengue with complications (CHD). The histopathological techniques used were hematoxylin-eosin, immunohistochemistry with antibodies to CD4 +, CD8 +, CD68, Mastocyte, VEGF and detection of apoptosis by TUNEL. The identification of DENV serotypes in lung tissue was by nested RT-PCR. Research on viral antigens in the lung was by immunohistochemistry with anti-DENV antibodies, as well as anti-NS1 and anti-NS3 antibodies. Quantification of the biomarkers was measured by histomorphometry. The prevalent age range was 30 to 59 years. Fever and respiratory discomfort were the main signs observed. The weight of the lungs in grams presented higher values in the DHF. The pulmonary histopathological patterns described were alveolar hemorrhage, alveolar edema, chronic interstitial pneumonitis, bronchopneumonia, acute lung injury, diffuse exudative alveolar damage, diffuse fibroproliferative alveolar damage, pneumonia in acute fibrinous organization and previous chronic lung disease. The fraction of the area of the edema and hemorrhage were significantly higher in the DHF and DCC, when compared to the control. CD4 + T cells exhibited significantly greater fraction of area in the clinical form of DCC compared to DHF and control. The mean density of the CD4 + / CD8 + T cell ratio is inverted in the DHF and DCC groups compared to the control group. The macrophage area fraction presents a significant difference between DCC and DHF in relation to the control group. Immunoblotting of VEGF demonstrated a statistically significant difference between the two forms of dengue presentation with $p = 0.001$. Apoptosis of septal mononuclear cells presented a statistically significant relationship in the presence of NS3 protein in the lung parenchyma. In the comparison of DENV serotypes by histopathological pattern, Pneumonitis is about 9 times more likely to occur in DENV1 serotype individuals than Hemorrhage / Edema, which occurs much more in DENV4 serotypes. Pulmonary involvement in severe forms of dengue is important for the lethal outcome, presenting several histopathological patterns compiled in this series. The presence of viral replication in the lung results in increased lung injury.

ÍNDICE

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Definição	1
1.2 Agente etiológico	1
1.2.1 O vírus da dengue	1
1.2.2 Replicação viral e resposta imune nas infecções por dengue.....	2
1.3 Epidemiologia.....	4
1.3.1 Epidemiologia no Brasil.....	5
1.3.2 Dengue no Ceará.....	7
1.4 Manifestações clínicas e classificação dos casos de dengue.....	8
1.5 Patogênese das infecções por DENV	10
1.6 Patologia.....	16
1.6.1 Defesa celular pulmonar.....	16
1.6.2 Achados histopatológicos pulmonares infecção por DENV	18
1.6.3 Padrões histopatológicos pulmonares na Dengue.....	19
1.7 Diagnóstico laboratorial das infecções por Dengue	23
1.7.1 Isolamento viral	24
1.7.2 Métodos sorológicos	24
1.7.3 Métodos moleculares para a detecção do genoma dos DENV	25
1.7.4 Imuno-histoquímica	25
1.7.5 Outros métodos de diagnóstico investigativo	26
2 JUSTIFICATIVA.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Aspectos éticos.....	30
4.2 Desenho do estudo	30
4.3 Coleta de amostras e dados.....	31
4.3.1 Coleta dos dados demográficos, dados clínicos e laudo de autópsia.....	31

4.3.2	<i>Coleta de amostras de tecido, sangue e líquido</i>	32
4.3.3	<i>Microarranjos do tecido pulmonar (tissue microarray)</i>	33
4.4	Confirmação do diagnóstico de dengue.....	35
4.4.1	<i>Confirmação do diagnóstico de dengue pelo LACEN-CE</i>	35
4.4.2	<i>Confirmação do diagnóstico de dengue através de imuno- histoquímica pelo Instituto Evandro Chagas (IEC-PA)</i>	36
4.5	Análise macroscópica dos pulmões.....	37
4.6	Análise histopatológica	37
4.6.1	<i>Análise histopatológica corada pela técnica de rotina da Hematoxilina & Eosina (HE)</i>	37
4.6.2	<i>Análise hispopatológica corada pela técnica de rotina da Hematoxilina & Eosina associada à imuno-histoquímica</i>	38
4.6.3	<i>Classificação. dos padrões histopatológicos pulmonares na infecção pelo DENV</i>	38
4.7	Imuno-histoquímica para identificação e quantificação dos marcadores CD4, CD8, CD68, Mastócito, VEGF, Citoqueratina (AE1/AE3), α -Actina músculo liso e Fator VIII.....	39
4.8	Detecção da apoptose através da detecção <i>in situ</i> por marcação de extremidades de dUTP mediada por um TdT (TUNEL).....	40
4.9	Identificação dos sorotipos DENV em tecido congelado por transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (<i>semi-nested</i> RT- PCR)	41
4.10	Identificação do DENV em parênquima pulmonar através de imuno- histoquímica	43
4.10.1	<i>Identificação de proteína não estrutural 1 (NS1) e Proteína não estrutural 3 (NS3) no parênquima pulmonar através de imuno- histoquímica</i>	43
4.11	Histomorfometria com retículo para quantificação das alterações morfológicas e da expressão da molécula	44
4.12	Estratégia de análise de dados e variáveis do estudo	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1	Análise descritiva dos dados demográficos, dados clínicos, co- morbidades, fatores de risco, critérios classificatórios presentes nas autópsias e exame laboratorial.....	48

5.2	Análise macroscópica do pulmão.....	54
5.3	Análise microscópica pulmonar	57
5.4	Avaliação histomorfométrica do pulmão para a quantificação do edema e da hemorragia em formas clínicas de dengue e grupo controle.....	63
5.5	Classificação dos padrões histopatológicos pulmonares encontrados na infecção pelo DENV	65
5.5	Quantificação e comparação da imuno-expressão células inflamatórias no parênquima pulmonar incluindo linfócitos T CD4+ e CD8+, macrófagos e mastócitos) e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle	82
5.6	Quantificação de apoptose no pulmão pelo método TUNEL e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle	85
5.7	Quantificação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no tecido pulmonar e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle.....	87
	5.7.1 Identificação da imuno-expressão do DENV no parênquima pulmonar e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle	88
5.8	Identificação da proteína não estrutural 1 (NS1) no parênquima pulmonar, e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle	89
	5.8.1 Detecção da proteína não estrutural 3 (NS3) no parênquima pulmonar e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle.....	90
5.8	Análise da distribuição dos sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) e comparação das alterações histopatológicas presentes no parênquima pulmonar	96
6	CONCLUSÕES.....	99
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
8	ANEXOS.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da partícula (A), genoma (B) e partículas de dos vírus dengue (C) (seta) no interior de células de mosquito <i>A. albopictus</i> (C6/36) infectada. Proteína precursora da proteína de membrana (prM); proteína de membrana (M); proteína do envelope (E); proteína do capsídeo (C); proteínas não estruturais 1-5 (NS1-5); regiões não traduzidas (UTR).....	2
Figura 2 – Esquema representativo das etapas do processo replicativo dos vírus dengue	3
Figura 3 – Representação esquemática da cinética de antígeno e anticorpo nas infecções por dengue.....	4
Figura 4 – Distribuição global da dengue, 2014.....	5
Figura 5 – Casos suspeitos (A) e óbitos (B) por dengue ocorridos no Brasil, Nordeste e Ceará, 2011-2013.....	6
Figura 6 – Casos de dengue em períodos epidêmicos e inter-epidêmicos no Ceará, 1986-2015.....	7
Figura 7 – Percentual de isolamento viral dos sorotipos de DENV no Estado do Ceará, 2001-2014.....	8
Figura 8 – Classificação dos casos de dengue sugerida pela OMS em 2009.....	10
Figura 9 – Mecanismos envolvidos na patogênese das infecções pelos DENV	13
Figura 10 – Esquema de via do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGFR2 é o sinal principal que transduz o receptor VEGF para angiogênese e mitogênese das células endoteliais. Nas células endoteliais, o sistema de sinal VEGF pode ajustar a permeabilidade vascular através de eNOS.	16
Figura 11 – Fluxograma diagnóstico realizado no SVO-CE em casos suspeitos de dengue no período de 2011 a 2013.....	32
Figura 122 – Protocolo contendo o planejamento do bloco 1 das microsecções (<i>spots</i>) das autópsias 73/11 a 1067/11, distribuídas em 13 colunas e 12 linhas para TMA	34
Figura 13 – Cinco lâminas de TMA confeccionadas no Laboratório Multiusuário do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), contendo o total de 135 casos em estudo.....	35
Figura 14 – Quadro com anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica para avaliação de alterações e danos ocorridos nos tecidos pulmonares.....	39
Figura 15 – Quadro com oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue	42
Figura 17 – Número médio por μL de plaquetas identificadas nos casos de dengue classe DCC e FHD.....	53
Figura 18 – Pulmão hemorrágico com edema de septos interlobulares visualizado através da pleura visceral translúcida (setas).....	56
Figura 19 – Pulmão exibindo intenso extravasamento vascular loculado entre a pleura visceral e parênquima (setas).....	56
Figura 20 – Superfície de corte pulmonar evidenciando parênquima pulmonar edematoso e hemorrágico	57
Figura 21 – Edema alveolar (HE, 200x).....	58
Figura 22 – Hemorragia alveolar (HE, 400x)	59
Figura 23 – Pneumonite intersticial crônica (HE, 200x).....	59

Figura 24 – Bronquiolite crônica (HE, 200x)	60
Figura 25 – Broncopneumonia (HE, 200x)	60
Figura 26 – A. Megacariócitos no leito vascular (HE, 400x). B. Imuno- expressão do Anticorpo anti-fator VIII em Megacariócitos (HE, 630x)	61
Figura 27 – Efeito citopático (HE, 400x)	61
Figura 28 – Hiperplasia Pneumócito II (HE, 400x). Imuno-expressão do Anticorpo citoqueratina (AE1/AE3, 400x).....	62
Figura 29 – Miofibroblasto (α actina de músculo liso, 400x).....	62
Figura 30 – Membrana hialina com necrose de pneumócitos (HE, 400x)	63
Figura 31 – Associação da Fração de área da Edema alveolar com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles	64
Figura 32 – Associação da Fração de área da Hemorragia/edema alveolares com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles.....	65
Figura 33 – Padrão Hemorragia/ Edema (HE, 50x).....	67
Figura 34 – Padrão edema alveolar (HE, 50x)	68
Figura 35 – Padrão Pneumonite intersticial crônica (HE, 100x)	68
Figura 36 – Padrão Broncopneumonia (HE, 100x).....	69
Figura 37 – Padrão dano alveolar difuso exsudativo com membrana hialina (A - HE, 50x); Padrão Dano Alveolar Fibroproliferativo (B - HE, 200x)	70
Figura 38 – Linfócito T CD4+ em septo alveolar (400x)	71
Figura 39 – Associação da Fração de área da imuno-expressão de linfócitos T CD4+ com padrões histopatológicos	72
Figura 40 – Linfócito T CD8+ em septo alveolar (400x).	73
Figura 41 – Associação da Fração de área da imuno-expressão de linfócitos T CD8+ com padrões histopatológicos	74
Figura 42 – Macófago CD68 no lúmen alveolar (400x)	75
Figura 43 – Associação da fração de área da imuno-expressão de macrófagos CD68 com padrões histopatológicos	76
Figura 44 – Mastócitos no septo alveolar (400x)	76
Figura 45 – Associação da Fração de área da imuno-expressão de Mastócitos com Padrões histopatológicos.....	78
Figura 46 – Células mononucleadas apoptóticas no septo alveolar (400x).....	79
Figura 47 – Associação da Fração de área da imuno-expressão da apoptose (TUNEL) com Padrões histopatológicos.....	79
Figura 48 – Célula endotelial com imuno-expressão de VEGF (400x).....	80
Figura 49 – Associação da fração de área da imuno-expressão da VEGF com Padrões histopatológicos.....	81
Figura 50 – Associação da Fração de área da imuno-expressão dos Linfócitos CD4 com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles.....	82
Figura 51 – Associação da Fração de área da imuno-expressão dos Linfócitos CD8 com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles.....	83
Figura 52 – Associação da Fração de área da imuno-expressão dos Macrófagos CD68 com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles.....	84

Figura 53 – Associação da Fração de área da imuno-expressão dos Mastócitos com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles.....	85
Figura 54 – Associação da Fração de área da imuno-expressão das células apoptóticas com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles.....	86
Figura 55 – Associação da Fração de área da imuno-expressão fator de crescimento endotelial (VEGF) com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles	87
Figura 56 – Macrófago alveolar com imuno-expressão de antígenos virais citoplasmáticos (630x)	89
Figura 57 – Macrófago alveolar com imuno-expressão de Proteína Não Estrutural 1 (630x).....	90
Figura 58 – Macrófago alveolar com imuno-expressão de Proteína Não Estrutural 3 (630x).....	91
Figura 59 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área de edema alveolar	91
Figura 60 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área de hemorragia alveolar	92
Figura 61 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão do Linfócito T CD4.....	93
Figura 62 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão do Linfócito T CD8.....	93
Figura 63 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão do Macrófago CD68	94
Figura 64 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão dos mastócitos	94
Figura 65 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da apoptose	95
Figura 66 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	96
Figura 67 – Semi-nested PCR - Eletroforese de gel de agarose demonstrando bandas com peso molecular compatível com o sorotipo DENV4 (seta).....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência do método diagnóstico nos 126 casos de Dengue.....	48
Tabela 2 – Dados demográficos de idade e sexo associados aos grupos de formas clínicas de dengue e controle.....	49
Tabela 3 – Frequência dos casos segundo faixas etárias	49
Tabela 4 – Distribuição dos sinais de alerta da doença estratificados por ordem de frequência	50
Tabela 5 – Distribuição dos sintomas da doença estratificados por ordem de frequência	51
Tabela 6 – Distribuição das co-morbidades de acordo com a frequência.....	52
Tabela 7 – Distribuição da frequência dos fatores de risco	52
Tabela 8 – Frequência da causa imediata de óbito	52
Tabela 9 – Frequência do extravasamento vascular de acordo com sua localização anatômica	53
Tabela 10 – Estatísticas descritivas do número de plaquetas nos casos de dengue classe DCC e FHD.....	54
Tabela 11 – Frequência de alterações macroscópicas visualizadas durante a autópsia	55
Tabela 12 – Peso pulmonar em gramas (g) no grupo de paciente com Dengue	55
Tabela 13 – Frequência de alterações histológicas nos pulmões autopsiados.....	58
Tabela 14 – Quantificação morfométrica do Edema e da hemorragia alveolares nos grupos de Dengue e grupo controle	63
Tabela 15 – Classificação dos padrões histopatológicos pulmonares encontrados na infecção pelo DENV	67
Tabela 16 – Frequência dos padrões histopatológicos conforme as faixas etárias ..	71
Tabela 17 – Estatística descritiva da fração de área das Células T CD4+ nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle	72
Tabela 18 – Estatística descritiva da fração de área das Células T CD8+ nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle	74
Tabela 19 – Estatística descritiva da fração de área das Células T CD68 nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle.....	77
Tabela 20 – Estatística descritiva da fração de área de mastócitos nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle.....	78
Tabela 21 – Estatística descritiva da fração de área de Apoptose nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle.....	80
Tabela 22 – Estatística descritiva da fração de área de VEGF nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle.....	81
Tabela 23 – Densidade celular de CD4+, CD8+ e Relação CD4+/CD8+ nos grupos de DCC, FHD e controles.....	83
Tabela 24 – Identificação do DENV no parênquima pulmonar através da imunohistoquímica com anticorpos policlonais anti-DENV	88

Tabela 25 – Identificação da proteína não estrutural 1 (NS1) no pulmão	90
Tabela 26 – Frequência Identificação da proteína não estrutural 3 (NS3) no pulmão	91
Tabela 27 – Comparação dos sorotipos DENV por padrão histopatológico	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
AJ	Junções de adesão
CD4+	Célula T CD4+
CD68	Macrófago
CD8+	Célula T CD8+
DAD	Dano alveolar difuso
DC	Dengue clássico
DCC	Dengue com complicação
DENV	Dengue vírus
DENV-1	Dengue vírus sorotipo 1
DENV-2	Dengue vírus sorotipo 1
DENV-3	Dengue vírus sorotipo 1
DENV-4	Dengue vírus sorotipo 4
Dntp	Desoxinucleotídeo trifosfato
ECP	Efeito citopático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
eNOS	Enzima óxido nítrico sintetase
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica do dengue
IC	Intervalo de Confiança
IEC	Instituto Evandro Chagas
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IHQ	Imuno-histoquímica
LACEN-CE	Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
MS	Ministério da Saúde
NO	Óxido nítrico
NS	Proteína não estrutural
NS1	Proteína não estrutural 1
NS3	Proteína não estrutural 3
NT	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde

PB	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PO	Pneumonia em organização
POFA	Pneumonia em organização fibrinosa aguda
RNA	Ácido ribonucléico
RT – PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
SARA	Síndrome da angustia respiratória aguda
SCD	Síndrome do choque do dengue
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SESA-CE	Secretaria de Saúde do Ceará
SVO	Serviço de verificação de óbitos Dr. Rocha Furtado
SVS	Secretaria Vigilância Sanitária
TMA	Microarranjo de tecidos
TUNEL	Marcação de extremidades de dUTP mediada por um TdT
VE-caderina	E-caderina endotelial vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
µm	Micrômetro

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição

A dengue é uma doença sistêmica causada por um arbovírus, comum em muitas regiões tropicais e subtropicais do planeta. O agente etiológico é um vírus transmitido aos seres humanos pela picada do mosquito do gênero *Aedes*, mais especificamente *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) e *Aedes albopictus* (*A. albopictus*) (San Martín et al., 2010). Além da dengue, mosquitos do gênero *Aedes* são notórios por transmitirem outros arbovírus, como os vírus Chikungunya, Febre amarela e Zika (Zara et al., 2016).

A infecção por um sorotipo garante imunidade homotípica duradoura e imunidade heterotípica de curta duração (Guzman et al., 2010).

1.2 Agente etiológico

1.2.1 O vírus da dengue

Os vírus da dengue (DENV) pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Esses vírus são esféricos, envelopados e medem cerca de 40 a 50 nanômetros de diâmetro, e exibem RNA de fita simples, polaridade positiva e propriedades antigênicas distintas, caracterizando quatro sorotipos específicos denominados vírus dengue 1 (DENV-1), vírus dengue 2 (DENV-2), vírus dengue 3 (DENV-3) e vírus dengue 4 (DENV-4) (Lindenbach e Rice, 2013). O RNA viral possui cerca de 11.000 nucleotídeos e apenas uma região aberta de leitura que codifica uma poliproteína, que é posteriormente clivada em proteínas estruturais (C, prM, M e E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Guzman et al., 2010), Figura 1.

A glicoproteína E (51-60 kDa) é a principal e maior proteína estrutural do vírus, sendo responsável por atividades biológicas do ciclo viral, tais como a montagem da partícula, a interação com receptores celulares e a fusão com a membrana celular do hospedeiro. É o principal alvo para anticorpos neutralizantes e possui atividade hemaglutinante (Chambers et al., 1990).

A expressão das proteínas NS é fundamental para replicação e patogênese do DENV (Wan et al., 2013), sendo estas capazes de induzir modificações no retículo endoplasmático do hospedeiro, onde a replicação viral ocorre (Tarantino et al., 2016).

A glicoproteína NS1 (~ 46 kDa) pode ser encontrada em duas formas tanto intra e extra celular como também na forma solúvel. Constitui uma subunidade do complexo de replicação do RNA viral (Lindenbach e Rice, 2012).

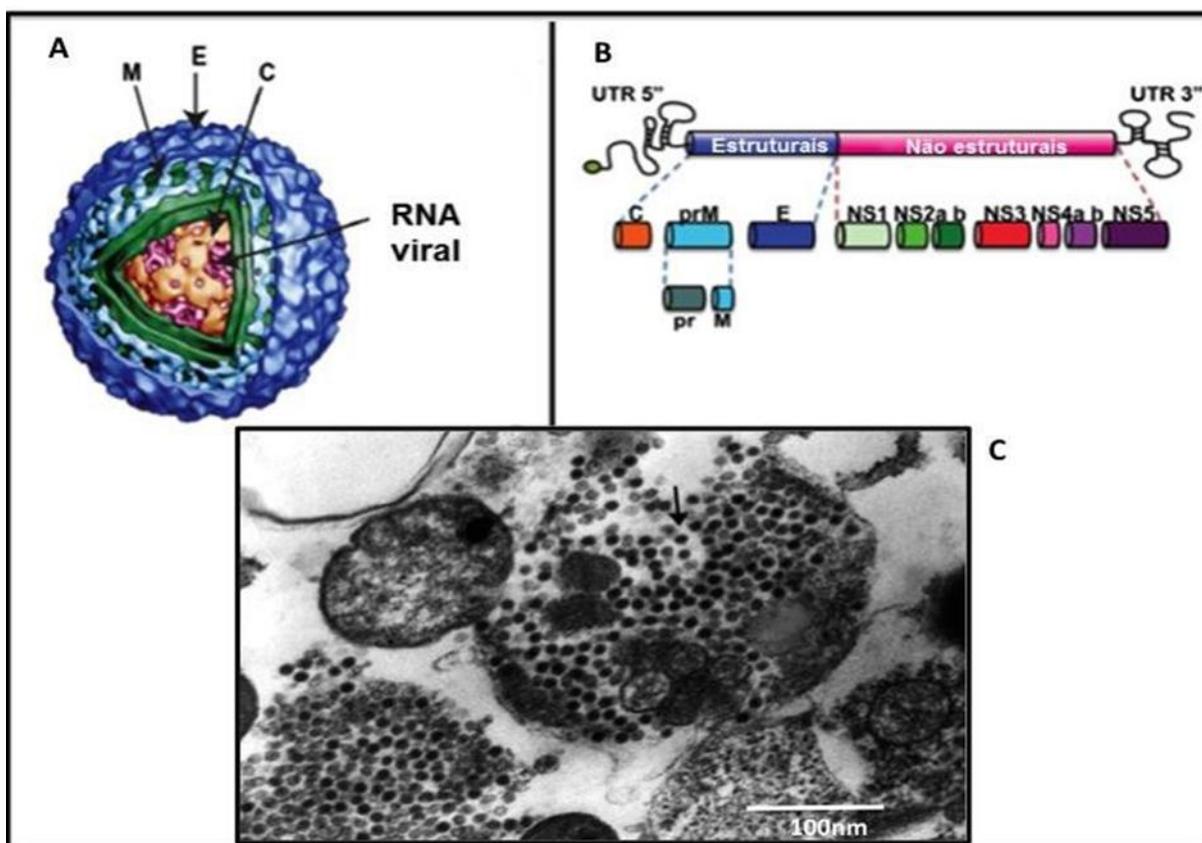


Figura 1 – Esquema representativo da partícula (A), genoma (B) e partículas de dos vírus dengue (C) (seta) no interior de células de mosquito *A. albopictus* (C6/36) infectada. Proteína precursora da proteína de membrana (prM); proteína de membrana (M); proteína do envelope (E); proteína do capsídeo (C); proteínas não estruturais 1-5 (NS1-5); regiões não traduzidas (UTR)

Fonte: Adaptado de Rosa Maria Del Angel, 2013 e Barreto-Vieira e Barth, 2015.

1.2.2 Replicação viral e resposta imune nas infecções por dengue

Estudos conduzidos em tecidos de seres humanos e camundongos submetidos a necrópsia, identificaram os monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas e maduras como algumas células alvos das infecções pelos DENV (Balsitis et al., 2009; Laughlin et al., 2012).

Os vírus entram na célula por ligação específica da proteína E com diversos receptores celulares, incluindo DC-SIGN e receptores de manose seguido do

processo de endocitose. O pH ácido do endossoma induz a fusão do envelope do vírion com a membrana celular. Após o desnudamento, o RNA viral é liberado no citoplasma e as proteínas virais são traduzidas como poliproteína única que é clivada por proteases virais e do hospedeiro. A replicação do genoma viral inicia com síntese da fita negativa de RNA, que serve como molde para a síntese de fitas positivas de RNA da progênie. A montagem das partículas virais ocorre associada ao retículo endoplasmático das células hospedeiras, os vírus brotam dentro do lúmen do retículo endoplasmático, adquirindo uma membrana lipídica (envelope) e são depois liberadas através do sistema de Golgi (Laughlin et al., 2012), (Figura 2):

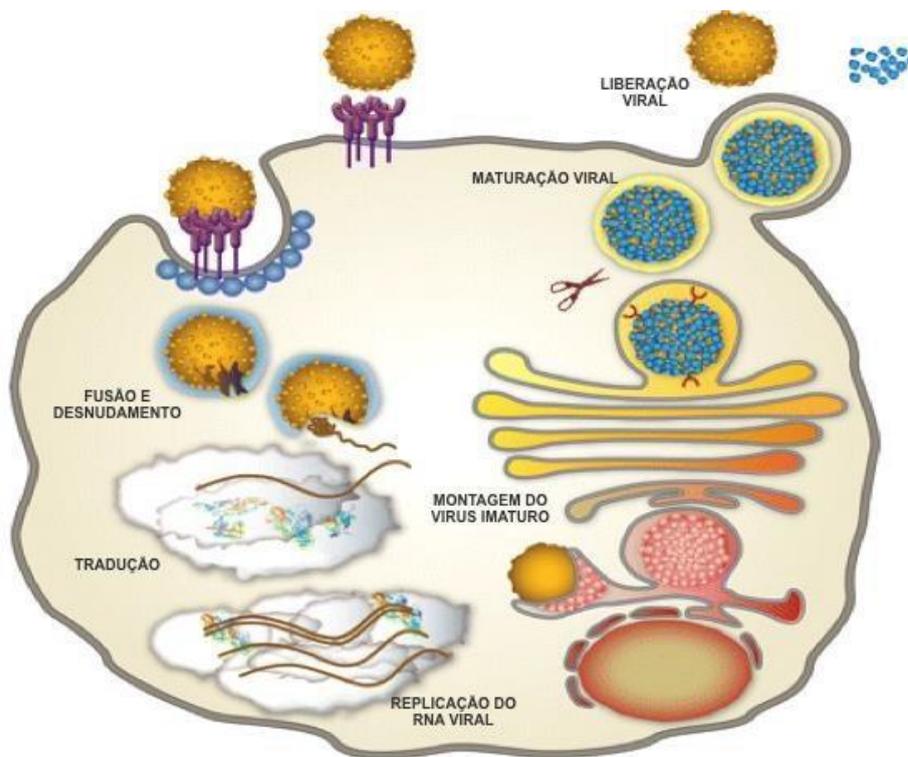


Figura 2 – Esquema representativo das etapas do processo replicativo dos vírus dengue

Fonte: Adaptado de Laughlin et al., 2012.

O período de viremia ocorre antes do aparecimento dos primeiros sintomas, e o vírus permanece detectável durante a fase febril aguda, geralmente por três a cinco dias (Vorndam; Kuno, 1997).

A resposta imune adquirida na infecção pelos DENV consiste na produção de anticorpos principalmente dirigidos contra a proteína E. Na infecção primária há uma resposta lenta e com baixo título de anticorpos IgM, que na maioria dos pacientes os níveis são detectáveis no sexto dia após o aparecimento dos sintomas.

O pico de imunoglobulinas específicas para o vírus ocorre por volta de duas semanas, e os anticorpos são detectáveis por 2 a 3 meses (Guzman, 2010).

Os anticorpos IgG começam a aparecer a partir do quinto dia de doença, na infecção primária e continuam detectáveis por toda a vida. Na infecção secundária, um alto título de IgG pode ser detectado na fase aguda (Guzman, 2010). Por outro lado, os níveis de IgM, na resposta secundária, tendem a ser mais baixos do que na resposta primária (Figura 3).

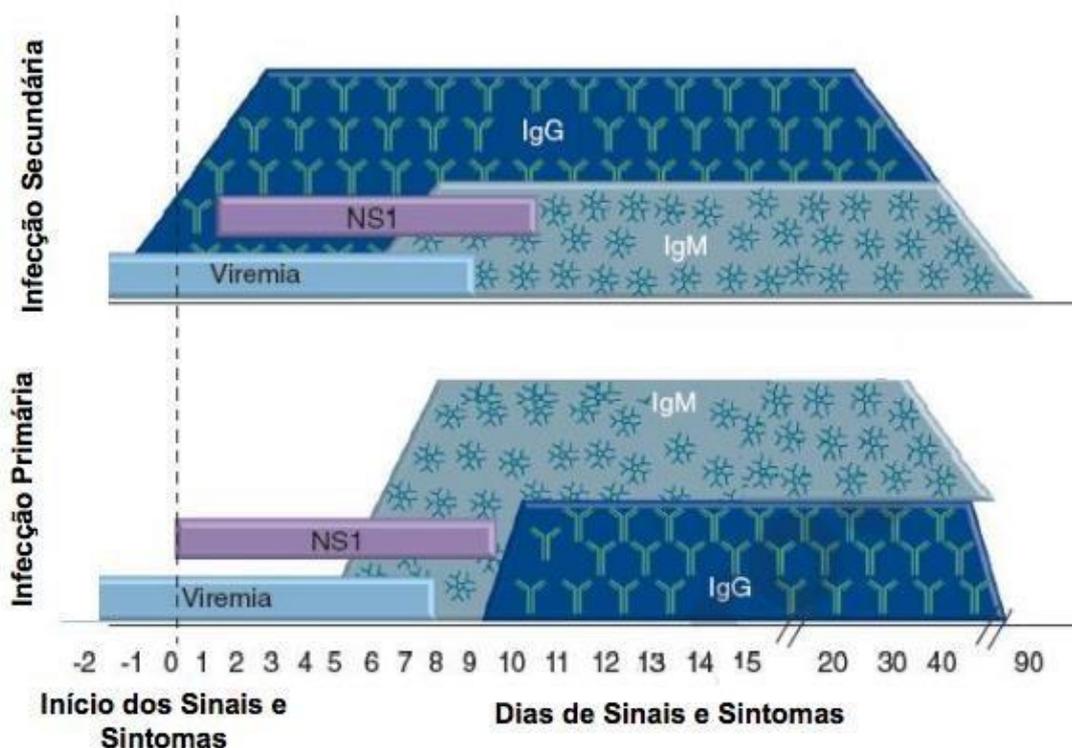


Figura 3 – Representação esquemática da cinética de antígeno e anticorpo nas infecções por dengue
 Fonte: Adaptado de Lima et al., 2014.

1.3 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontram-se em risco de contrair a dengue, ao redor do mundo, e estima-se que entre 50 a 100 milhões de infecções de dengue e 22 000 óbitos ocorram anualmente em 100 países endêmicos nas Américas, Sudeste Asiático, Oeste do Pacífico, África e as regiões do Mediterrâneo oriental (WHO, 2009; Guzman; Harris, 2015), (Figura 4).

Um modelo de distribuição da doença recente estima que 4 bilhões de pessoas estejam em risco de infecção, e existam 390 milhões de infecções pelo DENV (Bhatt et al., 2013; Messina et al., 2015). Nesse contexto, a dengue é uma

das arboviroses mais importantes no mundo em termos de morbidade e mortalidade. Atualmente, o Brasil é responsável por 85% dos casos dengue no continente sul americano, sendo também o país com o maior índice de incidência da doença (Paho, 2016).

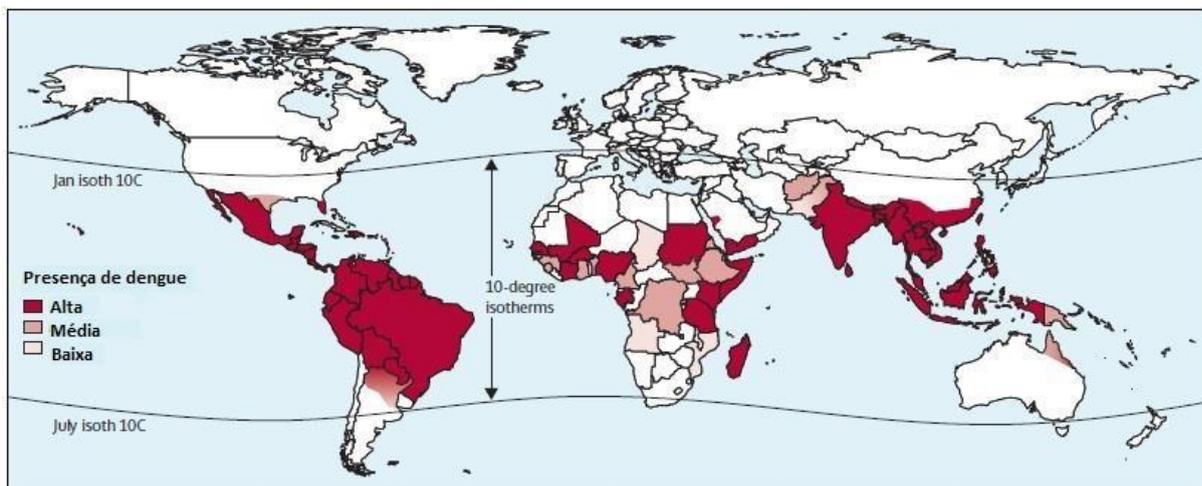


Figura 4 – Distribuição global da dengue, 2014
Fonte: Adaptado de Guzmán e Harris, 2015.

1.3.1 Epidemiologia no Brasil

Durante o século XIX, surtos compatíveis com dengue ocorreram nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil (Figueiredo, 2000). Após uma intensa campanha iniciada em 1940, a erradicação do *A. aegypti* alcançada em 1955 resultou na ausência de registros de casos de dengue no Brasil até a década de 80. Eventualmente, com o abandono dos programas de erradicação, o vetor voltou a expandir, retornando à América do Sul ao longo do tempo (Schatzmayr, 1986; Castro, 1999).

Em 1981, DENV-1 e DENV-4 foram isolados durante um surto de dengue que ocorreu em Boa Vista em Roraima (Osanai et al., 1983). Em abril de 1986, o DENV-1 foi isolado em Nova Iguaçu, RJ e o vírus dispersou para demais municípios do estado, assim para os estados de Alagoas, Ceará e no ano seguinte para os estados de Pernambuco, São Paulo, Bahia e Minas Gerais (Schatzmayr et al., 1986; Figueiredo, 1996).

A detecção do DENV-2 em 1990, na cidade de Niterói, no estado do RJ resultou em uma grande epidemia e quando foram notificados os primeiros casos de dengue hemorrágica e óbitos no estado do RJ (Nogueira et al., 1990; Teixeira et al., 1999).

Em dezembro de 2000, o DENV-3 também foi detectado no RJ, sendo o responsável pela maior e mais grave epidemia de dengue no país até o ano de 2002 (Nogueira et al., 2000). Este sorotipo predominou na maior parte dos estados do Brasil entre 2002 e 2006 (SVS, 2010). Em 2007, uma taxa de letalidade duas vezes maior do que a de 2002 foi relatada e associada à re-emergência do DENV-2 (SVS, 2007).

Em 2008, 806.036 casos foram notificados e esta foi considerada a mais grave epidemia até então, onde foram confirmados 478 óbitos (SVS, 2009). Em 2009, uma nova mudança no sorotipo predominante foi observada com a re-emergência do DENV-1 e naquele ano, 529.237 casos e 298 óbitos foram notificados no país (SVS, 2009).

O DENV-4, apesar de ter sido detectado pela primeira vez no território brasileiro em 1982, no norte do país, foi reintroduzido apenas em 2010, novamente no estado de Roraima (Temporão et al., 2010). Nos anos de 2011 e 2012, o DENV-4 foi responsável por epidemias na maioria dos estados e marcou a circulação simultânea dos 4 sorotipos no território brasileiro.

Nos anos de 2011, 2012 e 2013, um total de 764.032, 589.591 e 1.452.489 casos de dengue foram notificados no país, respectivamente. Destes, 195.365, 222.913 e 152.357 foram provenientes do Nordeste. No mesmo período, o país registrou 482, 327 e 674 casos de óbitos. O Nordeste notificou 162, 151 e 181 óbitos em 2011, 2012 e 2013, respectivamente (SVS/MS, 2017), (Figura 5).

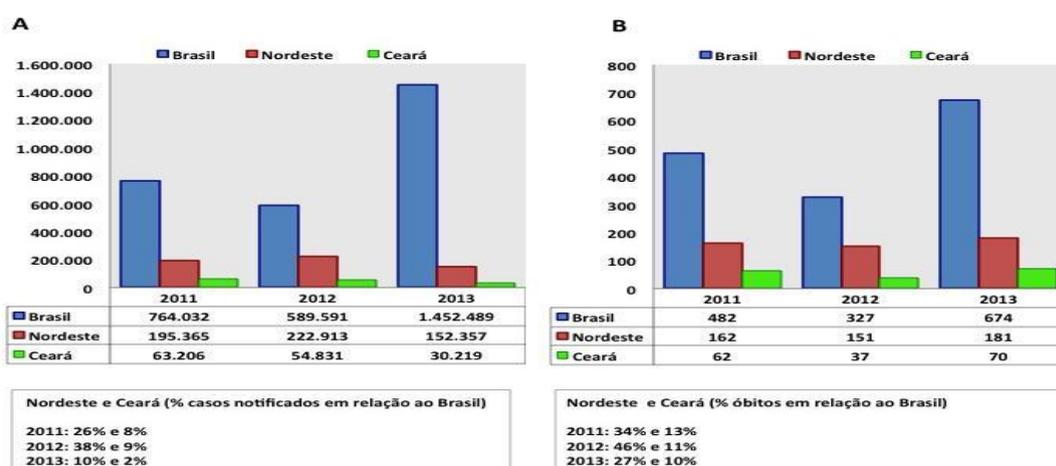


Figura 5 – Casos suspeitos (A) e óbitos (B) por dengue ocorridos no Brasil, Nordeste e Ceará, 2011-2013

Fonte: Secretaria Vigilância Sanitária/MS, 2017.

Até a semana epidemiológica 12 de 2017, um total de 90.281 casos de dengue foram notificados no país. Destes, 22.142 foram provenientes da região Nordeste e 10.778 do estado do Ceará (SVS/MS, 2017).

1.3.2 Dengue no Ceará

No estado do Ceará, Nordeste do Brasil, casos de dengue começaram a ser notificados à partir do isolamento do DENV-1 em 1986. Nos últimos 30 anos, a doença se manifestou de forma endêmica com o registro de epidemias nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011, 2012 e 2015 (Boletim Epidemiológico SESA, 2016), (Figura 6).

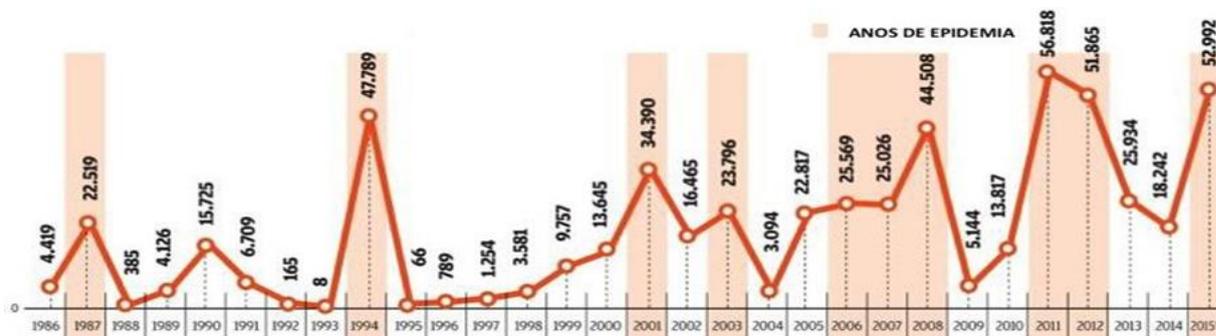


Figura 6 – Casos de dengue em períodos epidêmicos e inter-epidêmicos no Ceará, 1986-2015

Fonte: Adaptado de Boletim Epidemiológico SESA, 2016.

A partir de 1994, surgiram os primeiros casos de formas graves hemorrágicas associadas com a circulação do DENV-2. O DENV-3 foi isolado no ano de 2002 e, em 2011 foi isolado o DENV-4 em dois municípios do estado, Fortaleza e Morada Nova. Apesar da introdução deste novo sorotipo no estado, o DENV-1 foi o sorotipo prevalente em 98,7% dos casos isolados naquele ano e, apesar de uma baixa circulação, o DENV-3 ainda foi detectado em 0,4% dos casos. Os anos de 2012 e 2013, no entanto, foram caracterizados pela prevalente circulação do DENV-4 (98,6% e 96,8%, respectivamente), apesar da circulação do DENV-1, (Figura 6).

A associação de circulação dos quatro sorotipos do DENV e um grande número de municípios infestados pelo *A. aegypti*, elevaram o número de casos graves da doença no estado, tornando-se um problema da saúde pública no estado.

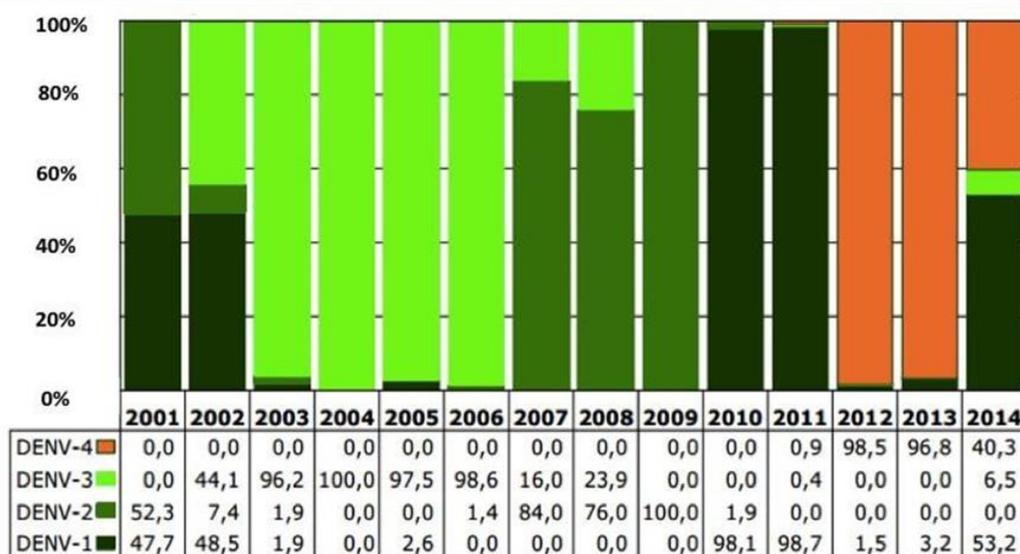


Figura 7 – Percentual de isolamento viral dos sorotipos de DENV no Estado do Ceará, 2001-2014
 Fonte: Adaptado do Boletim Epidemiológico SESA, 2016.

1.4 Manifestações clínicas e classificação dos casos de dengue

Os quatro sorotipos podem induzir um amplo espectro de sinais e sintomas que vão desde uma doença febril leve até as formas graves. O período de incubação do vírus no homem pode variar de 3 a 14 dias, mas usualmente é de 5 a 7 dias (WHO, 2015).

Na forma clássica da dengue, os sintomas se instalam de modo abrupto, quando surgem febre alta que dura de 2 a 7 dias, calafrios, cefaléia intensa, dor retro-orbital e astenia, além de intensas dores musculoesquelética e abdominal.

Exantema generalizado, de caráter transitório costuma aparecer no primeiro ou segundo dia de evolução. Quando o paciente se infecta não é possível saber se ele desenvolverá formas mais leves, ou evoluirá para formas graves, como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD). Os sintomas da FHD/SCD incluem febre, trombocitopenia, aumento da permeabilidade vascular, diátese hemorrágica e choque hipovolêmico.

A grande maioria dos pacientes apresenta a forma leve da doença que tem uma evolução benigna. Em uma proporção menor dos casos, entre 1 a 2%, a doença apresenta evolução muito mais grave (WHO, 2009).

O Ministério da Saúde adotou as diretrizes da Organização de Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) para a classificação dos casos confirmados de DC, FHD e SCD. Entretanto, diante de dificuldades encontradas em classificar alguns casos graves e fatais, como FHD e SCD, foi empregado no Brasil, a partir de 2000, uma classificação intermediária denominada de dengue com complicação (DCC). Essa nova classificação foi aplicada para óbitos cuja apresentação clínica e laboratorial, não incluíam todos os critérios diagnósticos para FHD. Dentre as complicações associadas estão as alterações neurológicas, disfunções cardiorrespiratórias, insuficiência hepática, derrames cavitários, hemorragia digestiva, plaquetopenia $<50.000 \text{ mm}^3$, leucopenia $<1000/\text{mm}^3$ (Siqueira, 2010).

A partir de 2009 a OMS sugeriu uma nova forma, que utiliza critérios para definir casos de dengue e níveis de gravidade: Dengue (D), Dengue com sinais de alarme (DSA) e Dengue grave (DG). Desde Janeiro de 2014 o Brasil adotou a nova classificação de acordo com a OMS 2009 (WHO, 2009).



SCC: Síndrome do choque por dengue, AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase.

Figura 8 – Classificação dos casos de dengue sugerida pela OMS em 2009
 Fonte: Adaptado de WHO, 2009.

Desde o estabelecimento desta nova classificação, tem sido possível identificar a gravidade dos casos em tempo real para tomada de decisões, medir e comparar a mortalidade e morbidade em países e globalmente e, implantar planos de contingência precocemente, não apenas baseando-se no número de casos relatados mas também pela gravidade dos casos (Horstick et al. 2015).

A prevalência de comprometimento pulmonar nos casos fatais de dengue é muito alta (Guzman et al., 1997; Arismendi-Morillo et al., 2011). As apresentações clínicas pulmonares com envolvimento respiratório na dengue, foram revisadas por Wiwanitki, agrupando em cinco formas clínicas importantes, quais sejam, hemorragia pulmonar, edema pulmonar, derrame pleural, pneumonia e síndrome da angústia respiratória aguda (Wiwanitki et al., 2015).

1.5 Patogênese das infecções por DENV

Diversas teorias vem sendo formuladas, tentando explicar os mecanismos relacionados aos casos mais graves de dengue (Halstead et al., 2015) e, apesar dos esforços ao longo dos anos, os mecanismos associados à patogênese do DENV

ainda não são totalmente compreendidos, principalmente devido à inexistência de um modelo animal que reproduza adequadamente a infecção como ocorre em pacientes humanos (Thein et al., 1997; Simmons et al., 2012; Zubair et al., 2016).

A teoria da infecção sequencial ou ADE (“antibody dependent enhancement”) sugere uma associação entre infecções secundárias e o aparecimento de dengue grave. A presença de anticorpos não neutralizantes durante uma infecção secundária heterotípica permite que o DENV se ligue com facilidade a receptores Fc γ de monócitos e macrófagos) resultando em uma replicação viral mais elevada. A reação cruzada de linfócitos T de memória gerados por uma infecção posterior por DENV pode culminar na ativação exacerbada de vias pró-inflamatórias (Schmid et al., 2014; Yacoub et al., 2016) e no aumento da ativação de macrófagos (Oliveira et al., 2016).

Na teoria da virulência viral, certas variações genéticas e antigênicas de diferentes cepas virais estariam associadas à gravidade da doença (Rico-Hesse, 1990; Ubol et al., 2008; Mammen et al., 2014). Casos de dengue clássica (DC) estariam relacionados à infecção pelo genótipo Americano de DENV-2, enquanto que o genótipo de origem asiática estaria relacionado a casos de FHD/SCD (Leitmeyer et al., 1999) e as altas taxas de infecção das cepas asiáticas possuem um maior potencial de causar a FHD (Cologna et al., 2005).

Na teoria do “Pecado Original” sugere-se que as formas graves podem ser causada pela ativação de células T CD4+ e CD8+ durante a infecção por DENV e, citocinas como TNF- α , assim como a magnitude das respostas via células T, estariam correlacionadas com a gravidade da doença (Mentor; Kurane, 1997; Mongkolsapaya et al., 2003; Carvalho, 2008). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN-gama, podem agir diretamente sobre o endotélio vascular e resultar no extravasamento de plasma, característico das infecções graves por DENV (Pang et al., 2007).

Na teoria do mimetismo molecular é sugerido que a patogênese do dengue seja resultado de uma reação autoimune. O desenvolvimento de anticorpos de reatividade cruzada ao plasminogênio poderia estar relacionado com a hemorragia na dengue e o aumento da destruição de plaquetas ou a diminuição na sua produção poderia resultar em trombocitopenia (Rothman, 2004).

Fatores genéticos do hospedeiro parecem também estar relacionados a um quadro mais grave da doença. Indivíduos de etnia negra possuíam maior resistência a FHD, pois apesar da co-circulação dos quatro sorotipos de DENV na África, casos

de FHD são raramente descritos (Haslstead et al., 2001). O aumento na expressão de moléculas HLA de classe I e II em células infectadas, assim como o nível de resposta imunológica contra epítomos virais, podem também ser responsáveis pela imunopatologia da infecção (Polizel et al., 2004). No entanto, efeitos patogênico e protetor dos alelos HLA de classe I já foram descritos (Green; Rothman, 2006).

O RNA subgenômico dos Flavivirus (sfRNA) também parece ter implicações na replicação dos DENV nas células do hospedeiro, conseqüentemente contribuindo para a patogênese do dengue grave. O sfRNA parcialmente degradado pode acumular nas células infectadas e suprimir a resposta imune antiviral do hospedeiro (Chang et al., 2013; Manokaran et al., 2015), além de facilitar a replicação viral pela alteração da estabilidade do RNA mensageiro do hospedeiro, atuando na evasão imune do DENV (Moon et al., 2012; Schnettler et al., 2012; Pang et al., 2017).

Os níveis elevados de NS1 podem estar correlacionados com a gravidade da doença e associada à patogênese do dengue (Chuang et al., 2013; Srikiatkachorn; Kelley, 2014), uma vez que ligada à superfície da célula hospedeira pode causar dano tecidual (Beatty et al., 2015), além de induzir a produção de citocinas pela ativação de macrófagos e células mononucleares do sangue periférico, resultando no comprometimento da integridade das células endoteliais dos vasos sanguíneos (Modhiran et al., 2015). Além disso, a NS1 pode induzir autofagia em células endoteliais humanas *in vitro* e em modelo murino (Chen et al., 2016).

Os anticorpos anti-NS1 de DENV promovem a ativação da célula endotelial, levando ao aumento da expressão e secreção da IL-6 e IL-8, que são associados a casos de FHD (Avirutnan, 1998; Huang, 2000; Lin, 2005; Chaturvedi, 2007). O TNF- α , liberado por monócitos infectados, é conhecido por ser um dos mais potentes fatores de ativação da célula endotelial, podendo provocar extravasamento vascular, alterações do endotélio e super expressão de moléculas de adesão celular e, conseqüentemente, favorecer à gravidade da doença (Pober et al., 1990; Kurane et al., 1994; Chaturvedi et al., 1999; 2000). O diagrama dos mecanismos envolvidos na patogênese das infecções pelos DENV está apresentado na Figura 9.

A patogênese da disfunção endoteliais nas infecções pelos DENV não está totalmente elucidada. As células endotelial na infecção pelo DENV são induzidas a expressar e secretar moléculas que participam tanto da resposta humoral e celular e, os mecanismos implicados na lesão endotelial são vários, como o dano ocasionado diretamente pelo vírus, ativação do complemento, produção de citocinas, quimiocinas, efeito direto ou indireto do óxido nítrico e indução da

apoptose (Avirutnan, 1998; Huang, 2000; Bosch, 2002; Lin et al., 2005; Chaturvedi et al., 2009).

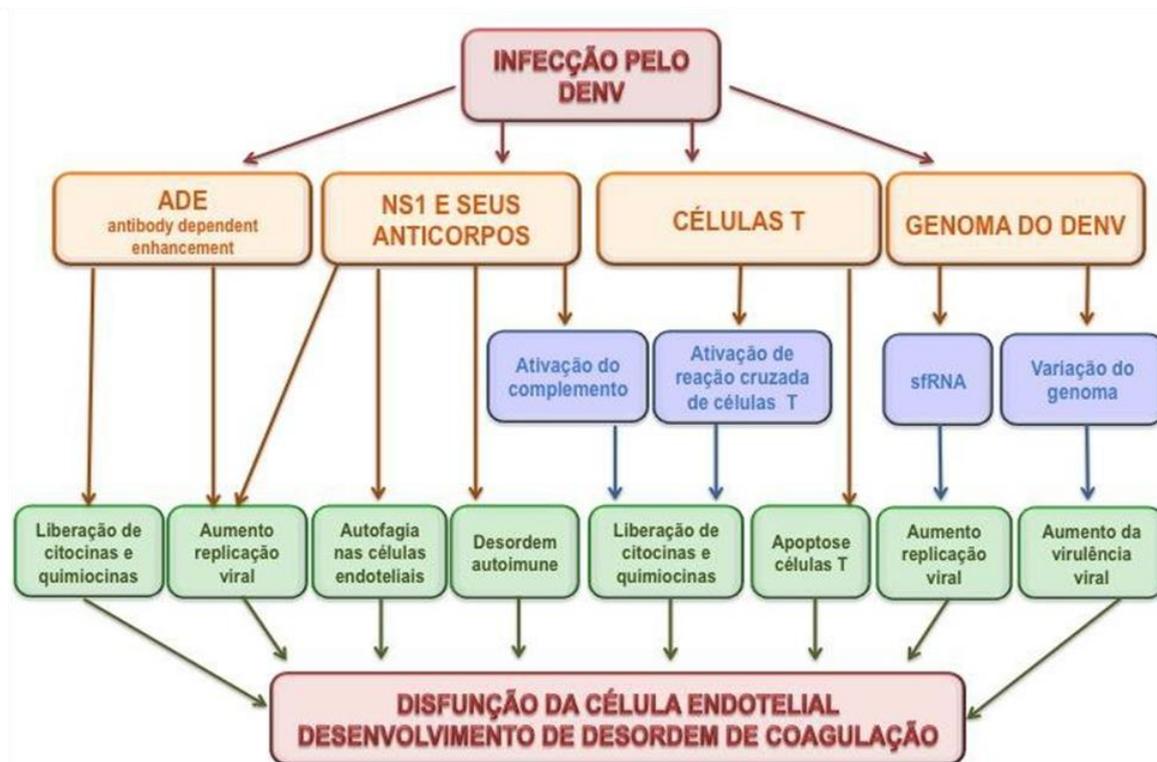


Figura 9 – Mecanismos envolvidos na patogênese das infecções pelos DENV
 Fonte: Adaptado de Pang et al., 2017.

Os mastócitos são residentes em tecidos expostos ao ambiente externo como as vias aéreas. Os mastócitos são heterogêneos e subpopulações específicas com variados perfis de mediadores e diferentes propriedades funcionais são observadas em tecidos distintos. Os mastócitos têm sido reconhecidos na interação com o sistema do complemento, através do receptor do complemento 3 (CR3), do receptor do complemento 4 (CR4) e receptores para o produto do complemento C3a (C3aR) e C5a (C5aR). A demonstração que os produtos do complemento C3a e C5a poderem ser quimiotáticos para mastócitos, sugerem que a ativação do complemento pode associar a participação do mastócito na defesa do hospedeiro (Marshall, 2004). Como as células de Langerhans, os mastócitos são residentes de tecidos e são expostos ao DENV nos primeiros momentos de infecção, mas a interação do mastócito com o DENV é diferente daquelas de outros tipos de células apresentadoras de antígenos, que são alvo da infecção pelo DENV. Os mastócitos degranulam dentro de minutos de exposição ao DENV, seguida de uma nova produção de citocinas nas horas subsequentes (St John, 2011). A resposta

localizada do mastócitos ao DENV na pele é protetora, promovendo vasodilatação e recrutamento celular, o que ajuda na depuração viral (St John, 2013b). Detecção de quimase proveniente do mastócito no sangue de pacientes com infecção aguda pelo DENV, demonstra que a degranulação dos mastócitos ocorre durante o curso de infecções clinicamente significantes. Em contraste a resposta localizada na pele, o extravasamento vascular induzido por mastócitos em nível sistêmico pode contribuir para a patogênese do extravasamento vascular, tanto durante infecções primárias quanto devido à resposta aos anticorpos durante infecção secundária (St John, 2013a).

Sanchez demonstrou que mastócitos sensibilizados com soro pós-imune do DENV podia desencadear a degranulação (Sanchez, 1986). O real papel do mastócito no aumento da permeabilidade vascular tecidual presente na FHD ainda não foi elucidada.

A apoptose é uma forma ativa de morte celular geneticamente programada, como resposta a sinais moleculares externos ou internos, identificada inicialmente devido às características morfológicas. A expressão morfológica da apoptose se caracteriza pela condensação nuclear, a redução do tamanho celular e a condensação citoplasmática (Chaturvedi et al., 2009). A apoptose tem sido sugerida como um mecanismo pelo qual a infecção pelo vírus da dengue (DENV) pode causar morte celular (P. Després, 1996). A apoptose na patogênese da febre hemorrágica da dengue / síndrome do choque da dengue (DHF / DSS), foi detectada in vivo, inicialmente, em hepatócitos (Couvelard et al., 1999; Huerre et al., 2001). Alterações vasculares e metabólicas associadas ao choque (Won et al., 2002), replicação viral (Couvelard et al., 2002; al., Huerre et al., 2001) e mecanismos imunomediados poderiam estar relacionados à apoptose no curso de uma dengue (Cardier et al., 2005; Lin et al., 2002). A infecção por DENV pode causar um ambiente local de citocinas no tecido hepático que contribui para a indução de apoptose em hepatócitos infectados (Matsuda et al., 2005). Células cerebrais apoptóticas em camundongos recém-nascidos inoculados com DENV indicaram que a replicação viral induz a apoptose, sugerindo que um fenômeno semelhante ocorre na FHD/SCD (Courageot et al., 2003). Myint estudando células mononucleadas periféricas em pacientes com quadros de dengue, observou maior número de células apoptóticas na FHD, quando comparada com febre da dengue e outras doenças febris (Myint et al., 2006).

A infecção pelo DENV in vitro de linhagem de células endoteliais humanas, induz a apoptose das mesmas (Avirutan et al., 1998). Outros estudos comprovando apoptose de células endoteliais em pacientes com FHD/SCD, e observaram que o mecanismo estava ligado à reação cruzada por anticorpos anti-NS1 (Clyde et al., 2006; Lin et al., 2002). As microvasculaturas mais comprometidas foram a intestinal e pulmonar nos estudos de Limonta et al. (2010).

O fator de crescimento da célula endotelial (VEGF) tem sido muito estudado devido várias propriedades incluindo, o aumento da permeabilidade vascular (Dvorak et al., 1995). A ligação de VEGF ao receptor VEGF-2 inicia uma cascata de sinalização de tirosina quinase em células endoteliais que estimula a produção de fatores associados à permeabilidade vascular, fatores de proliferação/sobrevivência, fatores de migração e diferenciação em vasos sanguíneos maduros (Figura 10).

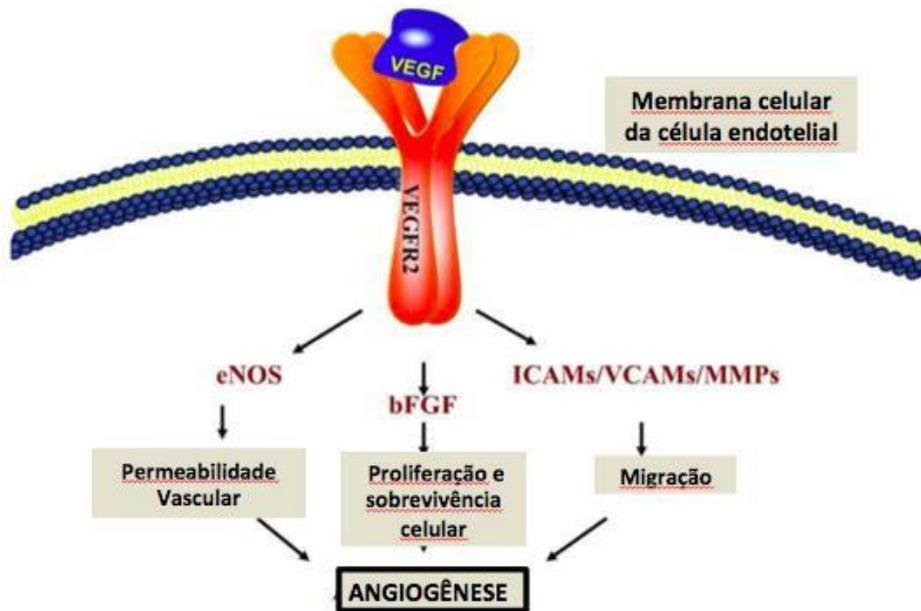


Figura 10 – Esquema de via do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGFR2 é o sinal principal que transduz o receptor VEGF para angiogênese e mitogênese das células endoteliais. Nas células endoteliais, o sistema de sinal VEGF pode ajustar a permeabilidade vascular através de eNOS.
 Fonte: Adaptado de Zou et al., 2011.

A expressão do VEGF mostra-se elevada em células endoteliais pulmonares infectadas com DENV e em soro de pacientes com FHD (Tseng et al., 2005; Azizan et al., 2006; Srikiatkachorn et al., 2007).

Mura et col. sugerem que o VEGF pode ter um papel na lesão pulmonar aguda, tanto aumentando a permeabilidade vascular pulmonar, como contribuindo para a morte de células epiteliais alveolares (Mura et al., 2006).

Considera-se que a ocorrência de casos graves de dengue resultam de múltiplos fatores, incluindo fatores nutricionais e genéticos do hospedeiro, idade, sexo, estado imunológico, fatores do vírus como o sorotipo e genótipo (Gúzman; Kouri., 2002; Malavigne et al., 2004).

1.6 Patologia

1.6.1 Defesa celular pulmonar

O processamento e apresentação de antígenos inalados, no pulmão, ocorrem principalmente no BALT (tecido linfóide associado à mucosa brônquica), que é elemento fundamental na defesa dos pulmões contra infecções, estimulando

células B e T a se tornarem células de memória e efetoras. BALT contém relativamente mais linfócitos B do que linfócitos T e pode ser um repositório de imunoglobulinas secretando células particularmente células secretoras de IgA (Murphy, 1983). Os linfócitos representam 5 a 10% de todas as células do pulmão normal, sendo 73% linfócitos T, dos quais 6% estão ativados. A maioria são células T CD4+ (40%) e o CD8+ (30%), com relação CD4+/CD8+ em torno de 1,3. No lavado broncoalveolar, a relação CD4+/CD8+ $2,0 \pm 1,0$, comparado com a sérica de $1,5 \pm 0,2$ (Saltini et al., 1984). As subpopulações de linfócitos dentro das estruturas alveolares são quase idênticas às encontradas no sangue periférico (Murphy, 1983). Na infância, acredita-se que a suscetibilidade das crianças recém-nascidas para adquirir infecções bacterianas e fúngicas, esteja relacionada à deficiência imunológica, principalmente na falha da maturação das células T. Em relação ao adulto, as crianças saudáveis apresentam uma relação de células CD4+/CD8+ menor. A distribuição das células B e *natural Killer* nas crianças foi documentada semelhante ao adulto (Holt, 1995; Santos, 2010). Os linfócitos são células-chave do funcionamento imunológico do pulmão.

O macrófago alveolar é a primeira linha de defesa contra materiais particulados inalados que alcançar o alvéolo. Seu papel na defesa pulmonar incluem: ingerir e degradar materiais estranhos no pulmão, desintoxicação de material inalado, degradação de microorganismos, eliminação de partículas para fora do pulmão e ativação imunológica de linfócitos e sistema complemento (Murphy, 1983). Os macrófagos alveolares, diferentemente aos macrófagos de outras regiões, possuem metabolismo aeróbio bastante desenvolvido, com 2 a 3 macrófagos residentes por alvéolo. A população de macrófagos no pulmão perfaz, pelo menos, 90% das células efetoras presentes no parênquima, sendo encontradas tanto na superfície epitelial alveolar e como dentro do interstício.

No pulmão normal, os neutrófilos residem na circulação e aderem ao endotélio vascular pulmonar. Isso fornece um reservatório do qual os neutrófilos podem ser rapidamente mobilizados. Através de fatores quimiotáticos, tanto dos macrófagos como do complemento e metabólitos do ácido aracônico, neutrófilos migram para o interstício e, finalmente para o espaço alveolar. Essa mobilização e subsequente ativação são importantes para função microbicida. A capacidade bactericida mais poderosa resulta em formação de radicais oxidados que são tóxicos para bactérias, porém podem lesar células endoteliais e associado à elastase liberada pode produzir danos estruturais pulmonares.

O espaço intersticial é povoado por elementos celulares diversos, tais como células inflamatórias, fibroblastos, células mioepiteliais, entre outras. Além dos componentes celulares, o interstício alveolar é composto por fibras colágenas e elásticas e proteoglicanos altamente hidrofílicos que possuem a capacidade de absorver o fluido a partir da luz alveolar ou dos capilares. Outro componente importante é o sistema complemento, constituído por uma série de proteínas que desempenham um papel na defesa do hospedeiro contra invasão bacteriana e viral. Atuam como fator quimiotático para fagócitos ou como opsonina na ingestão de microorganismos. Os mastócitos também são células efetoras da memória imunológica, uma vez que são capazes de ligar múltiplas subclasses de anticorpos através de receptores Fc.

1.6.2 Achados histopatológicos pulmonares infecção por DENV

As primeiras descrições histopatológicas pulmonares na dengue são em estudos com grande séries de autópsias, onde o diagnóstico foi baseado no quadro clínico e epidemiológico (Bhamarapavati, 1967; Burke, 1968). Os achados histopatológicos pulmonares em casos fatais humanos por DENV consistem na congestão, hemorragia intra-alveolar com graus diversos, variando de pequenos focos à difusa. Pneumonite caracterizada pelo alargamento dos septos alveolares e infiltração por células mononucleares, também com distribuição variável do comprometimento foram descritos. O espaço alveolar pode exibir algum grau de edema, e uma membrana hialina pode estar presente em raros casos. Achados consistentes com broncopneumonia, de provável etiologia bacteriana secundária, foram observados em poucos casos (Bhamarapavati, 1967; Burke, 1968; Rodrigues et al., 2014). Megacariócitos e fragmentos celulares semelhantes a plaquetas foram vistos no espaço alveolar (Basílio-de-Oliveira et al., 2005; Póvoa et al., 2014). Partículas semelhantes ao DENV foram observadas em células endoteliais e em macrófagos alveolares, utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão (Limonta et al., 2012; Póvoa et al., 2014).

O antígeno viral já foi detectado, através da técnica de imuno-histoquímica, em macrófagos alveolares, em pneumócitos tipo II, no endotélio vascular pulmonar e em monócitos circulantes nos vasos sanguíneos do pulmão (Miagostovich, 1997; Jessie, 2004; Araújo, 2009). Fita negativa do RNA viral nestas células indica uma replicação viral (Póvoa, 2014). No entanto, Aye et al. não conseguiram demonstrar a presença de antígenos virais em células no parênquima pulmonar, estando ausente

em pneumócitos, epitélio ciliado, macrófago alveolar e endotélio capilar no estudo de Aye e colaboradores. Também não foram documentados a deposição de imunoglobulinas e de componentes do complemento no tecido pulmonar nessa casuística (Aye et al., 2014).

Em modelo murino infectado por DENV-2 foi observado espessamento dos septos alveolares por congestão e edema, infiltrado inflamatório septal constituído por linfócitos (pneumonite), monócitos e plasmócitos. Detectou-se o recrutamento de plaquetas, células mononucleadas e polimorfonucleares dentro do vaso sanguíneo, seguido do extravasamento destes componentes, para o interstício, no decorrer do processo inflamatório. A análise morfométrica nesse estudo demonstrou um aumento significativo do número mastócitos localizados na região peribrônquica, nos septo alveolar, em fase precoce da inflamação pulmonar (48 horas) dos camundongos infectados, quando comparado com o grupo controle (Barreto et al., 2007).

1.6.3 Padrões histopatológicos pulmonares na Dengue

a) Padrão de hemorragia alveolar

A hemorragia alveolar é considerada uma manifestação clínica grave na dengue (Wiwanitki, 2015). Morfologicamente, pode ser expressa de forma localizada com extravasamento limitado de hemácias, ou extensa, com preenchimento da luz alveolar por hemácias íntegras (recente) ou por hemossiderina no interior de macrófagos (antiga). O pulmão costuma ser um dos órgãos com grande intensidade de hemorragia (Braga, 2014).

b) Padrão de edema alveolar

A intensidade e extensão do edema alveolar varia conforme o aumento da permeabilidade vascular ou do aumento da pressão hidrostática por falha da bomba cardíaca devido à miocardite (Wiwanitki, 2015). A microscopia optica mostra alvéolos distendidos e preenchidos por material eosinofílico, ausência de processo inflamatório e preservação dos septos alveolares (Faria, 2003). O Pulmão é o órgão que apresenta a maior intensidade do edema, quando comparado com os outros órgãos corporais (Braga, 2014).

c) Padrão de pneumonite intersticial crônica

Os achados patológicos comuns da infecção viral do trato respiratório inferior, incluindo traqueobronquite, bronquiolite e pneumonite (Kim et al., 2002). A pneumonite é definida como inflamação crônica, onde se observa um espessamento dos septos alveolares por variados graus de infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente linfocitário. A inflamação no tecido pulmonar na dengue pode ser documentada através de intensa marcação de células T ($CD4^+$, $CD8^+$), assim como, macrófagos teciduais ($CD68^+$) no parênquima pulmonar (Neri, 2012; Póvoa et al., 2016).

d) Padrão de broncopneumonia

A broncopneumonia (BCP) é definida como inflamação aguda acometendo a via aérea distal, observando-se polimorfonucleares neutrófilos desde bronquíolo terminal, e estendendo-se até alvéolos. A broncopneumonia bacteriana é considerada uma superposição de infecção na dengue (Wiwanitki, 2015). Um dos possíveis agentes bacterianos nesses quadros é o *Staphylococcus aureus* (Nagassar, 2012).

e) Dano alveolar difuso

✓ Lesão pulmonar aguda

A lesão pulmonar aguda (LPA) constitui um padrão histopatológico pulmonar induzido por diferentes agressões à unidade alvéolo-capilar, dentre elas as infecciosas. Esta agressão leva à insuficiência respiratória hipoxêmica, em consequência à resposta inflamatória aguda com infiltrado neutrofílico que determina aumento de permeabilidade vascular pulmonar.

A Conferência/Consenso dos Pesquisadores Americanos e Europeus (AECC) definiu os critérios diagnósticos clínicos e radiológicos da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Neles, constavam a início agudo da doença, infiltrados pulmonares bilaterais, pressão de oclusão da artéria pulmonar ≤ 18 mm Hg ou ausência de evidência de sobrecarga atrial esquerda, e relação entre pressão arterial de O_2 e fração inspirada de O_2 (PaO_2 / FiO_2) < 200 mm Hg. A lesão pulmonar aguda foi definida como uma categoria mais leve, na qual a relação PaO_2 / FiO_2 encontra-se com valores entre 200-300 mm Hg. A importância da diferenciação da LPA com o dano alveolar instalado, está na taxa de mortalidade menor na LPA

(Bernard et al.,1994). A partir de 2012, com introdução da definição de Berlim baseada em critérios clínicos e radiológicos, a entidade patológica LPA é a representada clinicamente pela SDRA leve (Hughes et al., 2016).

O padrão histopatológico de LPA é caracterizado morfológicamente por congestão vascular, intenso edema intersticial e intra-alveolar (Penuelas et al., 2006).

✓ Dano alveolar difuso exsudativo

O dano alveolar difuso (DAD) é caracterizado por um comprometimento segmentar ou difuso e intenso da barreira alvéolo-capilar. É subdividido conforme o curso temporal após lesão, em fase exsudativa e fase fibroproliferativa. Na primeira fase, uma avaliação microscópica mostra apoptose de pneumócitos e de células endoteliais. A lesão das células endoteliais determina a perda da continuidade da parede capilar, promovendo o edema pulmonar. A lesão das células epiteliais permite que o fluido ganhe acesso aos espaços aéreos, e o preenchimento alveolar conduz ao colapso alveolar pela redução da tensão superficial. O aumento da deformidade vascular determina aderência de neutrófilos à parede dos capilares. O vazamento capilar reflete a lesão da membrana basal ou áreas desnudas do endotélio. Ambos os tipos de células epiteliais alveolares são lesadas no DAD. A lesão dos pneumócitos tipo I causa aumento permeabilidade, e conseqüentemente, prejuízo das trocas gasosas (Capelozzi, 2011).

A lesão do pneumócito II resulta em disfunção do surfactante. A membrana hialina recobrando a membrana basal dos ductos alveolares é constituído por debris celulares de pneumócitos tipo I (Penuelas et al., 2006). Trombos de fibrina podem estar presentes na fase aguda, e são decorrentes de alterações da coagulação localizadas e não devem ser interpretados como um tromboembolismo sistêmico (Tomashefski et al., 1983; Sapru et al., 2006; Beasley, 2010). O infiltrado de células inflamatórias intersticiais no DAD é esparso e constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Castro, 2006). Geralmente, a inflamação é relativamente escassa a menos que o DAD esteja evoluído de uma pneumonia preexistente (Beasley, 2010).

✓ Dano alveolar difuso fibroproliferativo

A fase aguda é seguida pela fase fibroproliferativa, que se instala entre 7 e 14 dias. O quadro histológico é caracterizado por formação de tecido de granulação,

contendo fibroblastos, deposição de colágeno, miofibroblastos e células inflamatórias mononucleadas (Castro, 2006).

O miofibroblasto é uma célula importante no remodelamento pulmonar que ocorre em várias doenças. Os miofibroblastos presentes em lesões fibrosantes pulmonares podem apresentar imuno-marcação anti-alfa-actina de músculo liso (α SMA) positiva pelo método de imuno-histoquímica (Kang et al., 2009), ajudando na definição do estágio da DAD.

Em caráter regenerativo, a proliferação de pneumócitos II tenta reepitelizar a membrana basal desnuda da membrana alvéolo-capilar, sendo observado como hiperplasia de pneumócitos, melhor evidenciada por marcações pela técnica de imuno-histoquímica com anticorpos anti-ceratina. As células epiteliais em regeneração podem apresentar variável grau de atipia celular (Tomashefski, 2000).

✓ Pneumonia em organização e fibrinosa aguda

A pneumonia em organização fibrinosa aguda (POFA) é um padrão histológico recentemente descrito (Hughes et al., 2016) associado à agressão pulmonar aguda, onde o espaço alveolar está preenchido com material eosinofílico, formando uma estrutura arredondada de fibrina, diferindo da membrana hialina linear, encontrada na DAD. A parede alveolar pode mostrar espessamento intersticial ou infiltrado inflamatório linfocitário, porém sem a presença significativa de neutrófilos e eosinófilos.

A membrana hialina típica, embora possa ser encontrada, nesse caso é focal. Da mesma forma, a proliferação fibroblástica, não costuma ser predominante (Beasley, 2010).

f) Padrão da doença pulmonar prévia

A dengue constitui uma doença sistêmica e a *causa mortis* pode ser atribuída a vários órgãos. Na ausência de comprometimento pulmonar pelo DENV, e ser o paciente portador de uma doença pulmonar crônica anterior à infecção pelo DENV, serão encontrados somente achados histopatológicos dessa doença.

As patologias prévias observadas foram o enfisema pulmonar e a fibrose pulmonar terminal. O enfisema é uma doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), definido como aumento anormal e permanente da via aérea distal, acompanhado de destruição da parede sem fibrose óbvia (Berg et al., 2016). O tabagismo é o fator de risco dominante para o desenvolvimento e progressão da DPOC. O processo

inflamatório iniciado pelo tabagismo e outros fatores de risco levam a ciclos repetidos de agressão e reparo das paredes das vias aéreas periféricas (Murarescu et al., 2007).

A Fibrose pulmonar terminal está representada pela cronicidade constituída pela fibrose e a formação de cistos com aspecto de favo de mel. Os cistos consistem em uma série de espaços alveolares irregulares de diferentes tamanho e formas, revestidos por epitélio cuboidal ou bronquiolar, preenchidos por mucina macrófagos e neutrófilos. Há fibrose septal é densa e muitas vezes exibe hiperplasia de tecido muscular liso (Travis et al., 2013; Hashisako et al., 2015).

1.7 Diagnóstico laboratorial das infecções por Dengue

Em muitas situações, como na assistência ao paciente, vigilância, investigações de surtos e epidemias, estudo de vacinas e diagnóstico diferencial, um diagnóstico laboratorial preciso é de grande relevância (Lima et al., 2014).

O diagnóstico laboratorial das infecções pelos DENV pode ser realizado através do isolamento viral e/ou detecção do ácido nucléico viral, de técnicas sorológicas para detecção de anticorpos específicos (IgM/IgG), de antígeno (NS1) e pela detecção de antígenos virais em tecidos (Guzman et al., 2010; Fatima and Wang, 2015).

O período da doença em que o paciente se encontra é importante para decisão de qual o método diagnóstico mais apropriado para ser utilizado e para uma correta interpretação dos resultados obtidos, embora o tratamento não dependa do diagnóstico virológico (Simmons, 2012).

Para o diagnóstico das infecções pelos DENV, a amostragem ideal consiste na obtenção de duas amostras de sangue pareadas, sendo uma coletada no início dos sintomas e outra na fase de convalescença. Na ocorrência de casos fatais, tecidos como fígado, baço, rim, linfonodos, pulmão, coração e cérebro podem ser submetidos ao isolamento viral e testes moleculares. Tecidos que se destinam testes histopatológicos e imuno-histoquímicos, devem ser colocados em solução de formalina tamponada a 10% e transportado em temperatura ambiente. No Brasil, as amostras deverão ser enviadas ao Laboratório Central (LACEN) de cada estado e eventualmente ao laboratório de referência da região para a complementação de diagnóstico, caso necessário (Nogueira; Santos, 2015).

1.7.1 Isolamento viral

O isolamento viral é considerado como “padrão ouro” pois é a evidência direta da infecção viral durante a fase aguda da doença, quando os títulos de anticorpos ainda não atingiram níveis detectáveis. Pode ser realizado pela inoculação intracerebral em camundongos recém nascidos, cultura de células de mamíferos, inoculação intratorácica em mosquitos adultos e cultura de células de mosquitos (Gubler, 1997). O clone de células de *A. albopictus* C6/36 (Igarashi, 1978) tem sido o mais utilizado, e altamente sensível à infecção pelos DENV. A presença viral é detectada por efeito citopático (ECP) ou pela técnica de imunofluorescência (Gubler et al., 1984).

1.7.2 Métodos sorológicos

A sorologia é o método utilizado para confirmação laboratorial de rotina. Através das técnicas sorológicas é possível detectar infecções atuais ou recentes, por meio da captura das imunoglobulinas da classe M (IgM) por ELISA (MAC-ELISA). Na maioria dos casos, somente uma amostra de soro coletada é suficiente para a confirmação diagnóstica, contudo um resultado negativo em amostra coletada em fase precoce (6 a 10 dias após o início dos sintomas) não exclui o diagnóstico de dengue, uma vez que, em alguns casos, os níveis de IgM tornam-se detectáveis pelo teste somente após esse período. O anticorpo IgM anti-dengue desenvolve-se rapidamente, geralmente a partir do quinto dia do início da doença, e tanto em infecções primárias, quanto secundárias, esses anticorpos apresentam-se detectáveis (Peeling et al., 2010).

O ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA) também pode ser utilizado para classificar o tipo de infecção em primária ou secundária, de acordo com os títulos obtidos no teste. Anticorpos IgG são produzidos, em uma resposta primária, em geral, a partir do quinto dia de doença e permanecendo detectáveis por toda a vida (Miagostovich et al., 1999).

Ensaio imunoenzimáticos (ELISA) ou imunocromatográficos rápidos para a detecção específica da proteína NS1 foram desenvolvidos e avaliados para a confirmação de casos agudos primários e secundários de dengue (Dussart et al., 2006; Phuong et al., 2009; Lima et al., 2014).

1.7.3 Métodos moleculares para a detecção do genoma dos DENV

- ✓ Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

Diversos protocolos de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), importantes por identificar o sorotipo infectante, têm sido utilizados no diagnóstico rápido das infecções pelos DENV. São úteis tanto para a clínica quanto para a vigilância virológica (Lanciotti et al., 1992; Harris et al., 1998; De Paula et al., 2002).

O protocolo mais utilizado é o descrito por Lanciotti et al. (1992), sugerido pela Organização Pan-Americana de Saúde, detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento “*semi-nested*”, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos em pares de base para cada sorotipo dos DENV.

1.7.4 Imuno-histoquímica

Fragmentos de tecidos, de aproximadamente 2x2x1cm, que se destinam à histopatologia e à imuno-histoquímica devem ser colocados em solução de formalina tamponada a 10%, em volume cerca de dez vezes o volume do fragmento do tecido para a fixação adequada por 48 horas, e o transporte deve ser feito à temperatura ambiente.

A imuno-histoquímica tem como objetivo detectar antígenos tissular meio de anticorpo específico, este denominado anticorpo primário. Um segundo anticorpo - anticorpo secundário, se liga ao anticorpo primário e é associado a um complexo de visualização (complexo avidina-biotina-enzima- cromógeno). O cromógeno mais utilizado é o diaminobenzidina (DAB), que gera um precipitado de coloração marrom. Para a contra-coloração utiliza-se geralmente a hematoxilina, e desta forma as áreas positivas coram-se em marrom e as áreas negativas em azul, o que pode ser visualizado por microscopia de campo claro. Realizada em tecidos de casos fatais (Jessie et al., 2004; De Macedo et al., 2006; Neri et al., 2012), o método é de grande importância, especialmente quando nenhuma outra amostra estiver disponível. Positividade pode ser observada em vários órgãos, porém o fígado é o que tem apresentado maior percentual de confirmação (Nogueira & dos Santos, 2015). O Instituto Evandro Chagas (IEC) utiliza a técnica estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina que confere uma imuno-expressão em fúcsia (Hall et al., 1991). A vantagem apontada por esses autores se baseia em evitar a interferência da imuno-marcação

pela diaminobenzidina em marron, que poderiam causar dúvida de interpretação em relação à lipofucsina e à hemossiderina, presentes em determinadas amostras de dengue.

1.7.5 Outros métodos de diagnóstico investigativo

✓ Detecção de apoptose

Os métodos de detecção da apoptose são classificadas em dois tipos: direto e indireto. Os métodos diretos nos permitem observar a presença ou ausência de apoptose em determinado tecido. Já os métodos indiretos, nos permitem analisar a expressão de diferentes genes que controlam este processo, como a família bcl-2 e o p53 (Kerr et al., 1972).

O método da marcação de extremidades de dUTP mediada por um TdT (TUNEL – *Terminal Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling*) é baseado na incorporação de 16-dUTP marcado nas extremidades livres de DNA, por meio da enzima transferase deoxinucleotidil terminal (TdT) (Gavrielli et al., 1992).

A demonstração de apoptose pelo método do TUNEL em fragmentos de tecido de diversos órgãos como fígado, pulmão, cérebro e intestino foi demonstrada em autópsias, porém a apoptose de células endoteliais foi melhor evidenciada na microvasculatura da serosa intestinal e do tecido pulmonar (Limonta et al., 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Os mecanismos patogênicos das alterações pulmonares na dengue ainda não totalmente estabelecidos. Sabe-se que, o endotélio microvascular sofre alterações e pode produzir citocinas (Mustafa et al., 2001), TNF α , IFN γ (Chakravarti et al., 2006; Chen et al., 2007) e outros mediadores como óxido nítrico (NO) que estimulam a resposta inflamatória local, além da produção de anticorpos e da mudança da resposta imune mediada por linfócito T-helper 1 (Th1) para uma resposta Th2 (Balsitis et al., 2009; Chaturvedi et al., 2009).

Os padrões histopatológicos de dano alveolar difuso graduada em lesão pulmonar aguda, dano alveolar nas fases exsudativa e proliferativa, associados às formas fatais de dengue também não foram detalhadas (Wiwanitki, 2015; Hughes et al., 2016).

A quantificação, através de morfometria, de mastócitos e VEGF, podem não somente ajudar na elucidação do papel desses fatores na patogênese do aumento da permeabilidade nas formas graves de dengue, mas também sinalizar possíveis caminhos terapêuticos (Han et al., 2006; Abadie et al., 2006; Zou et al., 2011; John, 2013).

Não está claro se os sorotipos de dengue diferem em sua propensão a causar doença grave. Assim, este trabalho poderá contribuir para a demonstração das alterações morfológicas em casos fatais, comprovadamente infectados pelo DENV, o que poderá trazer mais subsídios para o entendimento da fisiopatologia da doença (Torres et al., 2013).

A demonstração de apoptose em fragmentos de tecido de diversos órgãos como fígado, pulmão, cérebro e intestino foi documentada por Limonta em autópsias. O tecido pulmonar também foi avaliado neste estudo, porém a casuística é reduzida (Limonta et al., 2007). A mensuração da apoptose através de histomorfometria numa larga série, trará real dimensão da contribuição deste fator no desenvolvimento de formas graves.

A intensidade dos mecanismos patogênicos relacionados ao extravasamento vascular, a presença de replicação do DENV através da identificação da proteína não estrutural 3 (NS3) no parênquima pulmonar, também não estão bem estabelecidos na doença em uma grande casuística como a nossa, cujo diagnóstico foi estabelecido através de técnicas moleculares.

O estudo tem o intuito de contribuir para elucidação dos eventos relacionados a patogênese das alterações pulmonares nas formas graves de dengue (febre hemorrágica da dengue e dengue com complicação), bem como, relacionar os achados com a presença de antígenos virais do DENV no parênquima pulmonar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Descrever as alterações patológicas presentes nos pulmões de casos de autópsias de indivíduos que faleceram com dengue grave no Estado do Ceará entre 2011 e 2013.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever os dados demográficos, os clínicos (sinais e sintomas), as comorbidades, e os exames diagnósticos de pacientes que foram submetidos a autópsia;
- Descrever os achados macroscópicos e microscópicos pulmonares (incluindo edema, hemorragia, pneumonite, bronquiolite, infiltrado inflamatório agudo, membrana hialina, trombose, necrose, presença de megacariócitos, hiperplasia de pneumócitos II e atipias celulares por efeito citopático), e quantificar alguns parâmetros, como o edema e a hemorragia alveolar;
- Identificar os padrões histopatológicos pulmonares e estabelecer a frequência de cada um conforme as faixas etárias;
- Quantificar as células inflamatórias (mastócitos, linfócitos T CD4+, T CD8+, relação CD4+/CD8+ e macrófagos), a apoptose e a expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) nos pulmões;
- Identificar a frequência de antígenos do DENV, da proteína não estrutural 1 (NS1), da proteína não estrutural 3 (NS3) no pulmão;
- Identificar os sorotipos DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) no pulmão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto teve aprovação pelo comitê de ética e pesquisa CEP da Universidade Federal do Ceará/ PROPESQ, com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 58571016.0.0000.5054 e parecer nº 1693117 (Anexos A a E).

4.2 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo do tipo série de casos sendo incluídos cento e vinte seis (126) pacientes que evoluíram para o óbito, com diagnóstico confirmado de dengue e devidamente notificados ao Núcleo de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.

Foi constituído um grupo controle com nove (09) pacientes que foram a óbito com morte imediata por acidente automobilístico ou por ferimento por arma de fogo, cuja autópsia medico-legal foi realizada na Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE).

O grupo de óbitos por Dengue Grave compreende os casos definidos na época das autópsias, como número de casos com a apresentação Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) somado ao número de casos com apresentação Dengue com complicações (DCC).

Os casos confirmados de FHD preenchem todos os critérios abaixo relacionados (Brasil, 2002; Siqueira, 2010):

- Febre ou história de febre recente, com duração de sete dias ou menos;
- Trombocitopenia ($\leq 100.000/\text{mm}^3$);
- Tendências hemorrágicas evidenciadas por um ou mais dos seguintes sinais: prova do laço positiva, petéquias, equimoses ou púrpuras, sangramento de mucosas, do trato gastrointestinal, trato respiratório, trato geniturinário, suprarrenal, e outros;
- Extravasamento de plasma devido ao aumento da permeabilidade capilar, manifestado por hematócrito com aumento de 20% do valor basal, ou de valores superiores a 45% em crianças, 48% em mulheres e a 54%

homens; ou queda do hematócrito em 20% após o tratamento; ou presença de derrame pleural, pericárdico, ascite e hipoproteinemia;

- Confirmação laboratorial de todos os casos através de exames específicos.

Os casos de DCC apresentaram pelo menos um dos critérios abaixo, associado à confirmação laboratorial através de exames específicos (Brasil, 2002; Siqueira, 2010):

- Alterações neurológicas;
- Disfunção cardiorrespiratória;
- Insuficiência hepática;
- Hemorragia digestiva volumosa;
- Derrame pleural, pericárdico e ascite;
- Trombocitopenia ($\leq 50.000/\text{mm}^3$);
- Leucopenia ($\leq 1.000/\text{mm}^3$);
- Caso suspeito de dengue que evoluiu para óbito, porém sem preencher todos os critérios estabelecidos acima para FHD.

O critério de exclusão baseou-se na ausência de blocos nos arquivos do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO-CE).

4.3 Coleta de amostras e dados

4.3.1 Coleta dos dados demográficos, dados clínicos e laudo de autópsia

A coleta de dados referentes à identificação individual, aos dados demográficos, aos dados da história clínica, aos antecedentes pessoais e doenças pregressas e aos laudos das autópsias, foi realizada através da revisão de ficha do Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado (SVO - CE). O fluxograma diagnóstico realizado no SVO-CE em casos suspeitos de dengue no período de 2011 a 2013 está apresentado na Figura 11.

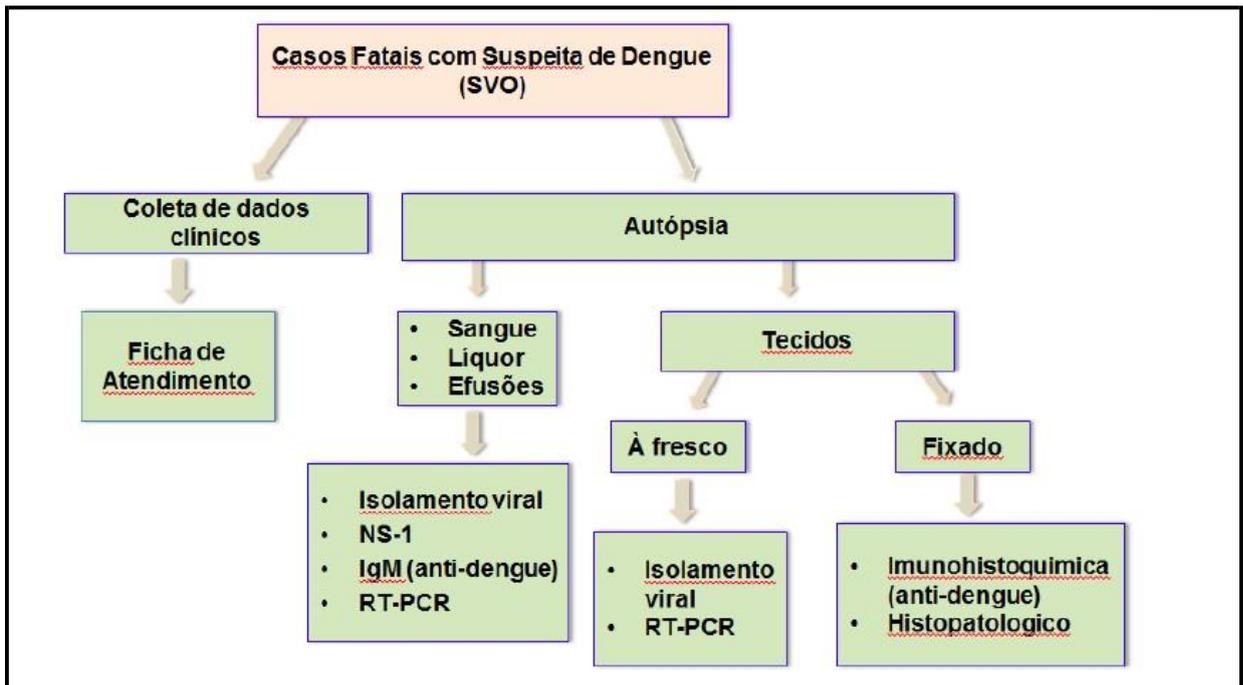


Figura 11 – Fluxograma diagnóstico realizado no SVO-CE em casos suspeitos de dengue no período de 2011 a 2013

Fonte: Braga, 2014.

4.3.2 Coleta de amostras de tecido, sangue e líquor

O material foi coletado durante o exame de autópsia, nos anos de 2011, 2012 e 2013. Após pesagem e análise macroscópica do pulmão, foram extraídos com bisturi três fragmentos com volume de aproximadamente 2,0cm x 2,0 cm x 1,0 cm, de lobos pulmonares diversos. Dois dos fragmentos foram fixados em formalina a 10% e o outro foi mantido a fresco. Um dos fragmentos fixados foi enviado ao Instituto Evandro Chagas (Belém - Pará) para pesquisa imuno-histoquímica de DENV. O segundo fragmento fixado em formalina permaneceu no SVO para análise histopatológica. O fragmento mantido à fresco foi enviado para o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-CE) para realização de PCR para detecção de DENV. Durante o exame de necropsia foram coletados 10 ml de sangue total da artéria aorta. O sangue foi enviado para o LACEN-CE para realização de sorologias (ELISA) para detecção de anticorpos contra DENV. Foram coletados ainda 10 ml de líquor antes da extração do encéfalo, para pesquisa do antígenos NS1 no LACEN-CE. A coleta das amostras obedeceu ao protocolo de autorização de autópsia do Ministério da Saúde, onde recomenda-se que o procedimento ocorra em intervalo de até doze horas *post mortem*.

A obtenção dos blocos de parafina dos 126 casos confirmados de dengue obedeceu a orientação da direção médica do SVO, com busca ativa no arquivo da instituição.

4.3.3 *Microarranjos do tecido pulmonar (tissue microarray)*

Os microarranjos de tecidos (*tissue microarray* - TMA) para a quantificação da imuno-expressão dos biomarcadores foi realizado no Laboratório Multiusuário no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

O protocolo utilizado pelo laboratório, foi constituído por 13 colunas e 12 linhas permitindo a análise dos biomarcadores protéicos de 30 casos uma única lâmina (Figura 12).

Bloco 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	RIM	RIM	RIM	RIM	0073/11	0073/11	0073/11	0073/11	0073/11	0095/11	0095/11	0095/11	0095/11
2	0095/11	0154/12	0154/12	0154/12	0154/12	0154/12	0243/12	0243/12	0243/12	0243/12	0243/12	0328/11	0328/11
3	0328/11	0328/11	0328/11	0331/11	0331/11	0331/11	0331/11	0331/11	0407/12	0407/12	0407/12	0407/12	0407/12
4	0529/11	0529/11	0529/11	0529/11	0529/11	0544/11	0544/11	0544/11	0544/11	0544/11	0555/12	0555/12	0555/12
5	0555/12	0555/12	0584/11	0584/11	0584/11	0584/11	0584/11	0634/11	0634/11	0634/11	0634/11	0634/11	0661/12
6	0661/12	0661/12	0661/12	0661/12	0669/11	0669/11	0669/11	0669/11	0669/11	0684/12	0684/12	0684/12	0684/12
7	0684/12	0704/12	0704/12	0704/12	0704/12	0704/12	0838/11	0838/11	0838/11	0838/11	0838/11	0843/11	0843/11
8	0843/11	0843/11	0843/11	0846/12	0846/12	0846/12	0846/12	0846/12	0855/11	0855/11	0855/11	0855/11	0855/11
9	0876/11	0876/11	0876/11	0876/11	0876/11	0897/11	0897/11	0897/11	0897/11	0897/11	0910/11	0910/11	0910/11
10	0910/11	0910/11	0933/11	0910/11	0910/11	0910/11	0910/11	0941/11	0941/11	0941/11	0941/11	0941/11	0945/11
11	0945/11	0945/11	0945/11	0945/11	0956/11	0956/11	0956/11	0956/11	0956/11	0995/11	0995/11	0995/11	0995/11
12	0995/11	1014/12	1014/12	1014/12	1014/12	1014/12	1067/11	1067/11	1067/11	1067/11	1067/11		

Figura 122 – Protocolo contendo o planejamento do bloco 1 das microsecções (*spots*) das autópsias 73/11 a 1067/11, distribuídas em 13 colunas e 12 linhas para TMA

Fonte: Elaboração própria.

Foram confeccionadas cinco lâminas, contendo cinco microseções com diâmetro de 1mm por paciente, dos 126 casos com diagnóstico de dengue e 9 casos controles, (Figura 13). As lâminas foram colocadas em caixas plásticas identificadas e estocadas a menos 4°C para preservar a antigenicidade do material.

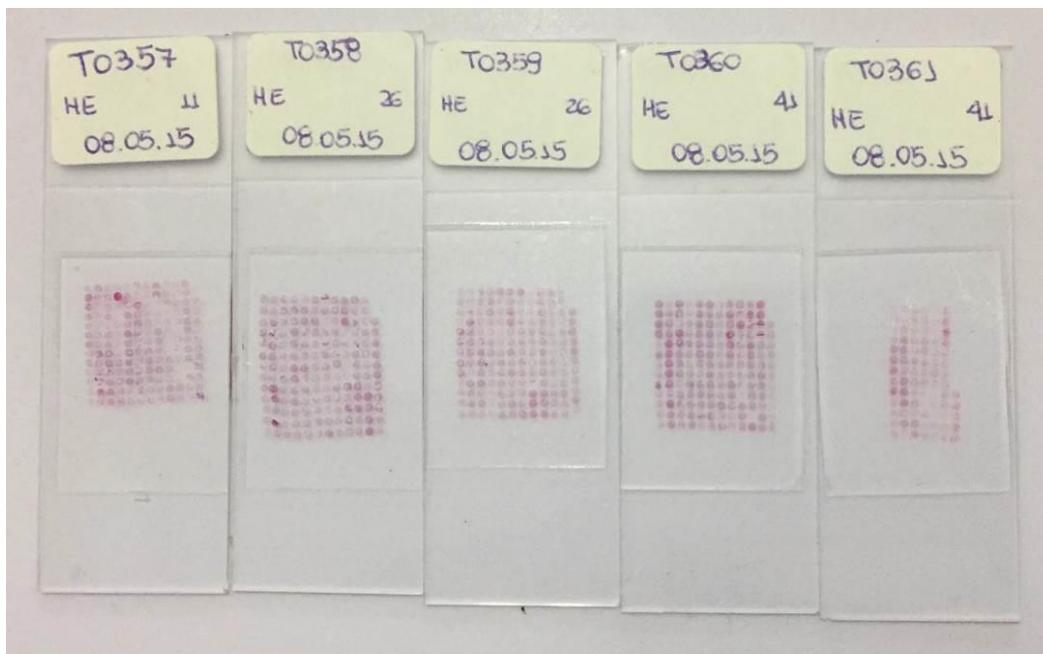


Figura 13 – Cinco lâminas de TMA confeccionadas no Laboratório Multiusuário do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), contendo o total de 135 casos em estudo
Fonte: Arquivo da pesquisa.

4.4 Confirmação do diagnóstico de dengue

4.4.1 Confirmação do diagnóstico de dengue pelo LACEN-CE

A confirmação do diagnóstico de dengue como *causa mortis* por ocasião da realização das autópsias, obedeceu o protocolo do Ministério da Saúde adotado pela Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Os exames diagnósticos de dengue foram realizados pelo LACEN. Amostras de todos os casos foram encaminhados, e pelo menos um dos seguintes testes foi positivo: isolamento viral, detecção de antígeno viral NS1 por ELISA, detecção de IgM anti-DENV por ELISA ou RT-PCR.

As amostras foram encaminhadas ao LACEN-CE em até duas horas após a coleta, para realização dos testes diagnósticos na época da realização da autópsia.

Para a detecção viral por RT-PCR, os fragmentos de tecido foram congelados a -80°C e, no momento de uso, foram triturados em 1,5mL de Leibovitz-15 médio (Sigma), pH 7,0-7,4 e 3% de penicilina de sódio / sulfato de estreptomicina. A

suspensão foi centrifugada (10.000 rpm a 4°C, durante 15 minutos). O sobrenadante obtido foi transferido para um criotubo esterilizado e armazenado a - 80°C até ser utilizado.

Para o isolamento viral, as amostras de sangue ou de soro foram inoculadas em uma monocamada da linhagem celular C6/36 do *A. albopictus*. A identificação do vírus isolado foi feita por imunofluorescência indireta, com anticorpo monoclonal específico de cada sorotipo (Igarashi, 1978; Gubler et al., 1984).

A técnica de *nested* RT-PCR (Lanciotti et al., 1992) foi utilizada para detecção do RNA viral extraído a partir de 140 µl de líquido cefalo-raquidiano (CSF) e/ou amostras de sangue utilizando o mini kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, Valência, CA, EUA).

A detecção do antígeno viral NS1 foi realizado pelo kit NS1Ag Pan-E Dengue Early ELISA kit (PanbioDiagnostics, Brisbane, Queensland, Australia).

A técnica MAC-ELISA foi realizada para detecção de anticorpos IgM anti dengue nas amostras de soro e/ou líquido pelo kit Panbio (Panbio Inc., Columbia, Maryland, EUA).

4.4.2 Confirmação do diagnóstico de dengue através de imuno- histoquímica pelo Instituto Evandro Chagas (IEC-PA)

O Instituto Evandro Chagas (IEC) realizou o estudo imuno- histoquímico em fígado fixado em formalina 10%, pela técnica estreptavidina-biotina- fosfatase alcalina (SAAP), para amostras incluídas em parafina.

A técnica foi constituída, inicialmente, por cortes de tecido de aproximadamente de 3 a 4 µm de espessura, com montagem em lâminas silanizadas. O bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu com leite desnatado a 10% em água destilada por 15 minutos. O bloqueio da fosfatase alcalina endógena foi realizado em solução de fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, e proteases 0.100g (11U/ml) por 20 minutos. Incubado com anticorpos primários policlonais anti-DENV-2 (produzidos em camundongos pelo Setor de Arboviroses do IEC-PA), por uma hora; seguida de lavagem em tampão de salina fosfato (PBS) por três vezes, durante três minutos cada. O anticorpo secundário Vectastain (Peroxidase Mouse IgG PK-4002) foi adicionado e incubado por uma hora. Foi lavado novamente por 3 vezes em PBS, por 3 minutos cada e posteriormente, foi incubado com Estreptavidina - Biotina - Fosfatase alcalina (SAAP - 3 mg/2ml - e invitrogen) por uma hora. Após, a solução TRIS pH 7.4-7.6 foi permutada por 3

vezes, com duração de 3 minutos e aplicado o revelador HistoMark RED Phosphatase System (Kirkegaard and Perry Labs Inc., Gaithersburg, MD) por uma hora, obedecendo a proteção da luz. Na contra-coloração foi utilizada com Hematoxilina de Harris. O antígeno viral foi identificado em citoplasma de células de Kupffer com imunoexpressão em rosa-fúcsia. Foram realizados controles negativo e positivo para cada grupo de amostras testadas.

4.5 Análise macroscópica dos pulmões

A macroscopia constou da pesagem de ambos os pulmões em gramas, e dos aspectos morfológicos presentes como a congestão, o edema, a hemorragia, a trombose, a consolidação e achados de doenças pulmonares crônicas prévias. Os achados foram observados a olho nu, pelo patologista responsável, durante a autópsia.

4.6 Análise histopatológica

4.6.1 Análise histopatológica corada pela técnica de rotina da Hematoxilina & Eosina (HE)

Espécimes pulmonares de 2x2cm de área, processados e emblocados em parafina no Laboratório do SVO-CE, foram cortados a 5 µm de espessura e corados pela técnica de rotina da Hematoxilina e Eosina (HE), e examinados sob microscopia óptica.

Os seguintes parâmetros morfológicos foram avaliados de forma categórica, quanto a presença (1) ou ausência (0): edema, hemorragia, pneumonite, bronquiolite, infiltrado inflamatório agudo, membrana hialina, trombose, necrose e atipias celulares por efeito citopático.

O edema e a hemorragia também foram quantificadas através de histomorfometria, expressa em frequência de campos positivo do parâmetro, e de acordo com a razão percentual em relação ao alvéolo.

4.6.2 Análise hispatológica corada pela técnica de rotina da Hematoxilina & Eosina associada à imuno-histoquímica

Os espécimes pulmonares foram processados conforme descrito no item, 4.6.1 e examinados sob microscopia óptica.

A presença (1) ou ausência (0) de megacariócitos foi duplamente avaliada, utilizando a tanto a técnica HE como a imuno-marcação anti- Fator VIII.

A presença (1) ou ausência (0) da hiperplasia de pneumócitos II foi observada pela coloração HE, e ratificada pela imuno-expressão de anti-citoqueratina AE1/AE3.

A presença (1) ou ausência (0) de proliferação de miofibroblastos também foi observada pela coloração HE, e confirmada pela imuno-expressão anti - α -Actina músculo liso (α SMA).

4.6.3 Classificação dos padrões histopatológicos pulmonares na infecção pelo DENV

Os padrões histopatológicos foram definidos através dos achados morfológicos predominantes (maior que 50% da amostra) e/ou por ser patognomônico das diversas entidades nosológicas estabelecidas na patologia pulmonar. As espécimes pulmonares avaliadas eram constituídas por tecido com área de 2x2cm, cortados a 5 μ m de espessura e corados pela técnica de rotina da HE. Foram considerados os seguintes padrões na nossa amostragem:

- I. Padrão de Hemorragia e Edema alveolares
- II. Padrão de Edema alveolar
- III. Padrão de Pneumonite intersticial crônica
- IV. Padrão de Broncopneumonia
- V. Dano Alveolar Difuso
 - V.1.1 Lesão pulmonar aguda
 - V.1.2 Dano alveolar difuso exsudativo
 - V.1.3 Dano alveolar difuso fibroproliferativo
 - V.1.4 Pneumonia em organização e fibrinosa aguda
- VI. Padrão da doença de base pulmonar anterior à dengue

4.7 Imuno-histoquímica para identificação e quantificação dos marcadores CD4, CD8, CD68, Mastócito, VEGF, Citoqueratina (AE1/AE3), α -Actina músculo liso e Fator VIII

A técnica aplicada foi da Avidina- biotina- peroxidase utilizando cortes de tecido em microarranjos (TMA), de aproximadamente de 3 a 4 μm de espessura, com montagem em lâminas silanizadas. Em exceção da identificação viral no parênquima pulmonar realizada no IEC-PA, todas as outras técnicas de imuno-histoquímica foram confeccionadas no Laboratório de Histomorfometria e Genômica Pulmonar do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Para todos os marcadores, a recuperação dos antígenos foi em alta temperatura em panela de Pressão Pascal (Dako) por 3 minutos a 121°C, onde as lâminas foram colocadas em solução de Citrato pH 6,0. O bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada de 10 Volumes (3%), por 5 minutos, repetindo a operação por 4 vezes, e lavando com PBS ou TBS, por 3 minutos. O bloqueio de IgG inespecíficas foi realizado pelo uso de Protein Block (Novocastra RE-7158) por minutos. Em sequência, houve a incubação com os anticorpos descritos na Figura 14.

Anticorpo	Diluição	Marca	Investigação
CD4 (OPD4)	1:400	Dako	
CD-8 (C8/144B)	1:400	Dako	
CD68 (Clone KP1)	1:3200	Dako	Células inflamatórias
Mast C Tryptase (clone AA1)	1:2000	Dako	
VEGF (A20)	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Mediação de angiogênese e permeabilidade vascular
Citoqueratina (Clone AE1/AE3)	1:100	Dako	Epitélio respiratório
α -Actina músculo liso (α SMA Clone 1A4)	1:500	Dako	Miofibroblasto
Fator VIII	1:100	Dako	Megacariócitos

Figura 14 – Quadro com anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica para avaliação de alterações e danos ocorridos nos tecidos pulmonares

Fonte: Elaboração própria.

Em sequência, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com anticorpo secundário (polímero Novolink, marca Leica) por 30 minutos a 37°C, nas duas etapas pós primário e complexo, para os anticorpos CD4, AE1/AE3, α -SMA e Fator

VIII; para os anticorpos CD8, VEGF, Mast C Tryptase e CD68, utilizamos o Super Enhancer (marca Biogenex). Após lavagem com PBS ou TBS, por 3 vezes, as lâminas foram colocadas em solução com cromógeno (70 mg de DAB – diaminobenzidina) em 100 ml de tris-HCL pH 7,6 + 30 microlitros de água oxigenada 30V. A contra-coloração foi realizada em Hematoxilina de Harris. A imuno-expressão foi atribuída a marcação citoplasmática, nuclear ou de membrana em marrom conforme o perfil celular e do anticorpo aplicado. O controle negativo foi realizado para todos os anticorpos.

4.8 Detecção da apoptose através da detecção *in situ* por marcação de extremidades de dUTP mediada por um TdT (TUNEL)

Microsecções (TMA) de tecido pulmonar de 3 a 4 μm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Histomorfometria e Genômica Pulmonar do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O processo de desparanifinação foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 10 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água destilada e em tampão fosfato pH 7,4. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada por tratamento com proteinase K em temperatura ambiente por 30 min. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com H₂O₂ 0,3% em metanol por 30 minutos à temperatura ambiente e após lavado muito bem em água corrente, água destilada e PBS.

As lâminas foram incubadas com 50 μl da mistura de reação TUNEL (terminal transferase assay mediated dUTP nick end labeling usando 5 μl da solução de Enzima, 45 μl da solução tampão) por amostra em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos com 50 μl do conversor de peroxidase e posteriormente lavadas 3x em tampão fosfato em 3 minutos. Foi utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) onde as lâminas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, ocorreu a contra-coloração com verde de metila, para todos os casos. A imuno-expressão se apresentou nuclear em cor preta-marrom em diversas

morfologias celulares atribuídas a linfócitos, macrófagos, células endoteliais ou epiteliais. O controle negativo foi realizado em conjunto com as amostras do dia.

4.9 Identificação dos sorotipos DENV em tecido congelado por transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (*semi-nested* RT-PCR)

O RNA viral foi extraído de amostra de tecido masserado congelado de autopsias de 59 casos de dengue (pulmão, fígado, baço, rim), utilizando o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com protocolo descrito pelo fabricante.

O Tampão de Lise AVL+ 5,6 µL de Carrier/AVE e 140 µL do sobrenadante foram colocados em tubo de 1,5mL. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. O álcool etílico PA a 100% foi adicionado e a suspensão foi novamente homogeneizada. Dessa mistura, 630 µL foram transferidos para uma coluna previamente numerada. Após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído do tubo coletor foi desprezado. Novo tubo coletor foi colocado na coluna e os 630 µL restantes da mistura foram transferidos para a coluna. Adicionou-se 500 µL do Tampão de lavagem AW1 e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído foi descartado. Adicionou-se 500 µL do Tampão de lavagem AW2 e após centrifugação por 3 minutos a 14000 rpm o eluído foi descartado. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e após centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm, a coluna foi transferida para um tubo tipo *ependorf* de 1,5 ml previamente identificado. Adicionou-se 60 µL de Tampão de eluição (AVE) e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm a coluna foi descartada e o RNA foi acondicionado a -70°C.

Para transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al. (1992) para detecção e tipagem dos DENV a partir dos espécimes clínicos. Este protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento "*semi-nested*", gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos em pares de base (pb) para cada sorotipo dos DENV. Em uma primeira etapa, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatros sorotipos dos DENV, complementares as seqüências dos genes C e prM. No procedimento *nested*, são utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV1 a 4, respectivamente, Quadro 2. Os produtos obtidos após a amplificação por RT-PCR

foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo, revelados em luz UV.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (em pares de base □pb□)
D1 (+)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3'	134-161	511
D2 (-)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	616-644	
TS1 (-)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3'	568-586	482 (D1 + TS1)
TS2 (-)	5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'	232-252	119 (D1 + TS2)
TS3 (-)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3'	400-421	290 (D1 + TS3)
TS4 (-)	5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	506-527	392 (D1 + TS4)

Figura 15 – Quadro com oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue

Fonte: Lanciotti et al.,1992.

Cerca de 200 µL de RNA extraído foi colocado em microtubo e aquecido, em bloco térmico, a 75°C por 5 minutos e posteriormente mantido em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 45µL da mistura RT-PCR, constituída por 37,12 µL Água livre de nucleases (Promega), 4µL 10 X PCR Buffer sem Mg⁺⁺ (Gibco), 4µL 10 mM desoxinucleotídeos (dNTPs) (Gibco), 0,25 µL 0,1 M Dithiothreitol (DTT) (Gibco), 0,13µL 10 µM iniciador D2 (Gibco), 0,25 µL 40 U/µL RNAsin(Gibco), 0,25µL 5 U/µL Taq DNA Polimerase(Gibco), 0,1µL 2,5 U/µL enzima AMV-RT(Gibco) e 1,5µL 50 mM Cloretode magnésio (Gibco). Posteriormente colocou-se os microtubos no termociclador, em sequência de ciclos, tempo e temperaturas diferentes (42°C/ 60 min; 94° C /30 sec; 56° C/1 min; 72° C/2 min; 72° C/10 min; 4° C/ até retirar do Termociclador).

Numa segunda etapa de amplificação (Semi-nested PCR), para tipagem dos vírus dengue, diluiu-se os produtos, em microtubos de 1,5mL. Os produtos obtidos foram novamente diluídos em 1:100 (5µL produto e 495 µL água).

Em microtubos de 200 µL, adicionou-se 45µL da mistura semi-nested PCR e 5µL do produto da primeira reação diluído. Colocou-se os microtubos no termociclador, em nova sequência de ciclos, tempo e temperaturas diferentes (94° C/30 sec; 56° C/1 min; 72° C/2 min; 4° C/ até retirar do Termociclador).

Após a semi-nested, realizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose (1,5%), onde numa bandeja acrílica adicionou-se a mistura de 1,5 g de agarose com 100 mL de TBE (0,5X), onde foi previamente aquecido e solubilizado, quando a

mistura estava resfriada foi adicionado 5 µL de brometo de etídeo. Após a solidificação, colocou-se o gel imerso em solução de TBE (0,5X) na cuba de eletroforese.

Aplicou-se 10 µL da reação, obtida após a semi-nested, + 2µL azul de bromofenol e procedeu a eletroforese a 100 V-50mA /45 min. No primeiro orifício, aplicou-se 3,5µL do peso molecular + 2 µL azul de bromofenol. Após a corrida realizou-se a captura da imagem num trans-iluminador, leitura feita em luz UV. A diluição do padrão de peso molecular (100pb DNA ladder - Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) foi de 1/10 com água livre de nucleases.

4.10 Identificação do DENV em parênquima pulmonar através de imuno-histoquímica

O IEC-PA realizou o estudo imuno-histoquímico em microarranjos (TMA) de tecido pulmonar, seguindo a mesma técnica estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina (SAAP) descrita anteriormente para amostras hepáticas, utilizando anticorpos policlonal anti-DENV-3 (produzidos no IEC em camundongos suíços inoculados com DENV-3). O antígeno viral foi identificado em citoplasma de macrófagos alveolares, com imunexpressão em cor rosa-fúcsia. Foram realizados controles negativo e positivo para o grupo de amostras testadas em uma única imunorreação para todos os casos investigados.

4.10.1 Identificação de proteína não estrutural 1 (NS1) e Proteína não estrutural 3 (NS3) no parênquima pulmonar através de imuno-histoquímica

Ensaio de imuno-histoquímica para a detecção de antígenos NS1 e NS3 foram realizados de acordo com o protocolo do Laboratório de Histomorfometria e Genômica Pulmonar, conforme descrito anteriormente. A detecção do NS1 foi realizada utilizando anticorpo anti-NS1 diluído 1:200 (Sigma - Aldrich, produzido a partir de coelho, 1mg/ml, ref. SAB 2700022). Já para a identificação da proteína NS3, foi utilizado anticorpo policlonal anti-DENV-3 produzido em camundongo suíço, diluído 1:400. A imuno-expressão foi atribuída à marcação citoplasmática em marrom e o controle negativo foi realizado para os dois anticorpos.

4.11 Histomorfometria com retículo para quantificação das alterações morfológicas e da expressão da molécula

A histomorfometria foi realizada através de contagem de pontos imunomarcados utilizando um retículo contendo 100 pontos na ocular do microscópio, com área conhecida de $62.500 \mu\text{m}^2$ no aumento de 400x, Figura 16. Foram observados dois campos aleatórios por microsecção sob aumento de 400x, perfazendo 10 campos pulmonares e 1000 pontos de retículo por cada paciente (Mandarim-De-Lacerda, 1995; Anciães, 2011).

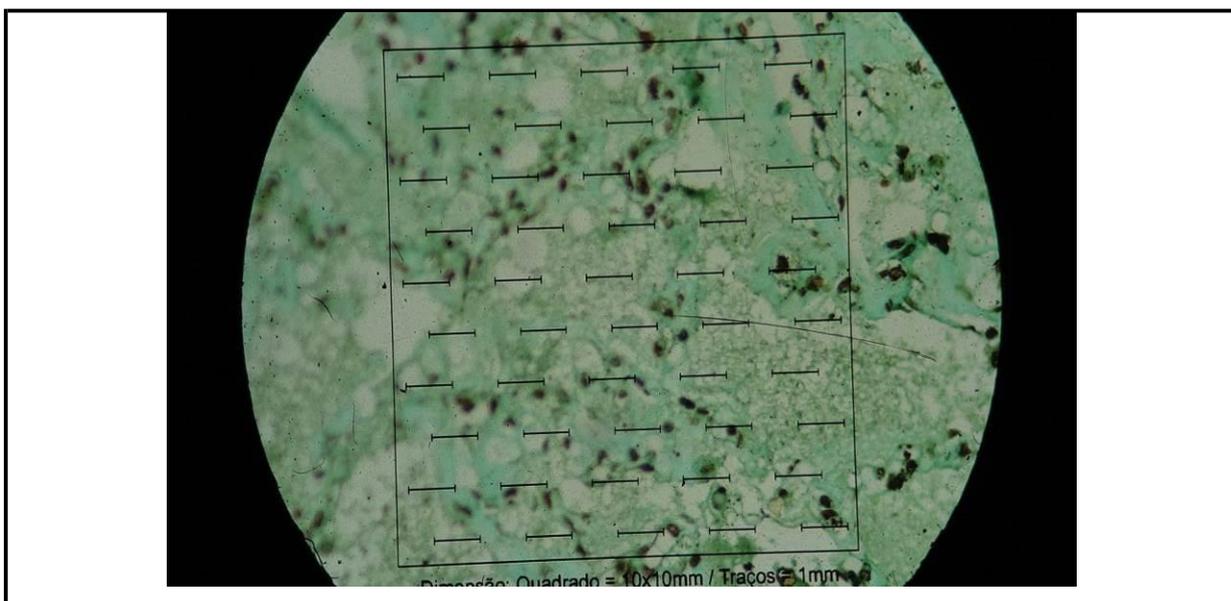


Figura 16 – Análise histomorfométrica. Retículo composto por 50 segmentos de retas de 1mm e 100 pontos nas extremidades das retas, dispostos em área de $10 \times 10 \text{mm}$

Fonte: Arquivos da pesquisa.

Assim, obtivemos um valor absoluto de células marcadas pelo anticorpo em estudo, resultado da média das células positivas nos dez campos avaliados. A fração de área de células positivas foi calculada pela relação entre os valores absolutos positivos e o número de pontos que incidem no septo alveolar. O resultado foi expresso como células/ μm^2 . No caso da hemorragia e do edema, utilizamos como denominador os pontos que incidiam na área do lúmen alveolar. Nesta avaliação, o resultado foi expresso em edema ou hemácia alveolares/ μm^2 . Outra medida também avaliada foi a densidade, calculada com a divisão do valor absoluto de células marcadas pelo anticorpo em estudo pela área de campo no valor de $8,8 \mu^{-2}$, sendo o resultado expresso em células/ μ^{-2} (Gundersen, 1988).

4.12 Estratégia de análise de dados e variáveis do estudo

Os dados demográficos, clínicos e morfológicos dos pacientes foram reunidos em uma planilha eletrônica do Microsoft Office Excel.

Coletados os dados e elaborada a planilha eletrônica, buscou-se descrever todas as variáveis do estudo, para isso, recorreu-se a técnicas de análise estatística descritiva.

Em posse dessa técnica, calculou-se algumas medidas descritivas, como média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo, além disso, foram criadas tabelas de frequência absolutas e relativas, essa última expressa em percentual. Essa estratégia contemplou variáveis como: idade, sexo, peso do pulmão e presença de sinais, sintomas e comorbidades, como doenças cardiovasculares (miocardiopatia dilatada, hipertensão arterial), diabetes mellitus, asma e enfisema pulmonar; além dos fatores de risco de tabagismo. Também calculou-se medidas descritivas, como média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo de morfometria dos parâmetros CD4+, CD8+ e da relação CD4+/ CD8+.

Finalizada essa etapa de descrição dos dados em estudo, recorreu-se aos testes estatísticos para comparação entre as variáveis demográficas, morfológicas, padrões histopatológicos e formas de apresentações. Os testes utilizados foram o de Mann-Whitney e o de Qui-quadrado.

O teste de Mann-Whitney é indicado para comparação de dois grupos não pareados para verificar se pertencem ou não a mesma população. Na verdade, verifica-se a existência de evidências para acreditar que valores de um grupo A são superiores aos valores do grupo B. Esse teste pode ser considerado a versão não paramétrica do teste t, para amostras independentes, sendo que, ao contrário do teste t, que testa a igualdade das médias entre os grupos, o teste de Mann-Whitney testa a igualdade das medianas.

Através do teste de Mann-Whitney foram feitas as seguintes comparações:

- a. Foi comparada a intensidade da apoptose, expressa em células apoptóticas/ μm^2 presentes no septo alveolar, nos grupos de FHD, DCC e grupo de comparação.
- b. A quantidade de linfócitos T CD4, T CD8 e CD68, mastócito expressa em células/ μm^2 presentes nos septos alveolares, foi comparada entre os grupos FHD, DCC e grupo de comparação.

c. A expressão da molécula VEGF, quantificada em células endoteliais/ μm^2 presentes no septo alveolar, foi comparada entre os grupos FHD, DCC e grupo de comparação.

d. Verificou-se se o número de plaquetas difere quanto os grupos FHD, DCC.

Através do teste t de Studart foram feitas as seguintes comparações:

– A quantidade de linfócitos T CD4+, T CD8+ e CD4+/CD8+ expressa em células/ μ^{-2} presentes nos septos alveolares, foi comparada entre os grupos FHD, DCC e grupo de comparação.

O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar as frequências obtidas dos cruzamentos entre variáveis categóricas.

O teste Qui-quadrado de independência verifica se existe relação ou associação entre duas variáveis, basicamente são testadas as seguintes hipóteses:

- H_0 : As variáveis não estão associadas.
- H_1 : As variáveis são associadas.

Por meio desse teste, foi verificada a associação entre as classes de dengue (DCC e FHD), os sorotipos DENV-1, DENV-3 e DENV-4, e os padrões histopatológicos estabelecidos.

Devido a maior parte das tabelas apresentarem poucas observações, foi utilizado o método de simulação de Monte Carlo, que realiza simulações para buscar corrigir possíveis erros de aproximação do teste Qui-quadrado.

A fim de estudar as relações entre as classes de dengue, sorotipos e padrões histopatológicos foram feitas as seguintes análises:

- Odds ratio para analisar a força de associação entre os padrões histopatológicos e os sorotipos DENV1 e DENV4.
- Odds ratio para analisar a força de associação entre os sorotipos e a classe de dengue.

Para ambos os testes, foi estabelecido um nível de confiança de 95%.

As variáveis em estudo podem ser classificadas em dependentes e independentes.

a. A seguir segue a classificação das variáveis:

b. Presença/ausência de FHD ou DCC (Dependente);

c. Presença/ausência dos padrões histopatológicos descritos (Dependente);

d. Edema: contínua, em percentual de área alveolar atingido (Independente);

- e. Hemorragia: contínua, em percentual de área alveolar atingido (Independente);
- f. Expressão T CD4+: contínua, em célula positiva/ μm^2 (Independente);
- g. Expressão T CD8+: contínua, em célula positiva/ μm^2 (Independente);
- h. Relação da expressão T CD4+/ T CD8+: contínua, em célula positiva / μ^{-2} (Independente);
- i. Expressão CD68: contínua, em célula positiva/ μm^2 (Independente);
- j. Expressão VEGF: contínua, célula endotelial positiva/ μm^2 (Independente).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise descritiva dos dados demográficos, dados clínicos, co-morbidades, fatores de risco, critérios classificatórios presentes nas autópsias e exame laboratorial

Foram incluídos cento e vinte e seis pacientes confirmados com diagnóstico clínico, patológico e laboratorial de dengue. A tabela 1 ilustra os métodos diagnósticos utilizados. O método que mais confirmou o diagnóstico foi a presença de antígeno viral pela técnica de imuno-histoquímico em tecido hepático (IHQ tecido hepático: 77%). Em sequência, seguem a pesquisa da NS1 em tecido pulmonar (NS1 tecido pulmonar: 63,6%), a pesquisa da NS3 em tecido pulmonar (NS3 tecido pulmonar: 58,7%), a pesquisa de NS1 sérica (NS1 sérico 30,3%), a presença de antígeno viral pela técnica de imuno-histoquímico em tecido pulmonar (IHQ tecido pulmonar: 28,5%), a identificação do sorotipo do DENV pela RT-PCR em tecido congelado (sorotipo DENV: 26,3%) e pelo isolamento viral (23,9%), a pesquisa de IgM sérica (IgM sérica ELISA: 21,3%). A RT-PCR sérica foi a técnica com menor recuperação diagnóstica nesta casuística (RT-PCR sérica: 14,2%).

Tabela 1 – Frequência do método diagnóstico nos 126 casos de Dengue

Metodologia	Nº casos positivos	Total casos analisados	%
IgM sérico ELISA	25	117	21,3
NS1 sérico ELISA	30	99	30,3
NS1 IHQ tecido pulmonar	63	124	63,6
NS3 IHQ tecido pulmonar	74	126	58,7
RT-PCR sérico	11	77	14,2
IHQ tecido hepático	94	122	77,0
IHQ tecido pulmonar	36	126	28,5
Sorotipos DENV	38		
Isolamento viral	23	96	23,9
RT-PCR em tecido congelado	15	57	26,3

Nº = número; % = percentual em relação ao total de observações.

Fonte: Elaboração própria.

Sessenta e nove pacientes eram do sexo masculino (54,8%), com média de idade 38,2 anos, e 57 (45,2%) do sexo feminino com média de idade de 34,7 anos, Tabela 2. Cem pacientes apresentaram a forma de dengue com complicação (DCC) e 26 pacientes apresentaram a forma de febre hemorrágica da dengue (FHD). Todos os pacientes do grupo controle eram do sexo masculino, com média de 25 anos de

idade, compatível com paciente de morte violenta encontrados na Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE).

Tabela 2 – Dados demográficos de idade e sexo associados aos grupos de formas clínicas de dengue e controle

Distribuição da idade segundo sexo e grupos				
	Genero		Idade (anos)	
	Nº	%	Média	Desvio Padrão
Grupo de Dengue (n=126)				
FHD				
Masculino	15	57,7	39,5	24,9
Feminino	11	45,3	28,5	21,8
DCC				
Masculino	54	54,8	38,0	24,6
Feminino	46	45,2	36,0	22,5
Grupo controle (n=09)				
Masculino	09	100	25	10,4
Feminino	0	0	-	-

Nº = número; % = percentual em relação ao total de observações.

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 3, exibe a frequência dos casos de dengue conforme as faixas etárias: 0 a 15 anos (31 casos, 24,6%), 16 a 29 anos (20 casos, 15,8%), 30 a 59 anos (52 casos, 41,2%) e ≥ 60 anos (23 casos, 18,2%). A faixa etária com maior frequência de casos é a faixa de 30 a 59 anos (41,2%), seguida de 0 a 15 anos (24,6%), ≥ 60 anos (18,2%) e 16 a 29 anos (15,8%).

Tabela 3 – Frequência dos casos segundo faixas etárias

Faixa etária (anos)	0 a 15	16 a 29	30 a 59	≥ 60
Nº de pacientes	31*	20	52	23
% do Total	24,6	15,8	41,2	18,2

*Cinco pacientes com idade < 1 ano.

Fonte: Elaboração própria.

Apesar do sexo feminino ser considerado, por alguns, com maior propensão de formas graves, nenhum estudo mostrou significância estatística (Torres, 2005). A nossa frequência de gênero foi discretamente maior no sexo masculino.

As descrições de dengue na Ásia mostram o acometimento de crianças com idade até 16 anos (Bhamarapravati, 1967; Burke, 1968). A faixa etária difere nas Américas, onde crianças e adultos são afetados nos surtos epidêmicos (Guzman et al., 2003). A maioria dos casos estavam na faixa etária de adulto (30 a 59 anos) perfazendo 41,2% da amostra, seguido justamente pelas crianças (0 a 15 anos). A

maioria dos pacientes (78,2%) apresentou a forma de dengue com complicação (DCC), atualmente incluídos na classificação de dengue grave (MS, 2002).

A Tabela 4 contém a distribuição dos sinais da doença estratificados por ordem de frequência. Cerca de cento e oito pacientes apresentaram febre (89,3%). O desconforto respiratório foi constatado em 77 pacientes (87,5%), o vômito em 74 (80,4%), o rebaixamento do sensório em 61 (75,3%), a tosse em 63 (78,8%), a prostração em 45 (73,8%), a irritabilidade/agitação em 47 (62,7%), a diarreia em 39 (58,2%), a convulsão em 23 (37,1%) e o exantema em 18 (29,0%). Dentre os sinais hemorrágicos, a hematêmese foi a mais frequente, estando presente em 28 casos (43,8%), seguido das petéquias em 27 (41,5%), da equimose em 12 (22,2%), da melena em 11 (20,0%), do hematoma em 8 (16,7%), e por último, o hemoptóico em 5 pacientes (11,1%).

Tabela 4 – Distribuição dos sinais de alerta da doença estratificados por ordem de frequência

Sinais	Nº	Total	%
Gerais			
Febre	108	121	89,3
Desconforto respiratório	77	88	87,5
Vômito	74	92	80,4
Rebaixamento do sensório	61	81	75,3
Tosse	63	80	78,8
Prostração	45	61	73,8
Irritabilidade/agitação	47	75	62,7
Diarreia	39	67	58,2
Convulsão	23	62	37,1
Exantema	18	62	29,0
Hemorrágicos			
Hematêmese	28	64	43,8
Petéquias	27	65	41,5
Equimose	12	54	22,2
Melena	11	55	20,0
Hematoma	08	48	16,7
Hemoptóicos	05	45	11,1

Nº = número; % = percentual em relação ao total de observações.

Fonte: Elaboração própria.

As séries publicadas acerca das epidemias ocorridas em diversos países (Guzman et al., 1984; Zagne et al., 1994; Guzman et al., 1999; Wiwanitkit, 2004; Zhang et al., 2013), relatam a febre como o principal sinal na dengue, com frequência variando de 88 a 100% dos casos; esse achado está de encontro com nossas observações. Outros sinais como vômitos em 81 a 100% dos pacientes, tosse em 90%, diarreia em 13 a 38%, exantema em 13 a 34%, são semelhantes ao nosso estudo. Porém, o desconforto respiratório não está descrito nas séries acima. Também não são bem discriminados os sinais como prostração, rebaixamento do

nível de consciência, irritabilidade, agitação e convulsão. Quanto aos sinais hemorrágicos gerais encontrados variaram de 56 a 100% dos pacientes nas séries de casos, sendo que as petéquias, a hematêmese, a equimose, a melena e o hemoptoico, foram relatados pelos autores acima, exceção feita ao hematoma (Burke, 1968; Nimmannitta, 1987; Guzman, 1987; Wali, 1999; Wiwanitkit, 2004; Sam, 2013; Ahmed-Pakistan, 2013).

Os principais sintomas listados na Tabela 5 foram a dispneia, que foi descrita em 83 pacientes (90,2%), dor abdominal em 72 (77,4%), cefaléia em 58 (72,5%), mialgia em 52 (67,5%), artralgia em 24 (42,9%) e dor retro-orbitária em 18 (30,5%). A dispnéia tem sido pouco relatada na literatura, sendo descrita em frequência de 44% dos pacientes em série de casos da Malásia, Índia e China (Sam, 2013). Outros artigos que descrevem séries de casos, apontam uma variação de frequência dos sintomas como a dor abdominal como o sintoma mais frequente (38 a 83%), a cefaléia (45 a 85%), a mialgia (44 a 100%), a artralgia (46 a 54%) e a dor retro-orbitária (19 a 41%) (Burke, 1968; Nimmannitta, 1987; Guzman, 1987; Zagne, 1994; Wali, 1999; Wiwanitkit, 2004; Sam, 2013).

Tabela 5 – Distribuição dos sintomas da doença estratificados por ordem de frequência

Sintomas	Nº	Total	%
Dispneia	83	92	90,2
Dor abdominal	72	93	77,4
Cefaleia	58	80	72,5
Mialgia	52	77	67,5
Artralgia	24	56	42,9
Dor retro-orbitária	18	59	30,5

Nº = número; % = percentual em relação ao total de observações.

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 6 contém a frequência das co-morbidades que foram identificadas em um total de 79 pacientes (62,6%), sendo as cardiovasculares as mais prevalentes: hipertensão em vinte e cinco casos (31,6%) e cardiomiopatia dilatada em nove (11,3%). A diabetes vem em sequência, com quinze (18,9%) e as doenças renais com sete (8,8%). As doenças respiratórias foram representadas pelo enfisema com cinco casos (8,2%) e a asma em quatro (6,8%).

Associações entre formas graves da dengue e diversas doenças crônicas como *diabetes mellitus*, asma brônquica, enfisema, anemia, esteatose hepática e cardiopatia, estão descritas na literatura (Bravo et al., 1987; Guzman et al., 2003; Zhang et al., 2013).

Tabela 6 – Distribuição das co-morbidades de acordo com a frequência

VARIÁVEL	Nº	%
Presença de co-morbidades	79	62,6
Hipertensão arterial sistêmica	25	31,6
Cardiomiopatia	9	11,3
Diabetes	13	16,4
Doença renal	7	8,8
Enfisema pulmonar	5	6,3
Asma	4	5,0

Nº = número; % = percentual em relação ao total de observações.

Fonte: Elaboração própria.

Os principais fatores de risco podem ser identificados na Tabela 7. Os mais prevalentes foram o etilismo em trinta e um casos (36,5%), o tabagismo em vinte e nove (34,5%), a obesidade em vinte e um (31,3%) e a gravidez/puerpério em três (3,7).

Tabela 7 – Distribuição da frequência dos fatores de risco

Presença de fatores de risco	Nº	Total	%
Etilismo	31	85	36,5
Tabagismo	29	84	34,5
Obesidade	21	67	31,3
Gravidez/puerpério	3	82	3,7

Nº = número; % = percentual em relação ao total de observações.

Fonte: Elaboração própria.

Como descrito pela Tabela 8, as causas imediatas de óbito foram insuficiência respiratória (52,0%), choque (37,6%), e outras (10,4%). Lumbiganom et al. descrevem como causas imediatas de óbito a insuficiência respiratória, o choque séptico e o choque hipovolêmico em série de óbitos ocorridos em 2010 na Tailândia, dados semelhantes deste estudo (Lumbiganon et al., 2010). Os achados refletem o grave comprometimento do aparelho respiratório na doença, também descrito por Arismendi-Morillo (Arismendi-Morillo, 2011).

Tabela 8 – Frequência da causa imediata de óbito

Causa imediata de óbito	Nº	Total	%
Insuficiência respiratória	65	125	52,0
Choque	47	125	37,6
Outros	13	125	10,4

Nº = número; % = percentual em relação ao total de observações.

Fonte: Elaboração própria.

O extravasamento vascular foi observado em cinquenta e três pacientes de 85 observações nos laudos das autopsias, perfazendo 62% da casuística. O derrame pleural mostrou ser o extravasamento mais frequente, com 56% das observações. A ascite foi descrita em 37% e o derrame pericárdico em 31,5%, e

estão ilustrados na Tabela 9. A maior alteração fisiopatológica, que determina a gravidade do quadro clínico, consiste no extravasamento de plasma, e este é um dos fatores que diferencia a FHD da dengue clássica.

O derrame de água, eletrólitos e proteínas para o espaço intersticial e cavidades decorrem do aumento da permeabilidade vascular generalizada nas formas graves de dengue. A presença da ascite variou de 5,3 a 91,6% e do derrame pleural de 2,8 a 58,3% nas epidemias de Cuba e Porto Rico, respectivamente (Guzman et al., 1999). A frequência desses achados apresenta grande variação na literatura, e nossos valores encontram-se dentro do espectro (Burke, 1968; Guzman, 1987; Wali, 1999; Quijano, 2006; Sam, 2013; Zhang, 2014).

Tabela 9 – Frequência do extravasamento vascular de acordo com sua localização anatômica

Presença de extravasamento vascular	Nº	Total	%
Derrame cavitário	53	85	62,4
Derrame pleural	47	84	56,0
Ascite	30	81	37,0
Derrame pericárdico	23	73	31,5

Nº = número; % = percentual em relação ao total de observações.

Fonte: Elaboração própria.

Podemos visualizar na figura 17, que o grupo DCC exibe número médio de plaquetas de 136.555/ μ L, bem superior ao grupo FHD. O número médio de plaquetas das pessoas do grupo FHD é de 47.157/ μ L, onde existe uma diferença de aproximadamente 89.398/ μ L plaquetas a mais no grupo DCC, com intervalo de 95% de confiança esse número varia entre 28000 e 96500 ($p=0,0001$). O sangramento presente na FHD vem sendo relacionado à ativação das plaquetas ativadas resultando em lesão das células endoteliais (Wiwantkit, 2004).

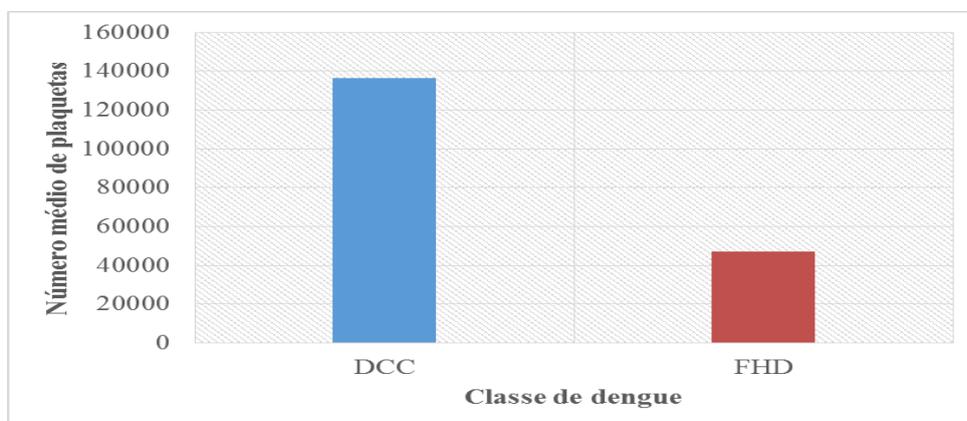


Figura 17 – Número médio por μ L de plaquetas identificadas nos casos de dengue classe DCC e FHD

Fonte: Elaboração própria.

A tabela 10 ilustra algumas estatísticas descritivas das plaquetas, e evidencia que o número de plaquetas na classe de dengue DCC é bem superior ao da classe FHD, como observado na literatura. Lin et al. demonstraram que anticorpos antiplaquetários causam lise de plaquetas na presença de complemento. Esses anticorpos são encontrados em maiores concentrações nos pacientes com FHD/SCD, provavelmente sendo responsável pelo maior grau de trombocitopenia visto nas formas graves da dengue (Lin et al., 2001).

Tabela 10 – Estatísticas descritivas do número de plaquetas nos casos de dengue classe DCC e FHD

Classe dengue	Medidas descritivas				
	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
DCC	136555,510	113836	107000	1000	487000
FHD	47157,692	24607,1	46500	13000	100000

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Análise macroscópica do pulmão

A Tabela 11 exibe as alterações macroscópicas encontradas nos pacientes autopsiados. Os achados macroscópicos mais frequentes foram edema, constatado em cinquenta e três casos (71,8%), congestão, em vinte e quatro (30,2%), e hemorragia, em dezesseis (20,1%); foram menos frequentes as áreas de consolidação pneumônica, em cinco (6,3%), a atelectasia, em três (3,7%), o pulmão de choque, em dois (2,7%), bronquiectasia, em um (1,2%), e enfisema, também em um (1,2%). A hemorragia foi o achado macroscópico pulmonar mais importante na série histórica de 100 autópsias com diagnóstico epidemiológico de Bhamarapatri, que demonstrou a presença de petéquias em vinte e sete casos (27%), e hemorragia parenquimatosa em 10% de sua casuística (Bhamarapatri et al., 1967). Outros acompanharam a descrição anterior da Tailândia, com hemorragias de serosas e de pequena monta no pulmão (Burke, 1968; Basílio et al., 2005; Idirisingle et al., 2013; Aye et al., 2014). A série do SVO-CE teve padrão macroscópico parecido quanto ao número de hemorragias menores, porém alguns casos apontavam macroscopia de franca hemorragia alveolar. A observação do edema na macroscopia foi pouco valorizado nessas séries, somente apontada por dois dos autores acima citados. Já na nossa série, o edema foi apontado como o mais frequente achado a olho nu. Talvez, o peso dos pulmões tenha alertado para

presença do edema. Os achados de consolidação, atelectasia, bronquiectasia e enfisema, não chamaram atenção dos patologistas nas séries da literatura.

Tabela 11 – Frequência de alterações macroscópicas visualizadas durante a autópsia

Alterações macroscópicas pulmonares	Nº	Total 71	% 89,4
Edema	53	71	74,6
Congestão	25	71	35,2
Hemorragia	16	71	20,1
Consolidação pneumônica	5	71	6,3
Atelectasia	3	71	3,7
Bronquiectasia	2	71	2,8
Enfisema	1	71	1,2

Nº = números de casos com o achado presente; Total – número de casos com observação descrita pelo patologista; % = percentual em relação ao total de observações

Fonte: Elaboração própria.

O peso dos pulmões em gramas (g) apresentou uma média de 627,9 (SD - 371,5) na FHD e 446,5 (SD - 349,1) na DCC, Tabela 12. A diferença entre as médias demonstrou ter significância estatística com $p = 0,02$. O parâmetro de pulmões pesados foi observado em necropsias (Burke, 1968), porém a quantificação e a comparação nas formas clínicas de dengue não são registradas na literatura.

Tabela 12 – Peso pulmonar em gramas (g) no grupo de paciente com Dengue

	Peso dos pulmões (g)			
	Média	Desvio Padrão	Valor de p*	Intervalo de confiança 95%
DCC	446,5	349,15	0,0215	27,25 a 335,54
FHD	627,9	371,55		

DCC - Dengue com complicações, FHD - Febre hemorrágica da dengue. *Teste t de Student.

Fonte: Elaboração própria.

As imagens abaixo são realmente impressionantes, com documentação do edema intersticial dos septos interlobulares subpleural, como também com a demonstração do extravasamento vascular subpleural exuberante, formando uma verdadeira coleção loculada de plasma localizada entre o parênquima pulmonar e pleura visceral (Figuras 18 e 19). A Figura 20 exhibe um pulmão hemorrágico.

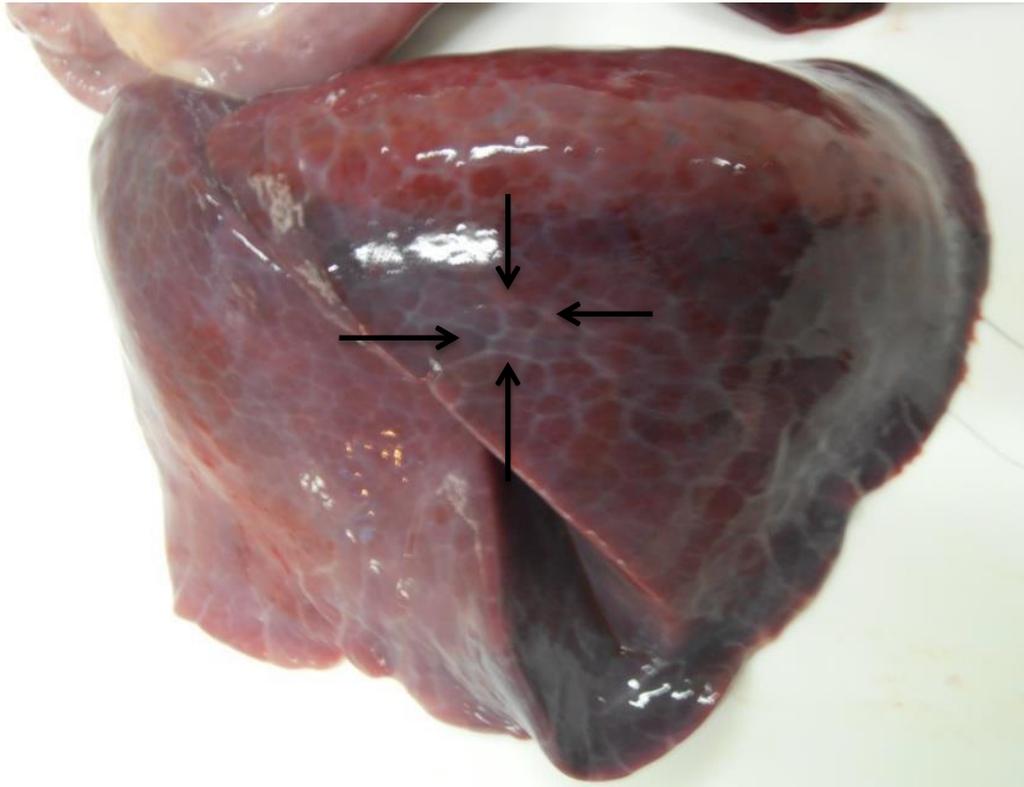


Figura 18 – Pulmão hemorrágico com edema de septos interlobulares visualizado através da pleura visceral translúcida (setas)¹
Fonte: Adaptação autorizada por Deborah Nunes Braga.

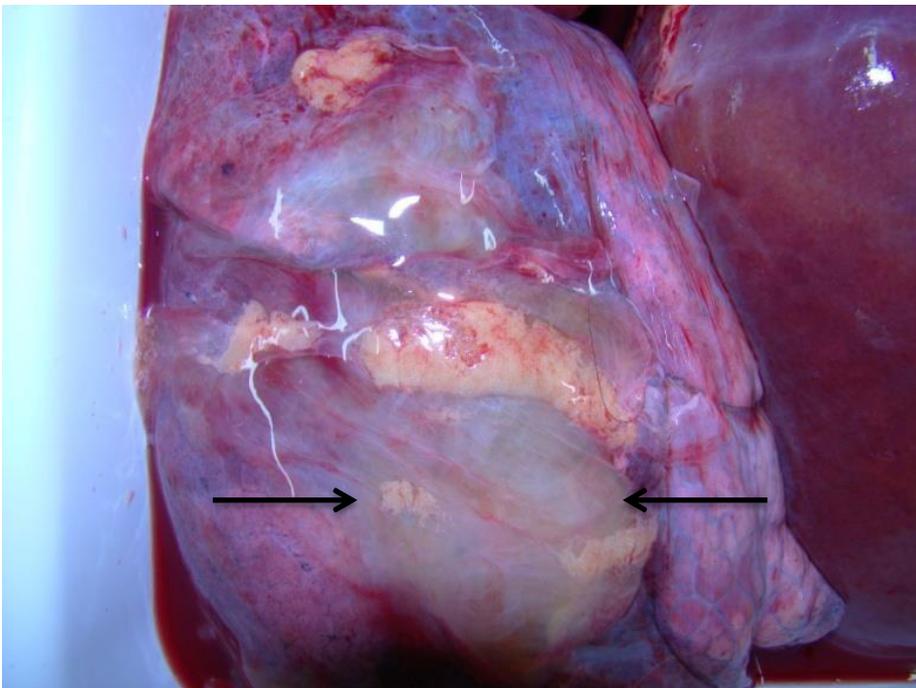


Figura 19 – Pulmão exibindo intenso extravasamento vascular loculado entre a pleura visceral e parênquima (setas)
Fonte: Adaptação autorizada por Deborah Nunes Braga.

¹ Representa exemplo de uma criança autopsiada desta casuística.

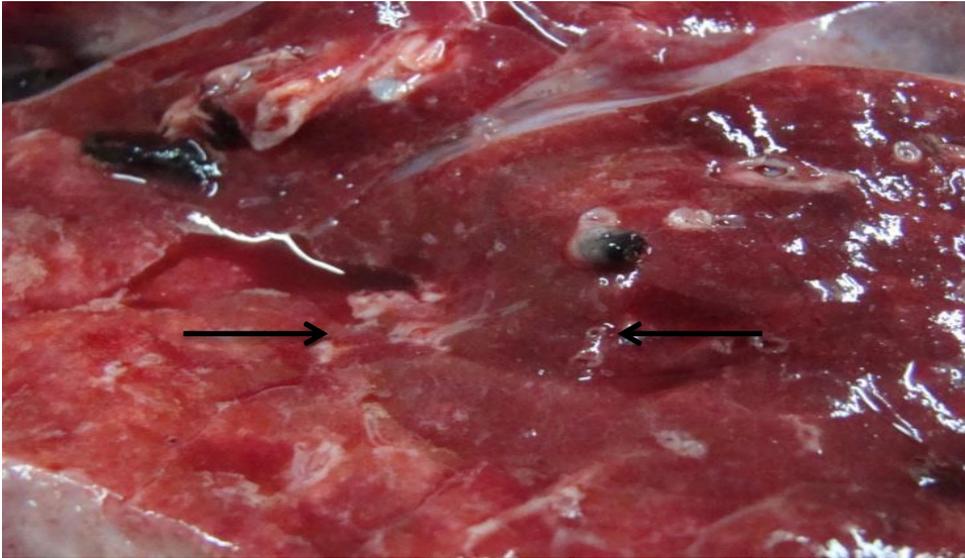


Figura 20 – Superfície de corte pulmonar evidenciando parênquima pulmonar edematoso e hemorrágico

Fonte: Adaptação autorizada por Deborah Nunes Braga.

5.3 Análise microscópica pulmonar

A Tabela 13 descreve as alterações microscópicas nos pulmões dos cento e vinte e seis casos autopsiados. Os principais achados microscópicos foram o edema, identificado em cento e quatorze pacientes (90,4%), a hemorragia em noventa e um (72,2%) e a inflamação crônica em noventa e três (73,8%).

A inflamação crônica mononuclear apresentou-se sob forma de pneumonite intersticial crônica em cinquenta e nove casos (46,8%), e como bronquiolite em trinta e cinco pacientes (27,7%). Porém a bronquiolite nunca foi um critério histopatológico isolado predominante, estando a maioria das vezes associado à pneumonite, ou aos outros achados. A inflamação aguda neutrofílica foi observada em trinta e um pacientes (24,6%), sendo 15 broncopneumonias (11,9%) e 16 bronquiolites mistas (12,6%). A presença de megacariócitos pulmonares (30,1%), o efeito citopático (34,1%) e a hiperplasia de pneumócitos (34,9%) surgiram em razoável porcentagem de casos. A presença de membrana hialina esteve presente em 11,1% dos casos (quatorze) e de trombo arteriolar pulmonar 11,9% (15 casos). A necrose foi associada às formas agudas de broncopneumonia. Os mesmos autores que descreveram a macroscopia em necropsias (Bhamaraprati et al., 1967; Burke, 1968; Basílio et al., 2005; Idirisingle et al., 2013; Aye et al., 2014), tiveram muito mais

interesse na análise microscópica de campo claro. Todos nossos parâmetros acima foram observados, mas o que parece ser diferente é a frequência da broncopneumonia, que foi elevada em nossa casuística. Um fator que pode ter importância na nossa população, é o fato de que, a busca tardia e/ou a dificuldade de atendimento médico-hospitalar favoreceu no caso de infecção secundária instalada.

Tabela 13 – Frequência de alterações histológicas nos pulmões autopsiados

Alterações histológicas	Nº	%
Edema	114	90,4
Hemorragia	91	72,2
Inflamação crônica	93	73,8
<i>Pneumonite intersticial crônica</i>	59	46,8
<i>Bronquiolite crônica</i>	35	27,7
Inflamação aguda	31	24,6
Broncopneumonia	15	11,9
Bronquiolite crônica exsudativa	16	12,6
Presença de Megacariócito	38	30,1
Efeito citopático	43	34,1
Hiperplasia de pneumócito	44	34,9
Trombo em arteríola pulmonar	15	11,9
Membrana hialina	14	11,1
Necrose	09	7,1

Nº = números de casos com o achado presente, % = porcentagem em relação ao total de casos

Fonte: Elaboração própria.

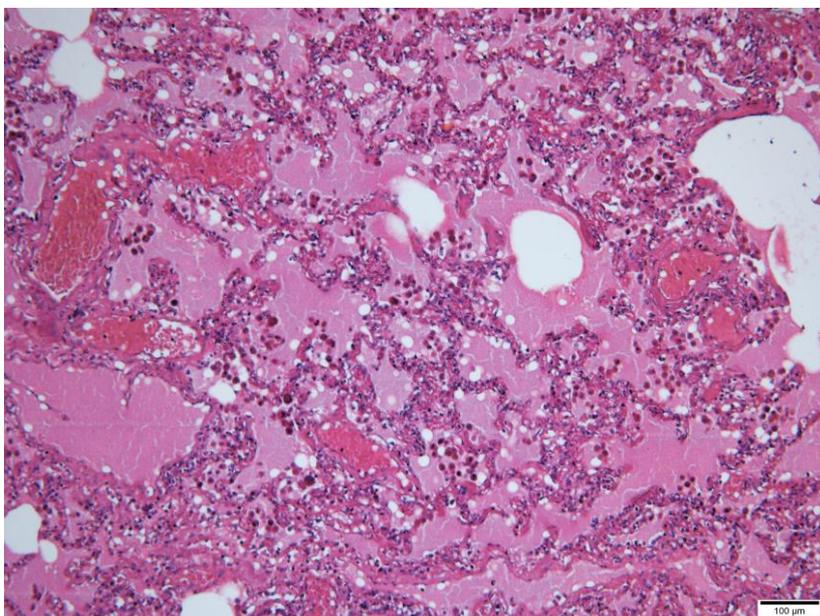


Figura 21 – Edema alveolar (HE, 200x)

Fonte: Arquivos da pesquisa.

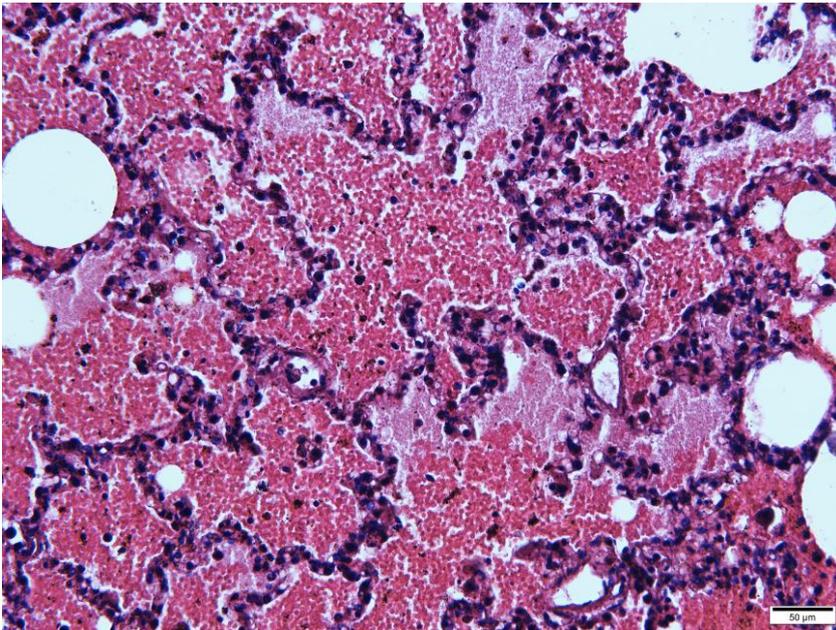


Figura 22 – Hemorragia alveolar (HE, 400x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

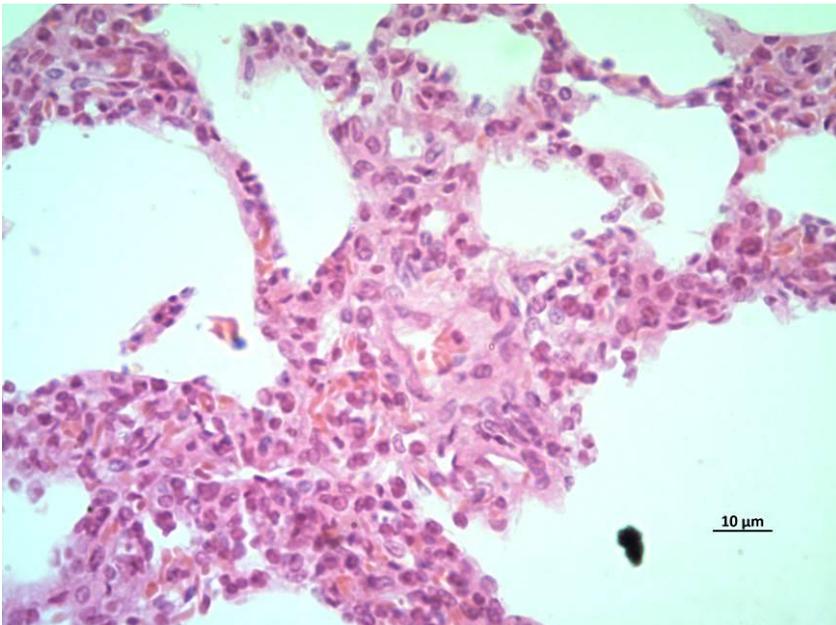


Figura 23 – Pneumonite intersticial crônica (HE, 200x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

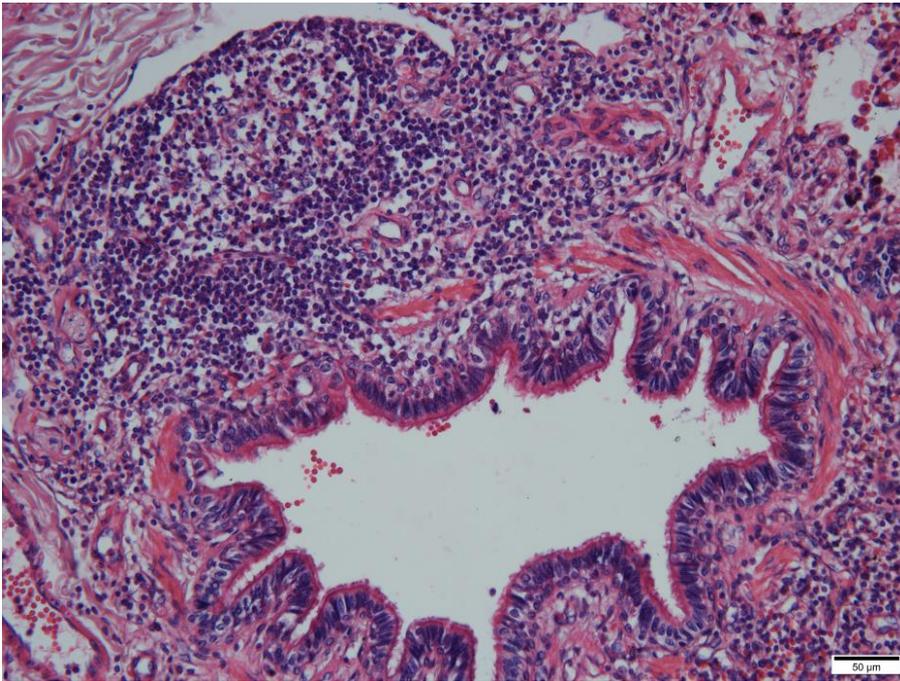


Figura 24 – Bronquiolite crônica (HE, 200x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

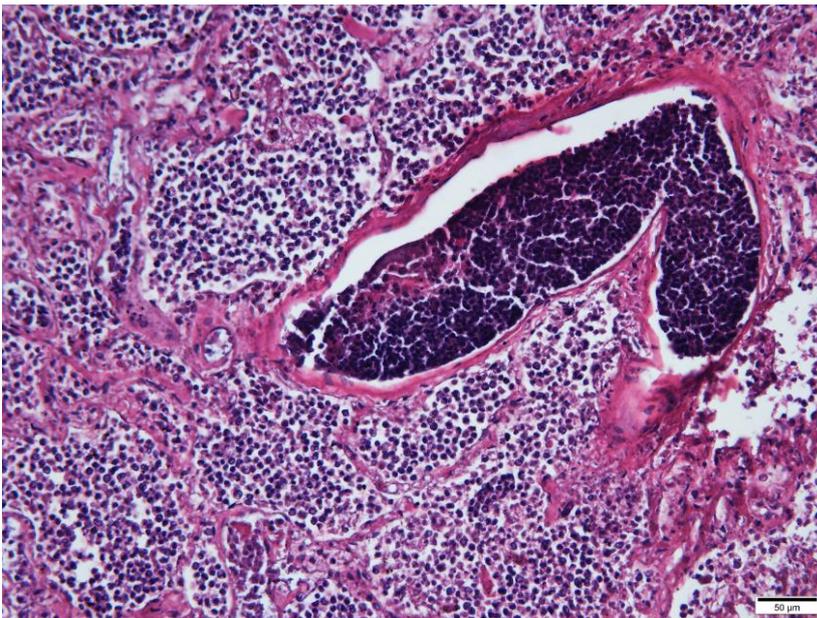


Figura 25 – Broncopneumonia (HE, 200x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

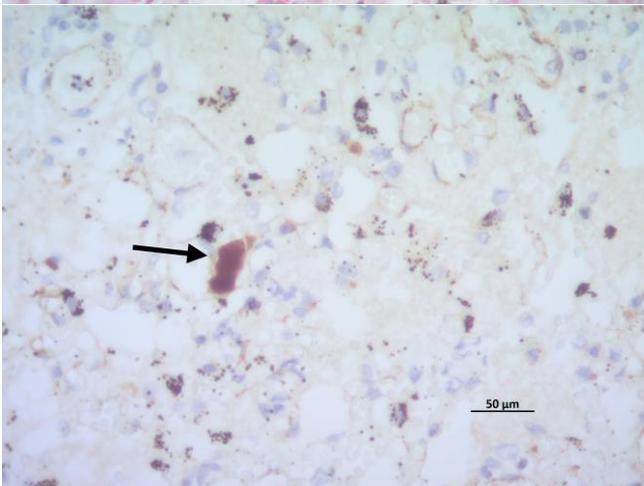
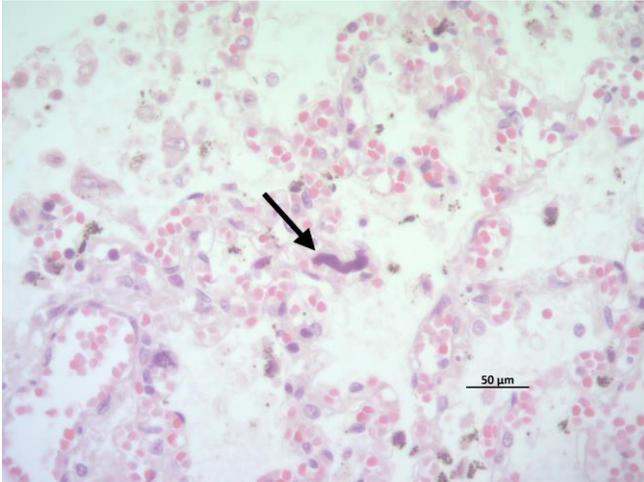


Figura 26 – A. Megacariócitos no leito vascular (HE, 400x). B. Imuno- expressão do Anticorpo anti-fator VIII em Megacariócitos (HE, 630x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

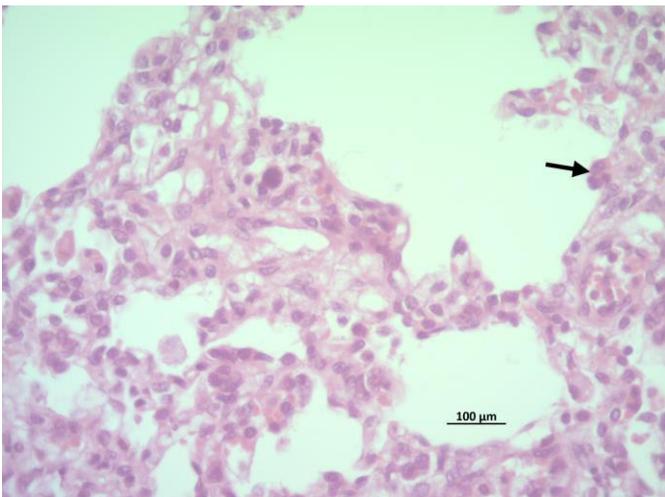


Figura 27 – Efeito citopático (HE, 400x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

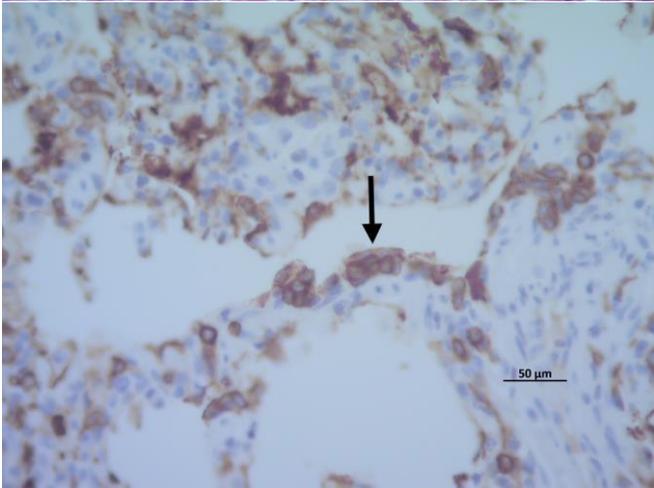
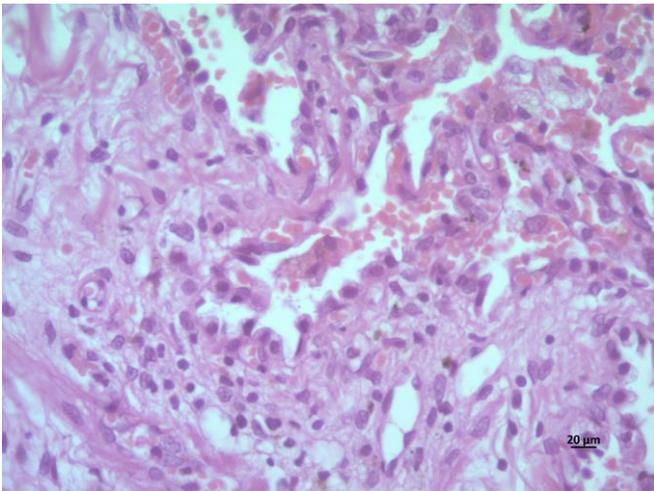


Figura 28 – Hiperplasia Pneumócito II (HE, 400x). Imuno-expressão do Anticorpo citoqueratina (AE1/AE3, 400x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

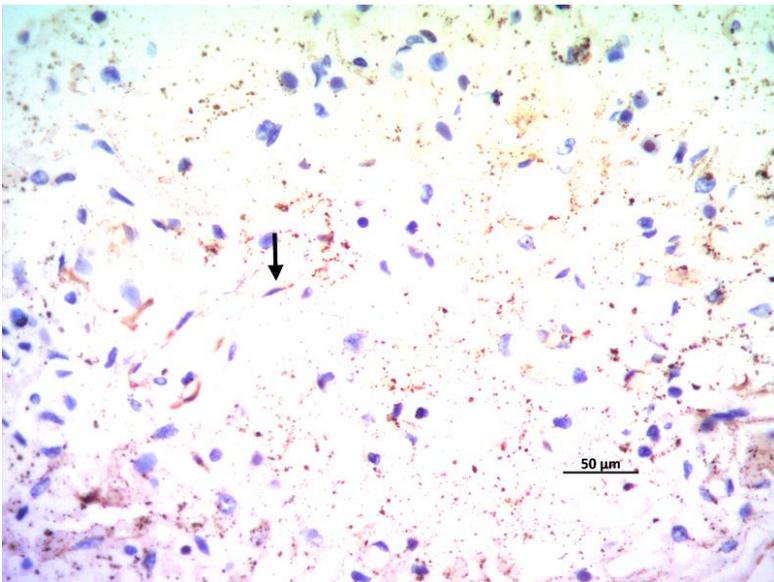


Figura 29 – Miofibroblasto (α actina de músculo liso, 400x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

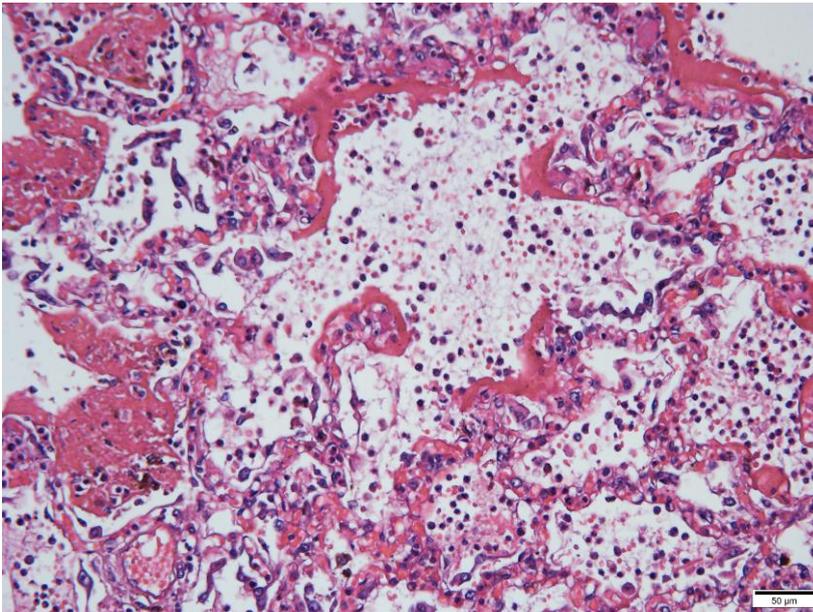


Figura 30 – Membrana hialina com necrose de pneumócitos (HE, 400x)

Fonte: Arquivos da pesquisa.

5.4 Avaliação histomorfométrica do pulmão para a quantificação do edema e da hemorragia em formas clínicas de dengue e grupo controle

A mediana da fração de área total de edema presente nos alvéolos dos 126 casos de dengue foi de 0,445 de edema alveolar/ μm^2 (Min - 0,02 e Max - 0,974), sendo a mediana do edema dos controles de 0,040 (Min - 0,017 e Max - 0,091), (Tabela 14). Já a fração de área total de hemorragia no interior dos alvéolos foi de 0,107 hemácias alveolares/ μm^2 (Min - 0,012 e Max - 0,904), sendo a mediana da hemorragia dos controles de 0,035 (Min - 0,016 e Max - 0,08).

Tabela 14 – Quantificação morfométrica do Edema e da hemorragia alveolares nos grupos de Dengue e grupo controle

Morfometria do Edema e Hemorragia alveolares			
	Mediana	Mínimo	Máximo
Formas de Dengue			
Fração de área do Edema alveolar (Edema alveolar/ μm^2)	0,445	0,020	0,974
Fração de área da Hemorragia alveolar (Hemácias alveolares/ μm^2)	0,107	0,012	0,904
Grupo controle			
Fração de área do Edema alveolar (Edema alveolar/ μm^2)	0,040	0,017	0,091
Fração de área da Hemorragia alveolar (Hemácias alveolares/ μm^2)	0,035	0,016	0,080

Fonte: Elaboração própria.

A mediana da fração de área do edema alveolar por μm^2 (Figura 31) nos 100 casos de DCC foi de 0,430, nos 26 casos de FHD foi 0,470 e nos 9 controles foi 0,040, configurando uma diferença significativa da DCC em relação ao grupo controle, da FHD em relação ao grupo controle ($p= 0,006$ e $p=0,003$, respectivamente). Porém, não foi observada diferença significativa entre os grupos de dengue entre si ($p=0,826$).

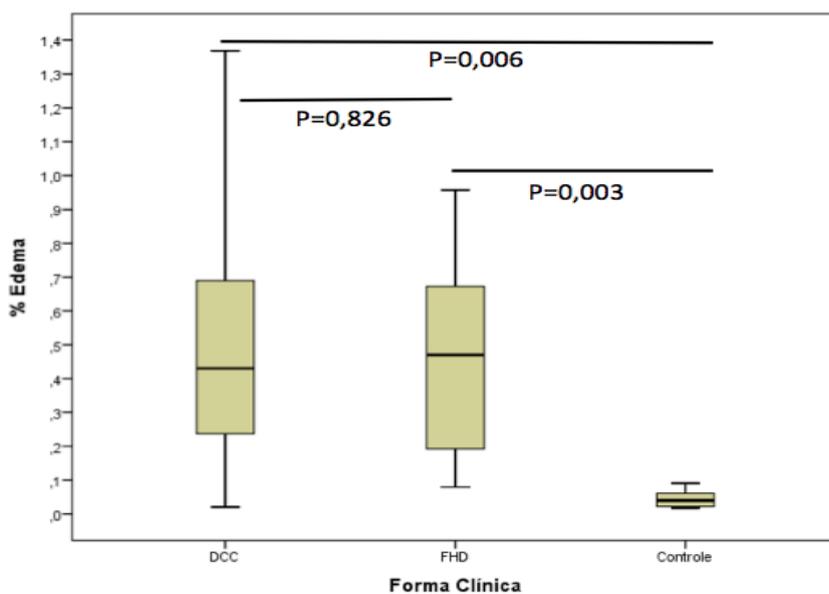


Figura 31 – Associação da Fração de área da Edema alveolar com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles

Fonte: Elaboração própria.

A mediana da fração de área de hemácia/ μm^2 (Figura 32) apresentou o mesmo comportamento, com seu valor de 0,099 na DCC, 0,133 na FHD e 0,035 no controle. Da mesma forma, foi observado uma diferença significativa da DCC em relação ao grupo controle ($p=0,006$), da FHD em relação ao grupo controle ($p=0,003$). No entanto, não foi demonstrado diferença significativa entre os grupos de dengue entre si ($p=0,509$).

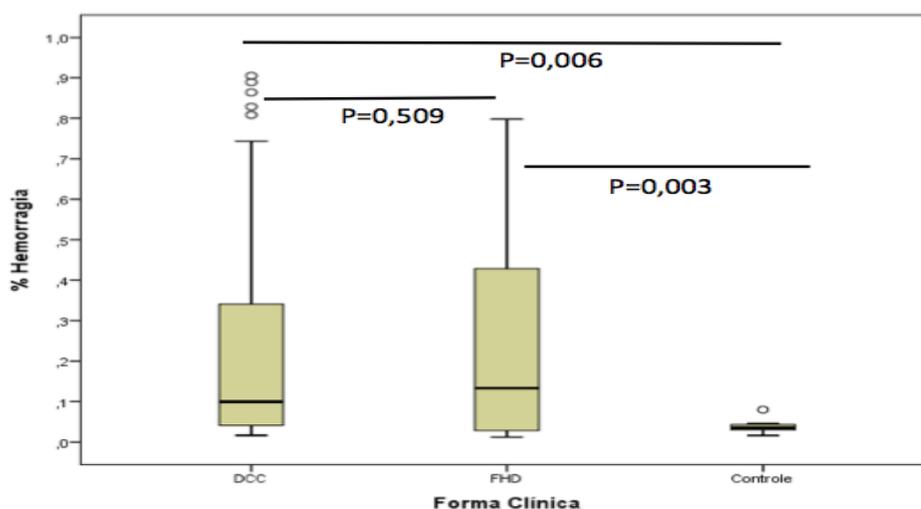


Figura 32 – Associação da Fração de área da Hemorragia/edema alveolares com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles

Fonte: Elaboração própria.

O edema e a hemorragia nos grupos DCC e FHD são muito semelhantes entre si, e foram significativamente mais presentes do que o grupo controle, dando suporte a nova classificação de dengue grave que levam em conta os critérios de extravasamento de plasma, a hemorragia grave e o envolvimento intenso de órgãos vitais (WHO, 2009). A descrição microscópica do edema e da hemorragia foram observados na literatura desde estudos das epidemias da década de 1960 até recentemente (Bhamarapatti, 1967; Burke, 1968; Idirisingle, 2013; Basilio-Oliveira, 2005; Póvoa, 2014; Aye, 2014), porém sem análise quantitativa. A frequência do edema em nossa casuística foi de 90,4% e da hemorragia de 72,2%, e Idirisingle documentou uma frequência bem menor desses parâmetros de 35 a 77%, respectivamente (Idirisingle, 2013). Até onde sabemos, não existem estudos morfométricos da hemorragia e do edema na literatura.

5.5 Classificação dos padrões histopatológicos pulmonares encontrados na infecção pelo DENV

Os padrões histopatológicos pulmonares observados nesta casuística encontram-se descritos na Tabela 15. O padrão mais frequente foi o que continha edema associado à hemorragia (33,3%), seguido da pneumonite intersticial crônica (24,6%). O edema isolado ocorreu em 13,4%. A presença de infecção secundária

representada por quadros de broncopneumonia foi da ordem de 18,9%. A agressão pulmonar aguda preenchendo os critérios de dano alveolar difuso esteve presente em 13,3% dos casos, e identificamos um caso de pneumonia em organização fibrinosa aguda (0,79%). Em três casos (2,38%), foram observadas alterações histopatológicas de uma doença pulmonar crônica prévia à infecção pelo DENV, sendo dois enfisemas e uma pneumonia intersticial pulmonar fibrosante em fase de faveolamento, cuja causa imediata da morte atribuída nesses casos à hemorragia do trato digestório, adrenal e meningoencefalite. Alguns autores documentaram que o comprometimento pulmonar foi encontrado na maioria dos seus casos, e Arismendi-Morillo relatou que todos os casos apresentavam doença pulmonar extensa (Arismendi-Morillo, 2011; Guzman, 1999). Porém, foi num artigo de revisão que Wiwanitkit compilou as formas de apresentações clínicas pulmonares na infecção pelo DENV. As formas de apresentação foram hemorragia pulmonar, edema pulmonar, derrame pleural, pneumonia, e síndrome da angústia respiratória aguda (Wiwanitkit, 2015).

Devido ao número limitado de casos nas séries publicadas, não havia tido uma classificação tão pormenorizada, nem lançando mão da imuno-histoquímica para auxílio no melhor entendimento das alterações histopatológicas pulmonares. A citoqueratina auxiliou na interpretação do colapso da luz alveolar, identificando epitélio alveolar superposto. Os miofibroblastos expressando α - Actina músculo liso, quanto presente, permitiu classificação do dano alveolar difuso em fase fibroproliferativa. A frequência de cada um dos padrões contribui para o entendimento dos tipos de agressão que o parênquima pulmonar pode sofrer na infecção pelo vírus da dengue.

Tabela 15 – Classificação dos padrões histopatológicos pulmonares encontrados na infecção pelo DENV

Padrões histopatológicos pulmonares	Nº	%
Padrão de Hemorragia e Edema alveolares associados	42	33,3
Padrão de Edema alveolar	17	13,4
Padrão de Pneumonite intersticial crônica	31	24,6
Padrão de Broncopneumonia	15	18,9
Padrão de Lesão pulmonar aguda (Geral)	18	14,2
Dano Alveolar Difuso		
Lesão pulmonar aguda	5	3,9
Dano alveolar difuso exsudativo	2	1,5
Dano alveolar difuso fibroproliferativo	10	7,9
Pneumonia em organização fibrinosa aguda	1	0,79
Padrão da doença pulmonar crônica prévia	3	2,38

Nº = números de casos com o padrão histopatológico, % = porcentagem em relação ao total de casos.

Fonte: Elaboração própria.

As figuras 33, 34, 35, 36 e 37 são ilustrações dos padrões histopatológicos descritos na Tabela 15.

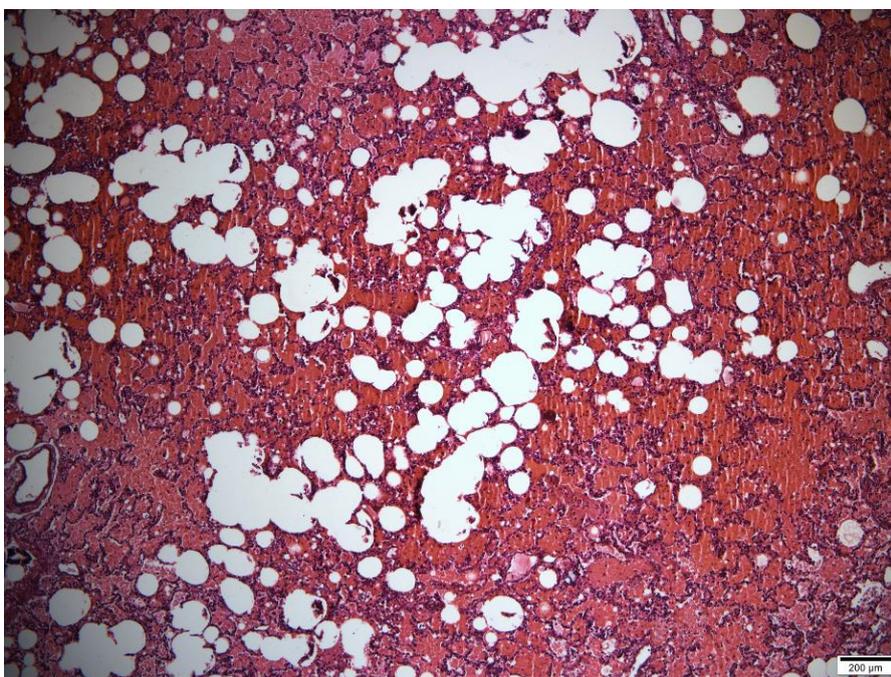


Figura 33 – Padrão Hemorragia/ Edema (HE, 50x)

Fonte: Arquivos da pesquisa.

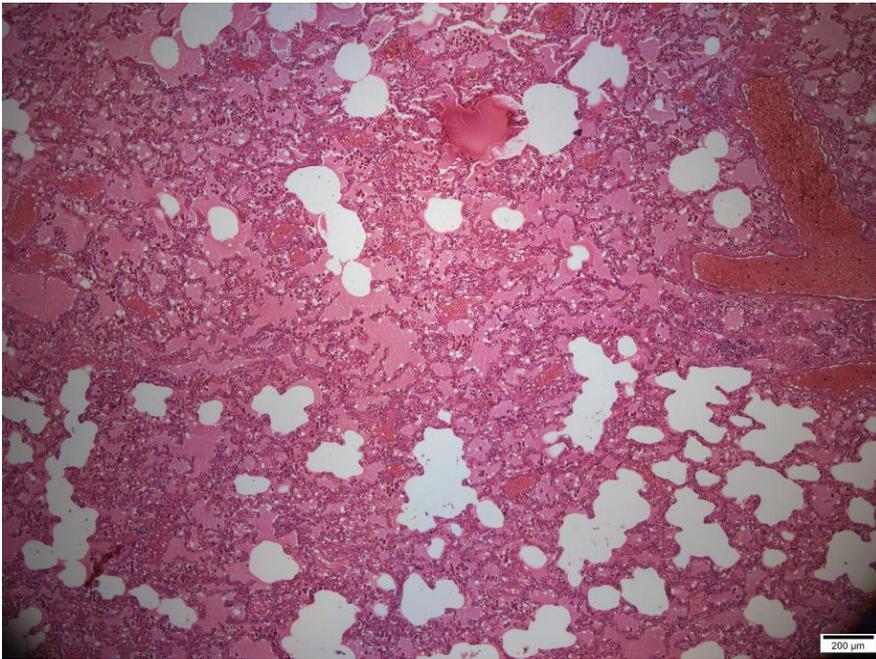


Figura 34 – Padrão edema alveolar (HE, 50x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

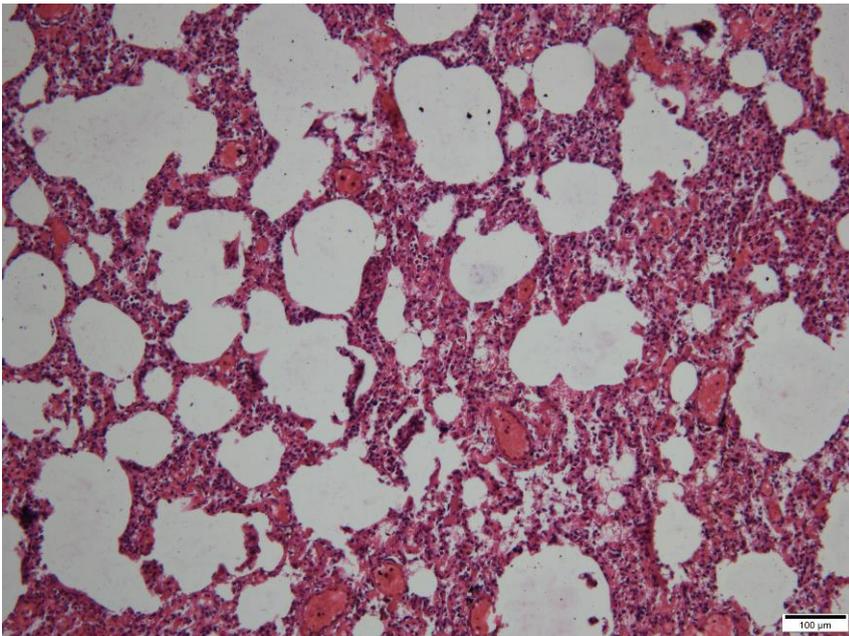


Figura 35 – Padrão Pneumonite intersticial crônica (HE, 100x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

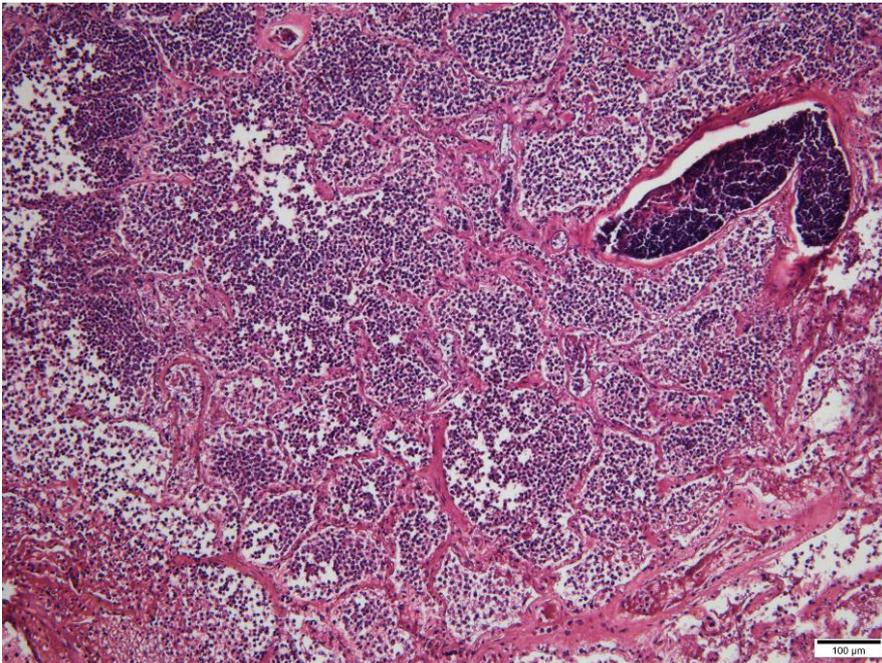


Figura 36 – Padrão Broncopneumonia (HE, 100x)
Fonte: Arquivos da pesquisa.

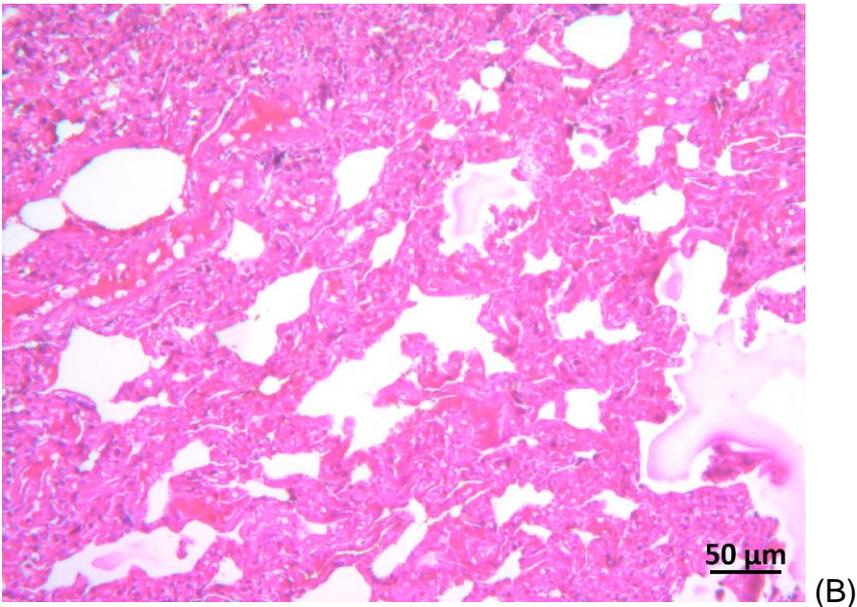
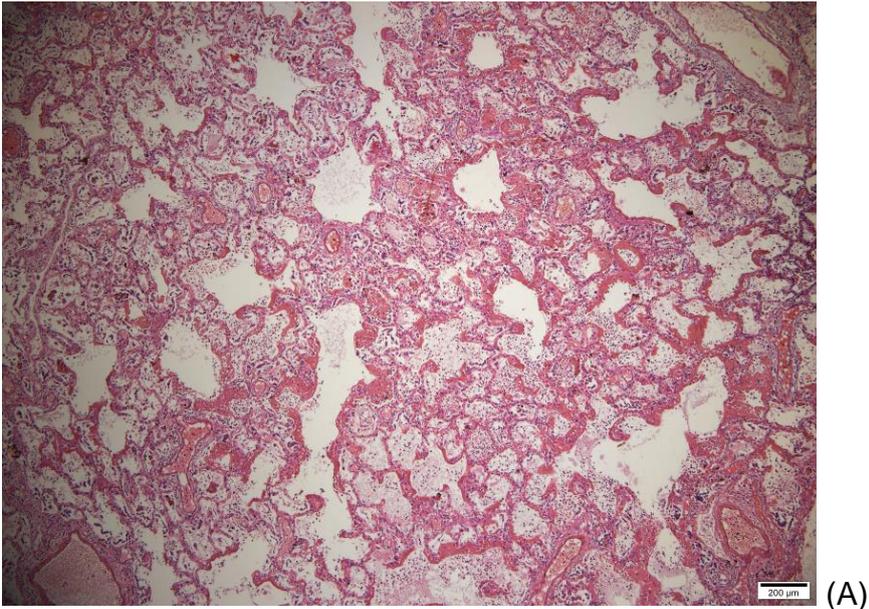


Figura 37 – Padrão dano alveolar difuso exsudativo com membrana hialina (A - HE, 50x); Padrão Dano Alveolar Fibroproliferativo (B - HE, 200x)

Fonte: Arquivos da pesquisa.

A frequência dos padrões histopatológicos nas diversas faixas etárias encontra-se descrita na Tabela 16. Observou-se que na faixa etária de 0 a 15 anos, a pneumonite foi em maior número de casos (64,5%), enquanto a broncopneumonia e o dano alveolar difuso em geral apresentaram maior incidência na faixa de 15 a 29 anos (21% e 31,4%, respectivamente). A hemorragia e o edema estiveram presentes em todas as faixas etárias, porém com menor frequência na faixa de 0 a 15 anos (9,6% de hemorragia e 3,2% de edema).

Tabela 16 – Frequência dos padrões histopatológicos conforme as faixas etárias

Padrão Histopatológico	0 a 15 anos	%	16 a 29 anos	%	30 a 59 anos	%	≥ 60 anos	%
Pneumonite	20	64,5	0	0	11	21,1	0	0
Broncopneumonia	4	12,9	4	21,0	3	7,6	3	13,0
Hemorragia/Edema	3	9,6	9	47,3	10	38,4	10	43,4
Edema	1	3,2	1	5,2	4	21,1	4	17,3
LPA	0	0	4	21,0	2	0	2	8,6
DAD Exsudativo	1	3,2	1	5,2	0	0	0	0
DAD Proliferativo	1	3,2	1	5,2	2	9,6	2	8,6
FOPA	1	3,2	0	0	0	0	0	0
Doença pulmonar prévia	0	0	0	0	1	1,9	2	8,6
Total	31		20		51		23	

LPA = Lesão Pulmonar Aguda, DAD = dano alveolar difuso e POFA = Pneumonia em organização fibrinosa aguda.

Fonte: Elaboração própria.

Em sequência, descreveremos a frequência dos padrões histopatológicos de acordo com as células inflamatórias (CD4+, CD8+, CD68, mastócitos), com a apoptose de células mononucleares septais e com a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células endoteliais.

A Figura 38 ilustra a imunomarcagem do linfócito T CD4+ (seta).

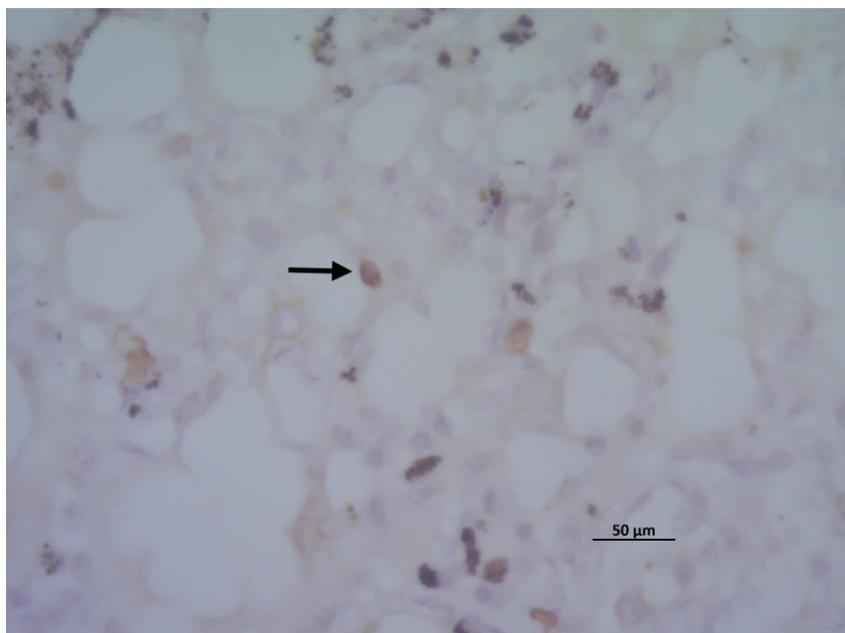
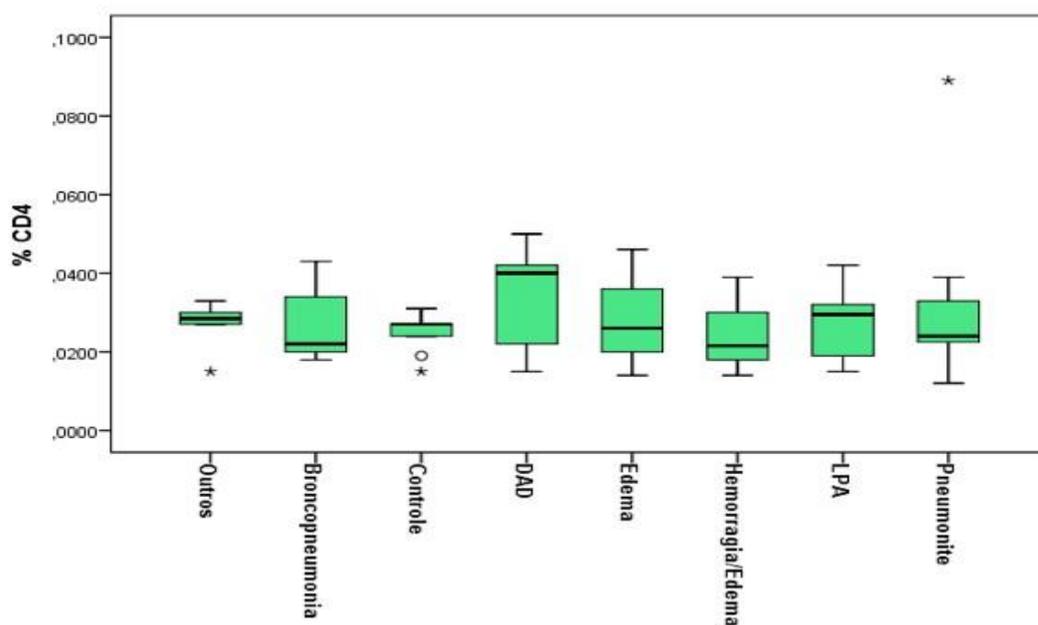


Figura 38 – Linfócito T CD4+ em septo alveolar (400x)

Fonte: Arquivo da pesquisa.

A mediana da fração de área dos linfócitos T CD4+ associada aos diversos padrões histopatológicos está ilustrada na Figura 39 e Tabela 17 . O padrão que apresentou maior expressão foi dano alveolar difuso ($0.033 \text{ célula}/\mu\text{m}^2$), seguido de doença pulmonar aguda ($0.030 \text{ célula}/\mu\text{m}^2$), doença pulmonar prévia ($0.029 \text{ célula}/\mu\text{m}^2$).

μm^2), edema (0.026 célula/ μm^2), pneumonite (0.024 célula/ μm^2), broncopneumonia (0.022 célula/ μm^2), e hemorragia/edema (0.022 célula/ μm^2).



DAD = Dano alveolar difuso, LPA = Lesão pulmonar aguda, Outros = Padrão da doença de base anterior a infecção por dengue.

Figura 39 – Associação da Fração de área da imuno-expressão de linfócitos T CD4+ com padrões histopatológicos

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 17 – Estatística descritiva da fração de área das Células T CD4+ nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle

PADRÃO HISTOPATOLÓGICO	Fração de área da Célula T CD4				
	Mediana célula/ μm^2	Mínimo célula/ μm^2	Máximo célula/ μm^2	Média célula/ μm^2	Desvio Padrão
Edema/Hemorragia alveolar	0.022	0.014	0.520	0.036	0.079
Edema alveolar	0.026	0.014	0.046	0.028	0.010
Pneumonite	0.024	0.012	0.571	0.046	0.098
Broncopneumonia	0.022	0.018	0.043	0.027	0.008
Lesão pulmonar aguda	0.030	0.015	0.042	0.028	0.010
Dano alveolar difuso	0.033	0.015	0.050	0.031	0.013
Doença de base	0.029	0.028	0.030	0.029	0.001
Controle	0.027	0.015	0.031	0.025	0.005

Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 40, observamos a imuno-expressão do linfócito T CD8+ (seta).

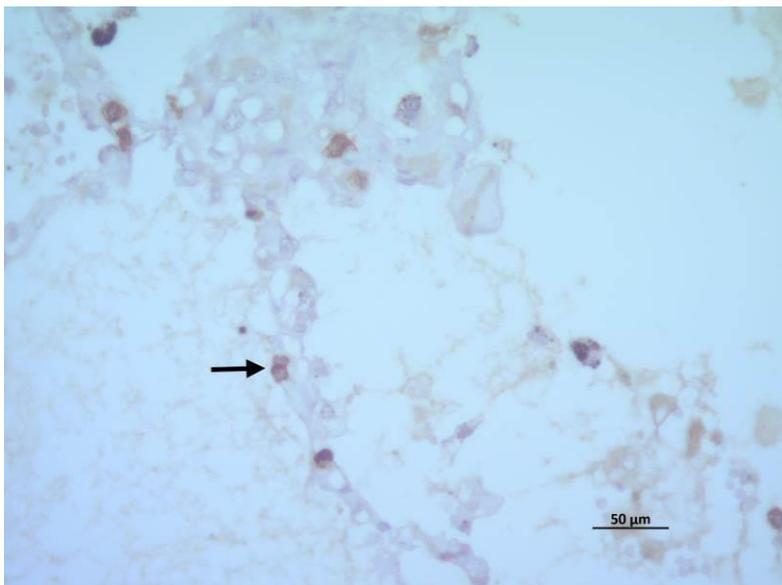
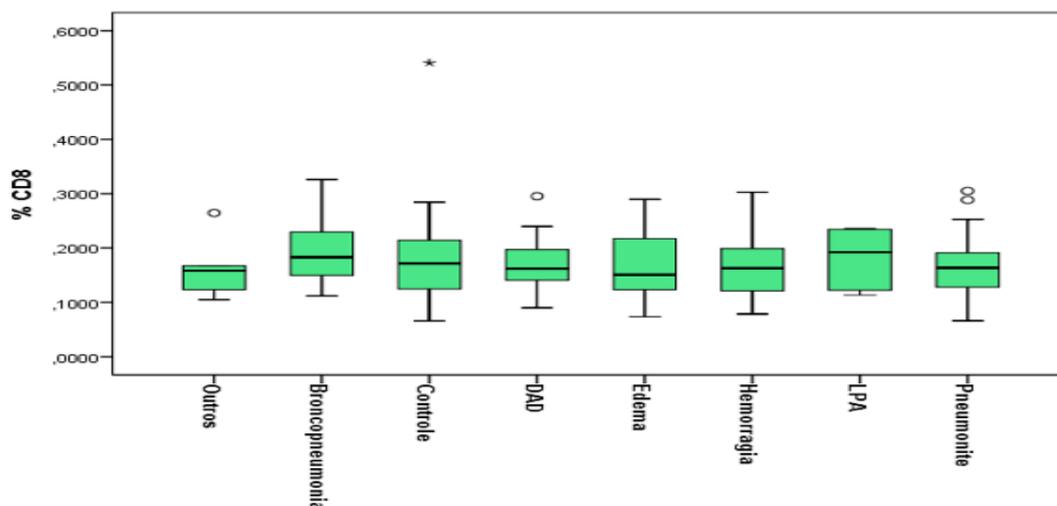


Figura 40 – Linfócito T CD8+ em septo alveolar (400x).
Fonte: Arquivo da pesquisa.

A mediana da fração de área dos linfócitos T CD8+ nos diversos padrões histopatológicos mostrou um valor mais elevado na lesão pulmonar aguda (0.192 célula/ μm^2), seguida da broncopneumonia (0.183 célula/ μm^2), pneumonite (0.163 célula/ μm^2), hemorragia/ edema (0.163 célula/ μm^2), dano alveolar difuso (0.162 célula/ μm^2), edema isolado (0.151 célula/ μm^2), e doença pulmonar prévia (0.123 célula/ μm^2), Figura 41 e Tabela 18.



DAD = Dano alveolar difuso, LPA = Lesão pulmonar aguda, Outros = Padrão da doença de base anterior a infecção por dengue.

Figura 41 – Associação da Fração de área da imuno-expressão de linfócitos T CD8+ com padrões histopatológicos

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 18 – Estatística descritiva da fração de área das Células T CD8+ nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle

Fração de área da Célula T CD8					
PADRÃO HISTOPATOLÓGICO	Mediana célula/ μm^2	Mínimo célula/ μm^2	Máximo célula/ μm^2	Média célula/ μm^2	Desvio Padrão
Edema/Hemorragia alveolar	0.163	0.078	0.303	0.171	0.056
Edema alveolar	0.151	0.074	0.289	0.166	0.061
Pneumonite	0.163	0.066	0.305	0.168	0.056
Broncopneumonia	0.183	0.112	0.326	0.195	0.064
Lesão pulmonar aguda	0.192	0.113	0.236	0.182	0.053
Dano alveolar difuso	0.162	0.090	0.295	0.176	0.059
Doença de base	0.123	0.105	0.161	0.130	0.029
Controle	0.172	0.066	0.541	0.207	0.141

Fonte: Elaboração própria.

Em infecções primárias experimentais em camundongos, as células CD4+ específicas de dengue são reduzidas. No entanto, na infecção secundária há um aumento da resposta de células CD4+, independente do sorotipo envolvido (Beaumier et al., 2009). Durante as infecções primárias e secundárias do vírus da dengue em humanos, as células T específicas ativadas são detectadas na circulação de casos de FHD em frequências maiores que na FD (Screaton *et al.*, 2015; Sittisombut et al., 2017). Estudos de linfócitos do sangue periférico de crianças portadoras de FHD mostram que os mesmos estão reduzidos, em comparação com pacientes com DF (Green et al., 1999), sugerindo que a apoptose de células T reduz a depuração viral, e conseqüentemente, resulta em resposta antiviral comprometida, levando a quadros clínicos mais graves (Screaton et al., 2015).

Os achados do nosso estudo indicam que, independente do padrão histopatológico pulmonar, a quantidade das células CD4+ e CD8+ são semelhantes, e sugerem que elas participam em todas as formas de apresentações histopatológicas.

A imuno-expressão do macrófago CD68 (seta) pode ser observada em espaço alveolar e septal (Figura 42).

A mediana da fração de área macrófago CD68, Figura 43 e Tabela 19, apresenta a seguinte sequência descendente nos padrões histopatológicos pulmonares: broncopneumonia (0.251 célula/ μm^2), pneumonite (0.241 célula/ μm^2), dano alveolar difuso (0.230 célula/ μm^2), edema isolado (0.222 célula/ μm^2), hemorragia/ edema (0.190 célula/ μm^2), lesão pulmonar aguda (0.189 célula/ μm^2) e doença pulmonar prévia (0.126 célula/ μm^2). A maior densidade de macrófagos descrito na literatura está concordante com nossos achados nos diversos padrões histopatológicos, estando mais intenso nos quadros de broncopneumonia e de pneumonite (Bhamarapravati et al., 1967; Burke, 1968; Póvoa et al., 2014).

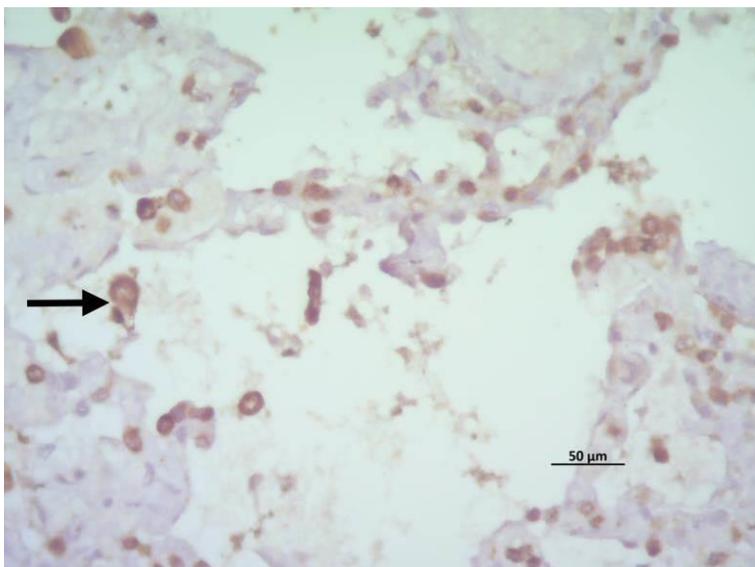
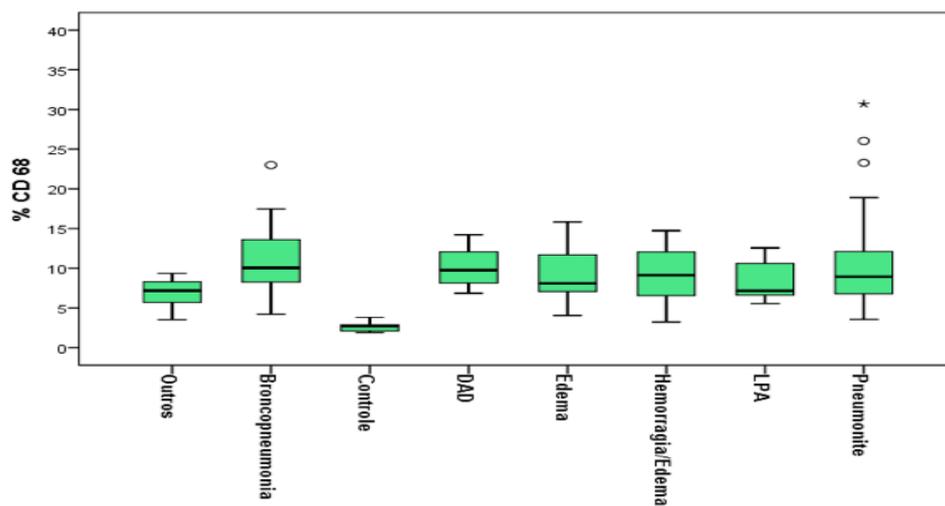


Figura 42 – Macrófago CD68 no lúmen alveolar (400x)
Fonte: Arquivo da pesquisa.



DAD = Dano alveolar difuso, LPA = Lesão pulmonar aguda, Outros = Padrão da doença de base anterior a infecção por dengue

Figura 43 – Associação da fração de área da imuno-expressão de macrófagos CD68 com padrões histopatológicos

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 44 exhibe a imunomarcagem de mastócito em septo alveolar:

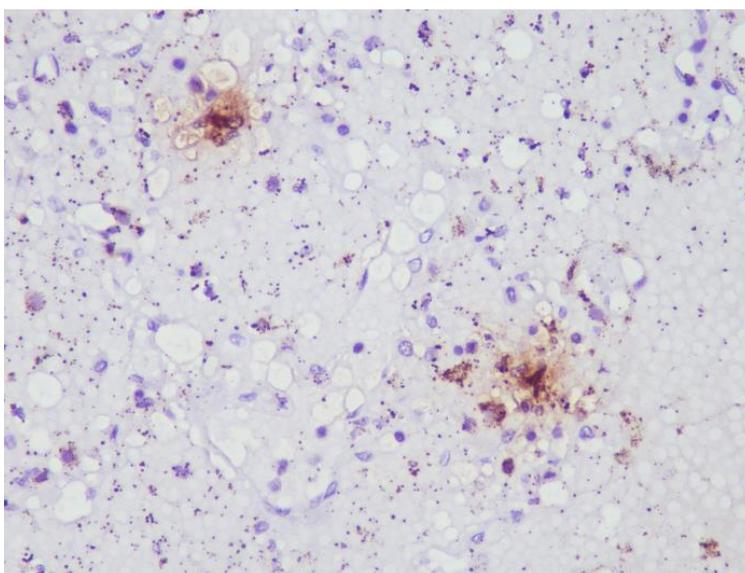


Figura 44 – Mastócitos no septo alveolar (400x)

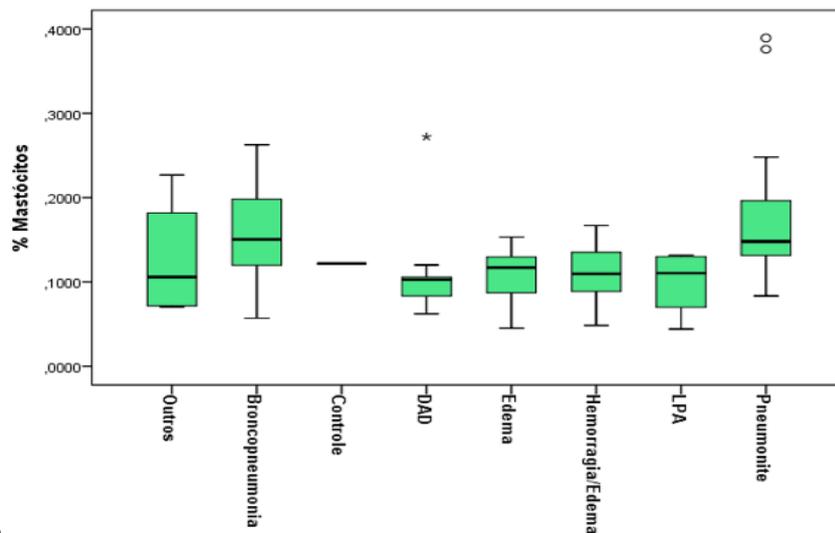
Fonte: Arquivo da pesquisa.

Tabela 19 – Estatística descritiva da fração de área das Células T CD68 nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle

Fração de área da Célula T CD68					
PADRÃO HISTOPATOLÓGICO	Mediana célula/ μm^2	Mínimo célula/ μm^2	Máximo célula/ μm^2	Média célula/ μm^2	Desvio Padrão
Edema/Hemorragia alveolar	0.190	0.093	0.552	0.225	0.101
Edema alveolar	0.222	0.090	0.446	0.220	0.083
Pneumonite	0.241	0.096	1.132	0.329	0.263
Broncopneumonia	0.251	0.095	0.523	0.266	0.139
Lesão pulmonar aguda	0.189	0.121	0.411	0.227	0.118
Dano alveolar difuso	0.230	0.130	0.440	0.255	0.096
Doença de base	0.126	0.104	0.193	0.141	0.047
Controle	0.063	0.035	0.152	0.070	0.034

Fonte: Elaboração própria.

A mediana da fração de área dos mastócitos nos diversos padrões histopatológicos foi superior na broncopneumonia (0.150 célula/ μm^2), sendo os valores decrescentes na pneumonite (0.148 célula/ μm^2), edema isolado (0.117 célula/ μm^2), lesão pulmonar aguda (0.110 célula/ μm^2), hemorragia/ edema (0.106 célula/ μm^2), dano alveolar difuso (0.105 célula/ μm^2) e doença pulmonar prévia (0.072 célula/ μm^2), Figura 45 e Tabela 20. Barreto et al. (2007) demonstrou em estudo experimental, um aumento significativo na densidade de mastócitos no espaço peribronquiolar e áreas adjacentes aos septos interalveolares quando comparado aos controles. Nosso estudo identificou maior aumento do mastócito nos padrões histopatológicos com processos inflamatórios, como a broncopneumonia e a pneumonite.



D Doença de base anterior a infecção por dengue.

Figura 45 – Associação da Fração de área da imuno-expressão de Mastócitos com Padrões histopatológicos

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 20 – Estatística descritiva da fração de área de mastócitos nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle

PADRÃO HISTOPATOLÓGICO	Fração de área do Mastócito				
	Mediana célula/ μm^2	Mínimo célula/ μm^2	Máximo célula/ μm^2	Média célula/ μm^2	Desvio Padrão
Edema/Hemorragia alveolar	0.106	0.048	0.167	0.108	0.033
Edema alveolar	0.117	0.045	0.153	0.109	0.031
Pneumonite	0.148	0.083	0.389	0.174	0.070
Broncopneumonia	0.150	0.057	0.263	0.153	0.056
Lesão pulmonar aguda	0.110	0.044	0.132	0.099	0.036
Dano alveolar difuso	0.105	0.062	0.272	0.129	0.062
Doença de base	0.072	0.070	0.072	0.071	0.001
Controle	0.057	0.044	0.088	0.063	0.016

Fonte: Elaboração própria.

A apoptose foi demonstrada através da detecção *in situ* por marcação de extremidades de dUTP mediada por um TdT (TUNEL) (Figura 46).

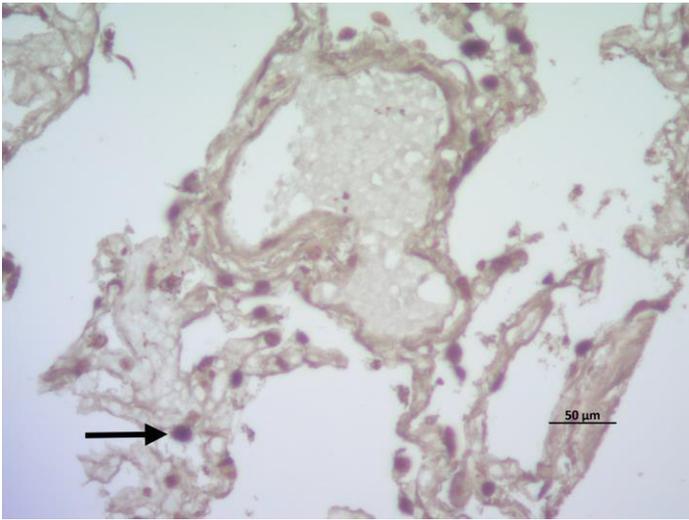
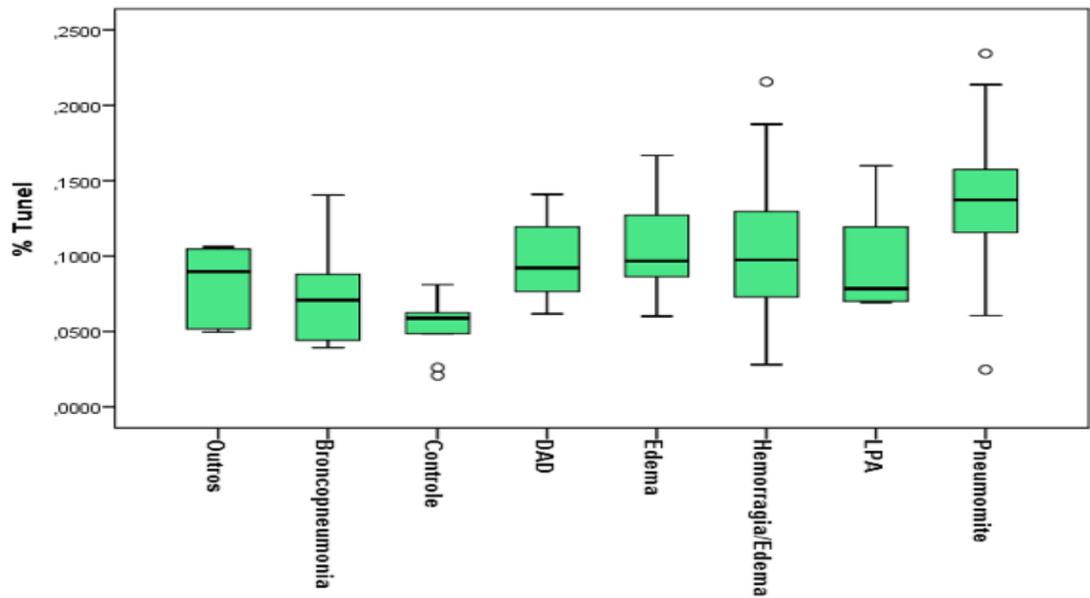


Figura 46 – Células mononucleadas apoptóticas no septo alveolar (400x)
 Fonte: Arquivo da pesquisa.



DAD = Dano alveolar difuso; LPA = Lesão pulmonar aguda; Outros = Padrão da doença de base anterior a infecção por dengue..

Figura 47 – Associação da Fração de área da imuno-expressão da apoptose (TUNEL) com Padrões histopatológicos

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 21 – Estatística descritiva da fração de área de Apoptose nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle

Fração de área da Apoptose					
PADRÃO HISTOPATOLÓGICO	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
	célula/ μm^2	célula/ μm^2	célula/ μm^2	célula/ μm^2	
Edema/Hemorragia alveolar	0.093	0.028	0.216	0.100	0.041
Edema alveolar	0.097	0.060	0.167	0.109	0.034
Pneumonite	0.137	0.025	0.234	0.138	0.043
Broncopneumonia	0.071	0.039	0.140	0.075	0.035
Lesão pulmonar aguda	0.078	0.069	0.160	0.096	0.037
Dano alveolar difuso	0.092	0.050	0.180	0.098	0.037
Doença de base	0.100	0.079	0.105	0.095	0.014
Controle	0.059	0.021	0.081	0.053	0.019

Fonte: Elaboração própria.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) apresenta imunopressão em células endoteliais (Figura 48).

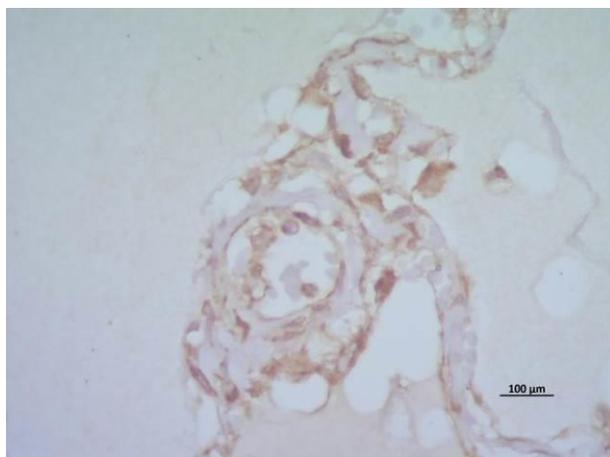
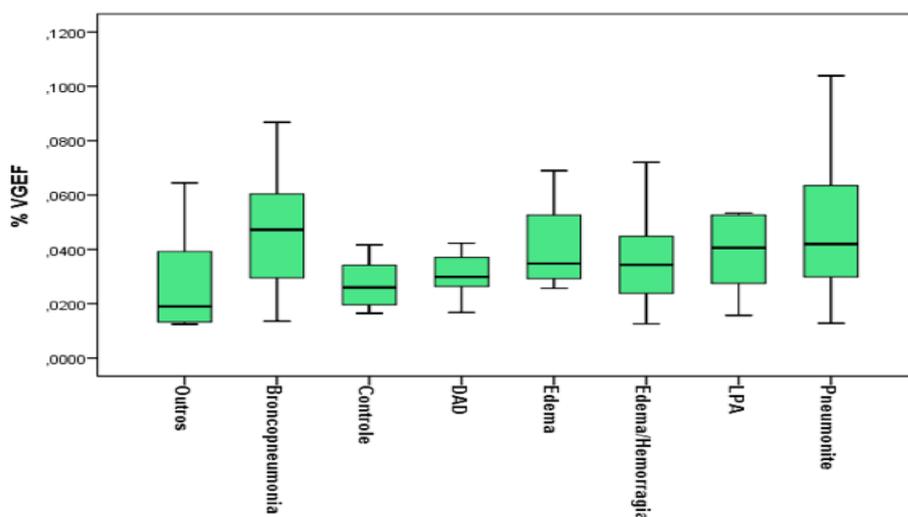


Figura 48 – Célula endotelial com imunopressão de VEGF (400x)

Fonte: Arquivo da pesquisa.



DAD = Dano alveolar difuso; LPA = Lesão pulmonar aguda; Outros = Padrão da doença de base anterior a infecção por dengue.

Figura 49 – Associação da fração de área da imuno-expressão da VEGF com Padrões histopatológicos

Fonte: Elaboração própria.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) apresenta maior fração de área com imuno-expressão no padrão histopatológico de broncopneumonia (0.047 célula/ μm^2), Figura 49 e Tabela 22. Em ordem decrescente observamos a pneumonite (0.042 célula/ μm^2), lesão pulmonar aguda (0.041 célula/ μm^2), edema isolado (0.035 célula/ μm^2), hemorragia/edema (0.034 célula/ μm^2), dano alveolar difuso (0.026 célula/ μm^2), e doença pulmonar prévia (0.024 célula/ μm^2).

Tabela 22 – Estatística descritiva da fração de área de VEGF nos padrões histopatológicos pulmonares em 126 casos de dengue e controle

Fração de área do VEGF					
PADRÃO HISTOPATOLÓGICO	Mediana célula/ μm^2	Mínimo célula/ μm^2	Máximo célula/ μm^2	Média célula/ μm^2	Desvio Padrão
<i>Edema/Hemorragia alveolar</i>	0.034	0.013	0.072	0.036	0.016
<i>Edema alveolar</i>	0.035	0.026	0.069	0.041	0.014
<i>Pneumonite</i>	0.042	0.013	0.104	0.046	0.022
<i>Broncopneumonia</i>	0.047	0.014	0.087	0.047	0.023
<i>Lesão pulmonar aguda</i>	0.041	0.016	0.053	0.038	0.015
<i>Dano alveolar difuso</i>	0.026	0.012	0.065	0.029	0.014
<i>Doença de base</i>	0.024	0.014	0.039	0.026	0.013
<i>Controle</i>	0.026	0.017	0.042	0.027	0.009

Fonte: Elaboração própria.

5.5 Quantificação e comparação da imuno-expressão células inflamatórias no parênquima pulmonar incluindo linfócitos T CD4+ e CD8+, macrófagos e mastócitos) e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle

A histomorfometria da imuno-expressão dos linfócitos T CD4+ (Figura 50) exibiu a mediana da fração de área maior na forma clínica de DCC (0,027 célula T CD4+/ μm^2), em relação a FHD (0,020 célula T CD4+/ μm^2) e ao controle (0,027 célula T CD4+/ μm^2), com significância entre as formas clínicas da dengue ($p=0,007$). Os números de células T em pacientes com FHD encontram-se reduzidos em comparação com a febre da dengue clássica (Green et al., 1999). Na nossa casuística, a redução de CD4+ na FHD é em relação aos casos de DCC.

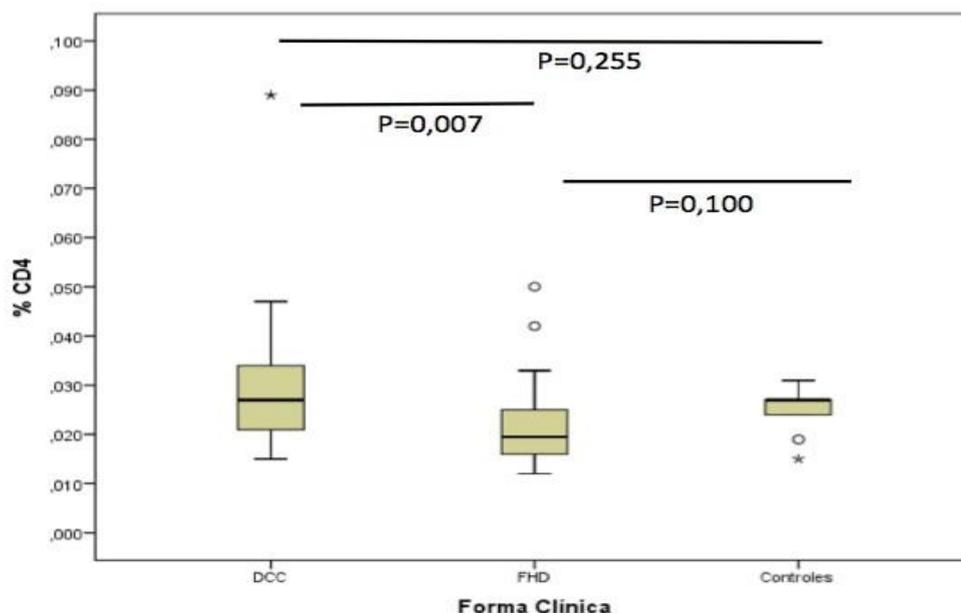


Figura 50 – Associação da Fração de área da imuno-expressão dos Linfócitos CD4 com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles

Fonte: Elaboração própria.

A morfometria da imuno-marcação dos linfócitos T CD8 (Figura 51) exibiu a mediana da fração de área muito semelhantes na DCC (0,164 célula T CD8/ μm^2), na FHD (0,162 célula T CD8/ μm^2) e no controle (0,186 célula T CD8/ μm^2), sem nenhuma significância estatística entre os três grupos.

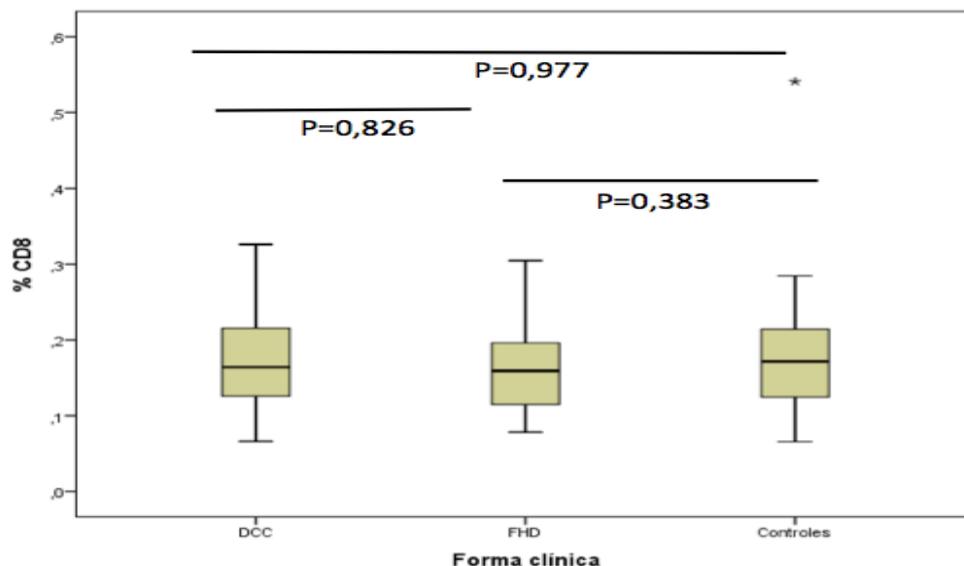


Figura 51 – Associação da Fração de área da imuno-expressão dos Linfócitos CD8 com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles

Fonte: Elaboração própria.

A média da densidade de células T CD4+, CD8+ e da relação CD4+/ CD8+ estão demonstradas na Tabela 23. A densidade de CD4+ entre os grupos de dengue e o controle não apresentam diferenças estatísticas significativas, assim como o CD8+ também não apresenta. Porém, a relação da densidade de CD4+/CD8+ demonstra que tanto no grupo da FHD como no grupo DCC, as células CD8+ estão em maior número que as células CD4+, apresentando significância estatística com $p=0,0001$, quando comparada com o grupo controle. A inversão da relação CD4+/CD8+ exibida em nosso estudo, foi observada anteriormente por Liu em casos de FHD (Liu et al., 2002).

Tabela 23 – Densidade celular de CD4+, CD8+ e Relação CD4+/CD8+ nos grupos de DCC, FHD e controles

Densidade celular (célula/ μ^2)	DCC	FHD	CONTROLE
CD4+	0.223 (SD \pm 0.085) ^c	0.180 (SD \pm 0.070) ^c	0.149 (SD \pm 0.023) ^c
CD8+	1.331(SD \pm 0.435) ^c	1.308 (SD \pm 0.470) ^c	0.223 (SD \pm 0.086) ^c
CD4+/CD8+	0.184(SD \pm 0.086) ^a	0.155(SD \pm 0.088) ^b	1.313 (SD \pm 0.891)

^c Sem significância estatística pelo Teste t de Studart não pareado.

^a Significância estatística pelo Teste t de Studart não pareado entre grupos DCC e controle ($p=0,0001$).

^b Significância estatística pelo Teste t de Studart não pareado entre grupos FHDe controle ($p=0,0001$).

Fonte: Elaboração própria.

A mediana da fração de área da imuno-expressão dos macrófagos CD68 por μm^2 (Figura 52) apresentou o valor de 0,23 CD68/ μm^2 na DCC, 0,18 CD68/ μm^2 na FHD e 0,06 CD68/ μm^2 no controle. Esses valores apresentam uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo DCC em relação ao grupo controle ($p=0,006$), da FHD em relação ao grupo controle ($p=0,003$). No entanto, também não foi demonstrado diferença significativa entre os grupos de dengue entre si ($p = 0,271$). O macrófago alveolar perfaz pelo menos 90% das células efetoras presentes no parênquima pulmonar e é capaz de interagir com estímulos inflamatórios e imunológicos (Murphy, 1983). Aye detectou antígenos de DENV em macrófagos alveolares em todos os casos de dengue estudados (Aye et al., 2014). O aumento quantitativo de macrófagos alveolares foi observado em estudo descritivo de 3 casos documentados por Póvoa (Póvoa et al., 2014). O presente estudo também encontrou aumento dos macrófagos pulmonares, contudo, em mais de uma centena de casos e com significância estatística em relação ao grupo controle.

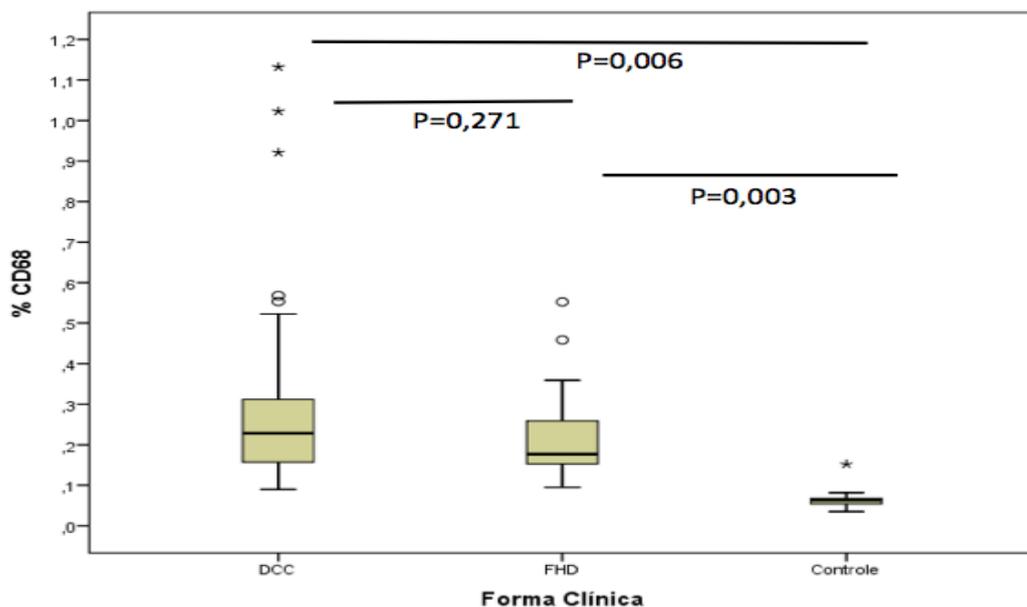


Figura 52 – Associação da Fração de área da imuno-expressão dos Macrófagos CD68 com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 53 ilustra a associação da morfometria da imuno-marcação dos mastócitos com as formas clínicas de dengue. A mediana da fração de área é maior no grupo DCC (0,129 mastócitos/ μm^2), porém sem diferença estatística em comparação com o grupo FHD (0,118 mastócitos/ μm^2) e com o grupo controle (0,067 mastócitos/ μm^2). Os mastócitos são residentes das vias aéreas e são

capazes de proliferação tecidual focal (Marshall, 2004). Eles degranulam dentro de minutos após exposição ao DENV, seguida de uma nova produção de citocinas nas horas subsequentes (St John, 2011). O vazamento vascular induzido por mastócitos em nível sistêmico pode contribuir para a patogênese do vazamento vascular, tanto durante infecções primária como secundária (St John, 2013b). Esperávamos encontrar um aumento de mastócitos nos septos alveolares, como observado por Barreto et al. (2007) em seu estudo experimental, porém as frações de área dos mastócitos não apresentaram diferenças estatísticas relevantes em todos nossos grupos estudados.

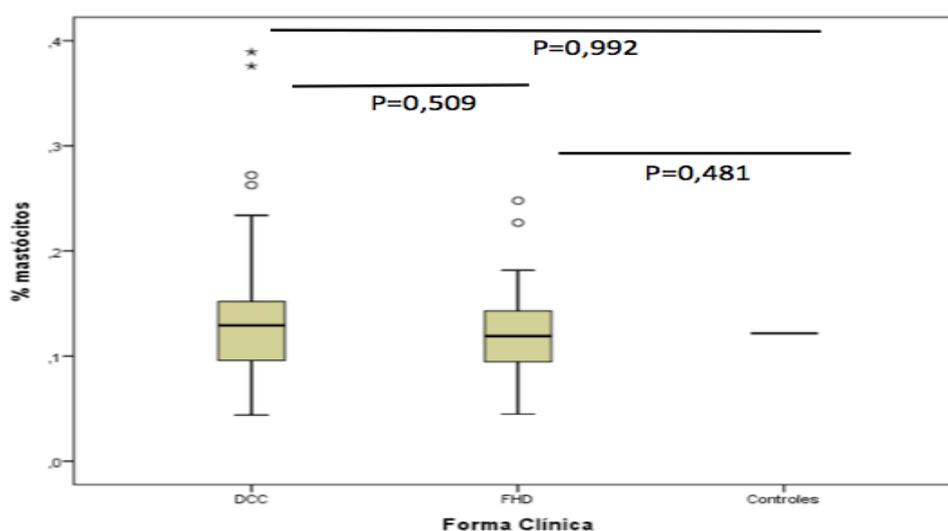


Figura 53 – Associação da Fração de área da imuno-expressão dos Mastócitos com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles
 Fonte: Elaboração própria.

5.6 Quantificação de apoptose no pulmão pelo método TUNEL e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle

A mediana da fração de área da imuno-expressão da célula apoptótica por μm^2 (Figura 54) apresentou o valor de 0,114 na DCC, 0,090 na FHD e 0,06 no controle. Estes valores apresentam uma diferença estatisticamente significativa entre a DCC em relação ao grupo controle ($p=0,006$), da FHD em relação ao grupo controle ($p=0,026$). Porém, não foi demonstrada uma diferença significativa entre os grupos de dengue entre si ($p=0,123$).

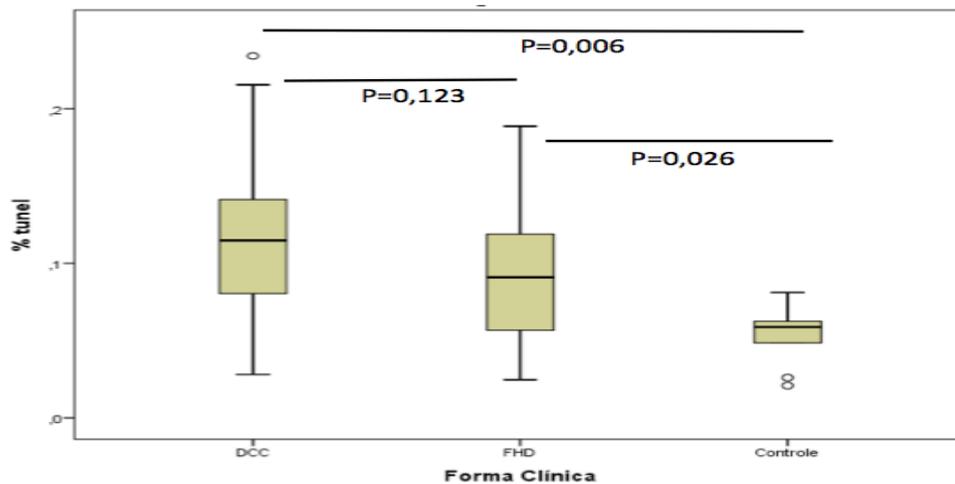


Figura 54 – Associação da Fração de área da imuno-expressão das células apoptóticas com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles

Fonte: Elaboração própria.

A descrição de apoptose nas formas graves de dengue foi inicialmente documentada a partir da década de 90 (Avirutnan et al., 1998; Lin et al., 2002; Cardier et al., 2005). Ela foi identificada em 75% dos seis casos fatais estudados por Limonta (Limonta et al., 2010). No entanto, as células apoptóticas observadas em tecidos de autopsias como cérebro, intestino, fígado e pulmão, foram estudadas somente conforme a frequência, mas não quanto a morfometria. A apoptose é um importante modulador das respostas imunes celulares durante infecção viral sistêmica. Células mononucleares apoptóticas do sangue periférico e os níveis plasmáticos de CD95, um mediador da apoptose, foram determinadas em amostras de crianças infectadas pelo vírus DENV. O mesmo estudo observou que os linfócitos CD8+ constituíam quase a metade das células mononucleadas em apoptose (Myint et al., 2006). A fração de área de células mononucleadas apoptóticas em septos alveolares elevada nas formas de FHD e de DCC em uma casuística expressiva é valiosa na patogênese da dengue, e nunca antes descrita na literatura.

5.7 Quantificação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no tecido pulmonar e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle

Os valores da mediana da fração de área na DCC, na FHD e no controle foram 0,0406 célula com imuno-expressão de VEGF/ μm^2 , 0,0285 células com imuno-expressão de VEGF/ μm^2 e 0,0259 célula com imuno-expressão de VEGF/ μm^2 , respectivamente. A morfometria do fator de crescimento endotelial vascular (Figura 55) demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre as duas formas de apresentação da dengue com $p = 0,001$, sendo maior no grupo de DCC.

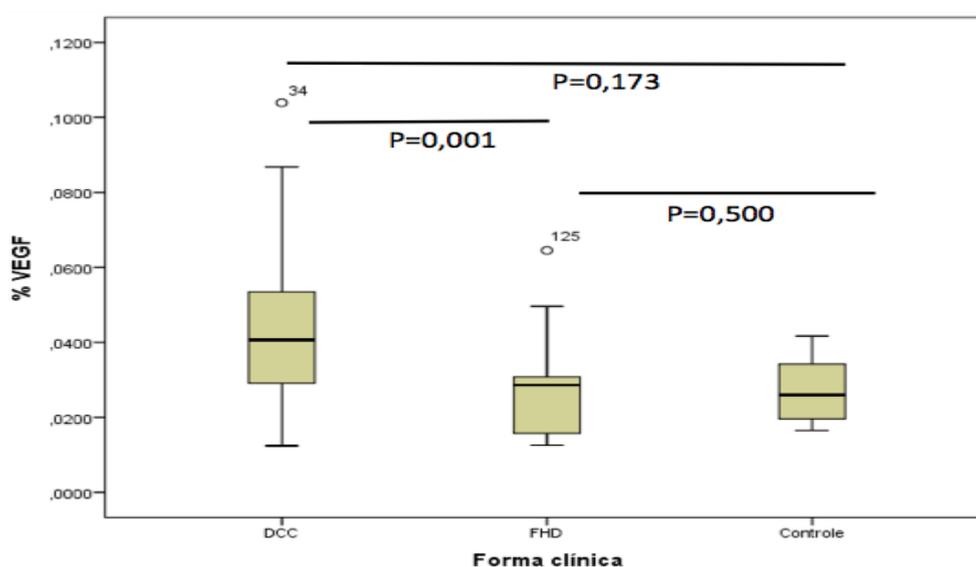


Figura 55 – Associação da Fração de área da imuno-expressão fator de crescimento endotelial (VEGF) com as formas clínicas de Dengue com complicações (DCC), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e controles

Fonte: Elaboração própria.

O VEGF e seus receptores são críticos na regulação, tanto na permeabilidade vascular, como na sobrevivência das células endoteliais. Ele é produzido pelas células epiteliais pulmonares e exibe efeito nas células endoteliais. A super-expressão do VEGF tem sido demonstrada como causa de extravasamento vascular em múltiplos órgãos (Moreira et al., 2007). Na SDRA, a redução de VEGF no pulmão está associado com pior prognóstico. No início da lesão pulmonar, a liberação do VEGF pelas células epiteliais e leucócitos induzem a resposta inflamatória aguda podendo aumentar a permeabilidade vascular e contribuir para formação do edema intersticial. Em fase mais avançada, a redução do VEGF está relacionada com dano

e morte das células epiteliais (Mura et. al, 2006). Abadie et al. demonstraram uma extensa apoptose de células endoteliais e alveolares do tipo II na SDRA (Abadie et al. 2005). No entanto, a SARA é observada em uma parcela pequena de padrão histopatológico pulmonar na dengue.

As junções aderentes célula-célula (AJ) das células endoteliais são compostas por E-caderina endotelial (VE-caderina), e regulam a permeabilidade vascular através da sua abertura e seu fechamento. O VEGF induz a fosforilação da VE-caderina que é acompanhada do aumento na permeabilidade vascular e a diapedese de leucócitos. Condições como inflamação, infecção e isquemia favorecem a perda dessa função especializada da célula endotelial e ao extravasamento de fluidos (Dejana, 2008). No nosso estudo, encontramos uma maior fração de área de VEGF na população de DCC. Isto nos faz refletir sobre possibilidade deste aumento de expressão do VEGF estar relacionado com a aumento da permeabilidade vascular e edema nessa população.

5.7.1 Identificação da imuno-expressão do DENV no parênquima pulmonar e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle

A frequência da presença de antígenos de DENV identificado no citoplasma dos macrófagos está ilustrada na Tabela 24. Esteve presente em 29% no grupo DCC, 26% no grupo FHD e ausente nos controles. Esses antígenos citoplasmáticos em macrófagos, pneumócitos tipo II e células endoteliais já tinham sido documentados de forma descritiva (Póvoa et al., 2014). Porém, o nosso estudo apresenta a frequência da presença do DENV no pulmão de 126 casos fatais de dengue. Demonstramos a presença de DENV em cerca de quase um terço de todos os óbitos, parâmetro ainda não mensurado na literatura (Figura 56).

Tabela 24 – Identificação do DENV no parênquima pulmonar através da imuno-histoquímica com anticorpos policlonais anti-DENV

	Imuno-expressão DENV		
	Total	Nº positivo	%
Grupo de Dengue			
<i>FHD</i>	126	36	
<i>DCC</i>	26	07	26,9
	100	29	29,0
Grupo controle	9	0	-

Dengue com complicações (DCC) e Febre hemorrágica da dengue (FHD).

Fonte: Elaboração própria.

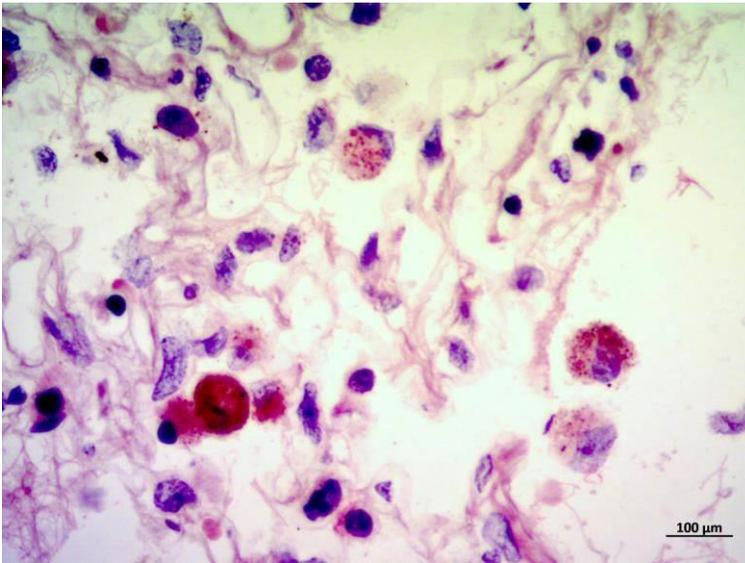


Figura 56 – Macrófago alveolar com imuno-expressão de antígenos virais citoplasmáticos (630x)
Fonte: Arquivo da pesquisa.

5.8 Identificação da proteína não estrutural 1 (NS1) no parênquima pulmonar, e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle

A proteína não estrutural 1 (NS1) foi detectada em macrófagos alveolares em 50% dos casos de FHD e de DCC, (Tabela 25). Não observamos a presença da proteína nos casos controles.

A NS1 do vírus da dengue (DENV) desempenha um papel crítico na replicação do RNA viral e tem uma posição central na patogênese do DENV. É uma glicoproteína expressa em células infectadas, tanto no lúmen do retículo endoplasmático, e após ser transportada para a superfície celular, pode permanecer associada à membrana ou é secretada para o meio extracelular (Amorim et al., 2014).

A proteína não estrutural 1 é um fator importante para a ativação do complemento. Ligação de anticorpos contra NS1 expresso em células infectadas pode resultar em ativação do complemento diretamente. Os componentes do complemento C5b-C9 poderiam desencadear reações celulares e estimular a produção de citocinas inflamatórias associadas com o desenvolvimento de FHD (Kurane et al., 1992). A NS1 de todos os sorotipos de DENV ativam o complemento de forma semelhante (Avirutnan, 2006). Embora o mecanismo patogênico da proteína NS1 mais importante seja pela pelos anticorpos anti-NS1 e os imunocomplexos formados, estudos mais recentes mostraram que a NS1 por si só é patogênica (Modhiran et al., 2015; Adikari et al., 2016).

A proteína NS1 secretada está associada à formas graves de dengue e valores de NS1 maior que 600 ng/ml nas primeiras 72 horas de doença, está relacionada com quadros de FHD (Libraty et al., 2002).

A presença da proteína NS1 no citoplasma de macrófagos pode não significar replicação viral nestas células, mas acreditamos estar relacionada com a patogênese e a gravidade da doença. Da mesma forma que a imuno-histoquímica para antígenos de DENV (anticorpo policlonal), a quantificação da NS1 não foi descrita em grande casuística na literatura (Figura 57).

Tabela 25 – Identificação da proteína não estrutural 1 (NS1) no pulmão

Imuno-expressão da proteína não estrutural 1 NS1			
	Total	Nº positivo	%
Grupo de Dengue	126	63	
FHD	26	13	50
DCC	100	50	50
Grupo controle	9	0	-

Dengue com complicações (DCC) e Febre hemorrágica da dengue (FHD).

Fonte: Elaboração própria.

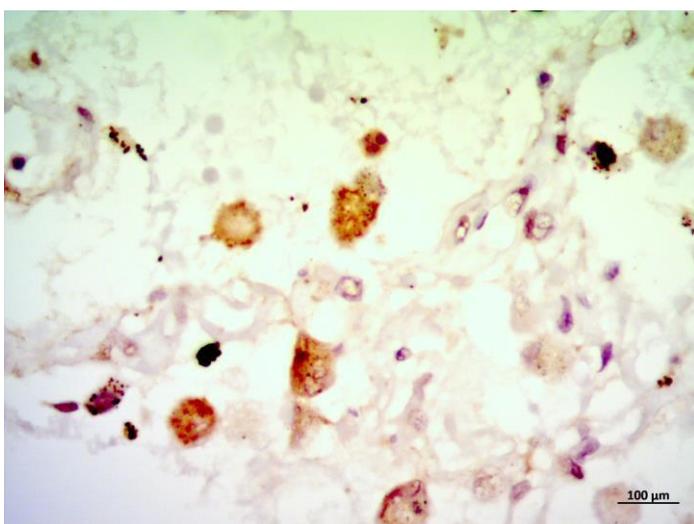


Figura 57 – Macrófago alveolar com imuno-expressão de Proteína Não Estrutural 1 (630x)

Fonte: Arquivo da pesquisa.

5.8.1 Detecção da proteína não estrutural 3 (NS3) no parênquima pulmonar e comparação entre grupos de formas clínicas de dengue e grupo controle

A Proteína não estrutural 3 (NS3) esteve imuno-expressa em 57,6% dos casos de FHD e 59% dos DCC. Como esperado, não observamos a presença da proteína nos casos controles (Tabela 26).

Tabela 26 – Frequência Identificação da proteína não estrutural 3 (NS3) no pulmão
Imuno-expressão da proteína não estrutural 1 NS1

	Total	Nº positivo	%
Grupo de Dengue	126	74	
FHD	26	15	57,6
DCC	100	59	59,0
Grupo controle	9	0	-

Dengue com complicações (DCC) e Febre hemorrágica da dengue (FHD).

Fonte: Elaboração própria.

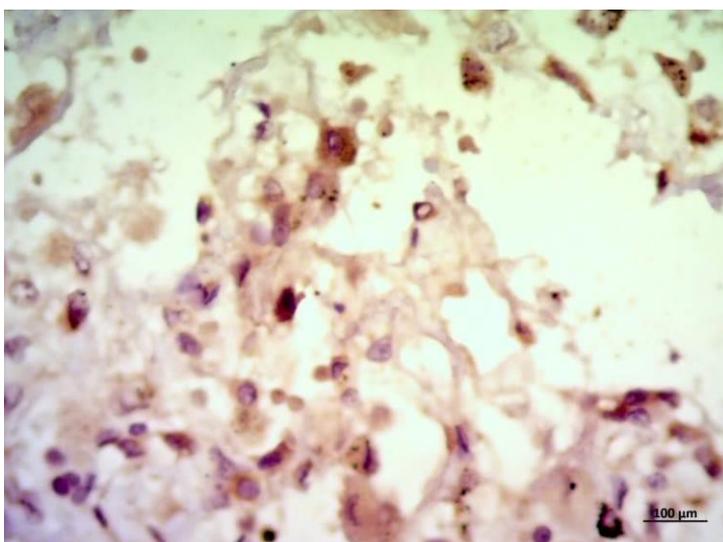


Figura 58 – Macrófago alveolar com imuno-expressão de Proteína Não Estrutural 3 (630x)

Fonte: Arquivos da pesquisa.

A identificação da NS3 no tecido pulmonar quando comparada com a fração de área de edema alveolar (Figura 58) não apresentou uma diferença estatística significativa, com $p = 0,192$ em nível de significância de 95%.

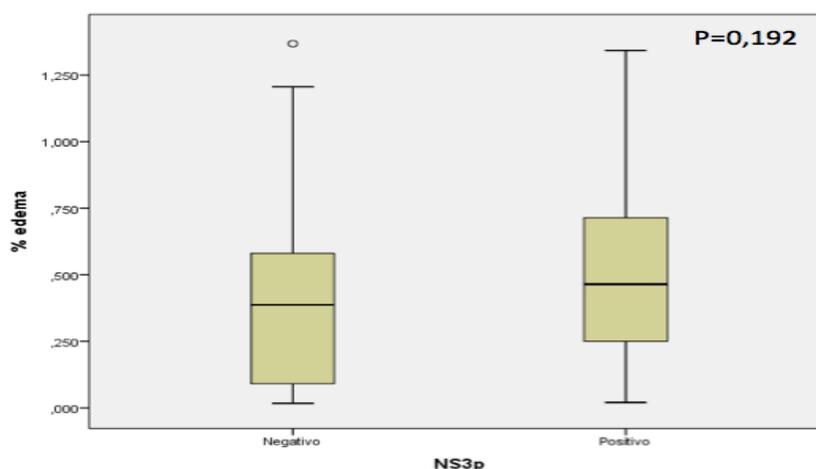


Figura 59 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área de edema alveolar

Fonte: Elaboração própria.

A fração de área de hemorragia alveolar (Figura 59) apresentou mediana mais próxima ainda que o edema, não sendo sua diferença estatisticamente significativa nos grupos com e sem imuno-marcacão da NS3, ($p = 0,192$).

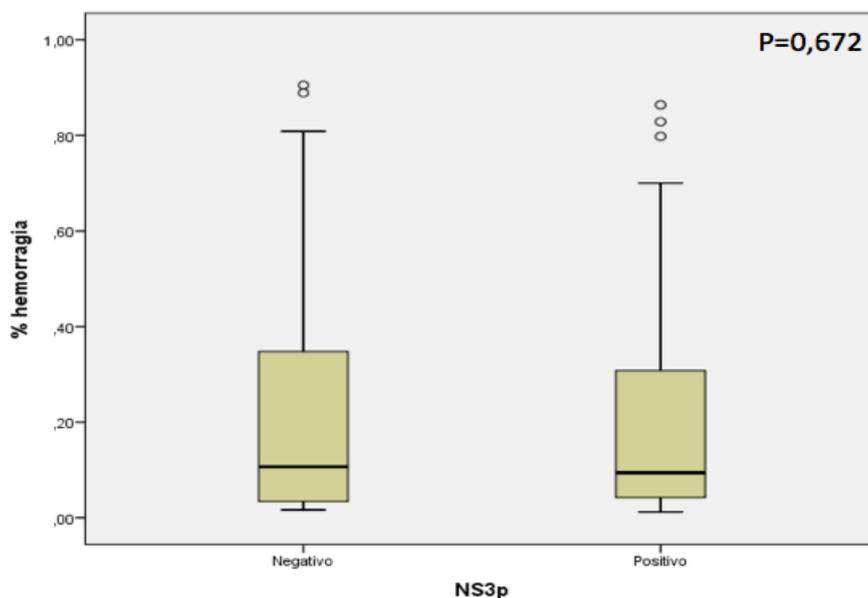


Figura 60 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área de hemorragia alveolar

Fonte: Elaboração própria.

As frações de área das células inflamatórias CD4, CD8, CD68 e mastócitos no tecido pulmonar (Figuras 61, 62, 63 e 64), também não demonstraram diferença estatisticamente significativa das suas mediana nos grupos na presença ou ausência imuno- marcacão da NS3, com $p=0,250$, $p=0,938$, $p=0,539$ e $p=0,664$, respectivamente.

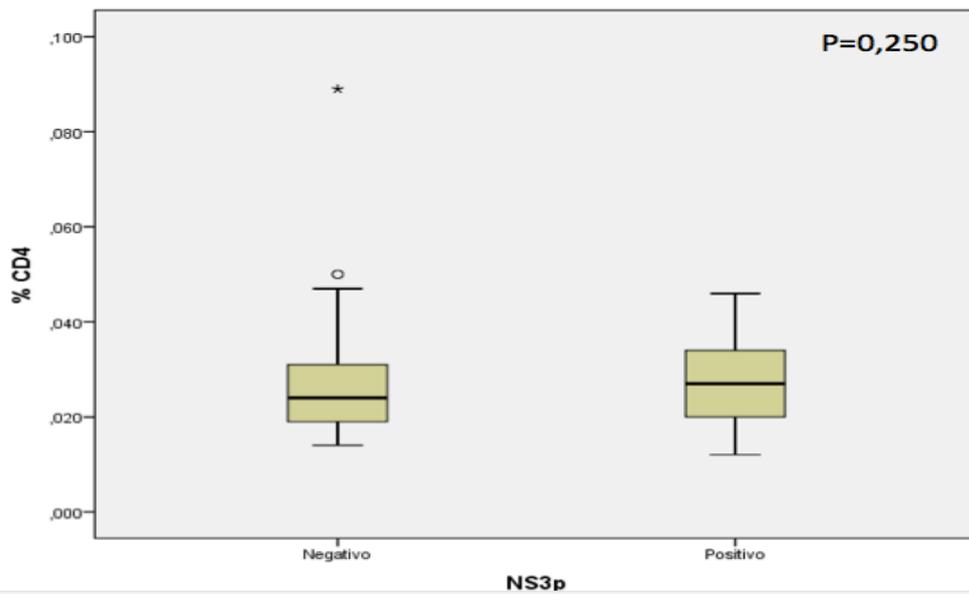


Figura 61 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão do Linfócito T CD4
 Fonte: Elaboração própria.

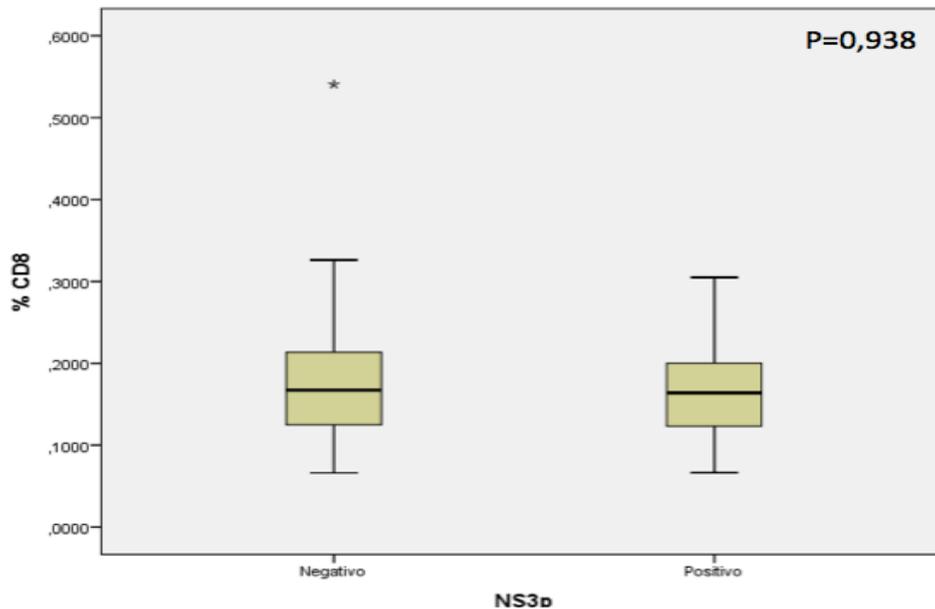


Figura 62 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão do Linfócito T CD8
 Fonte: Elaboração própria.

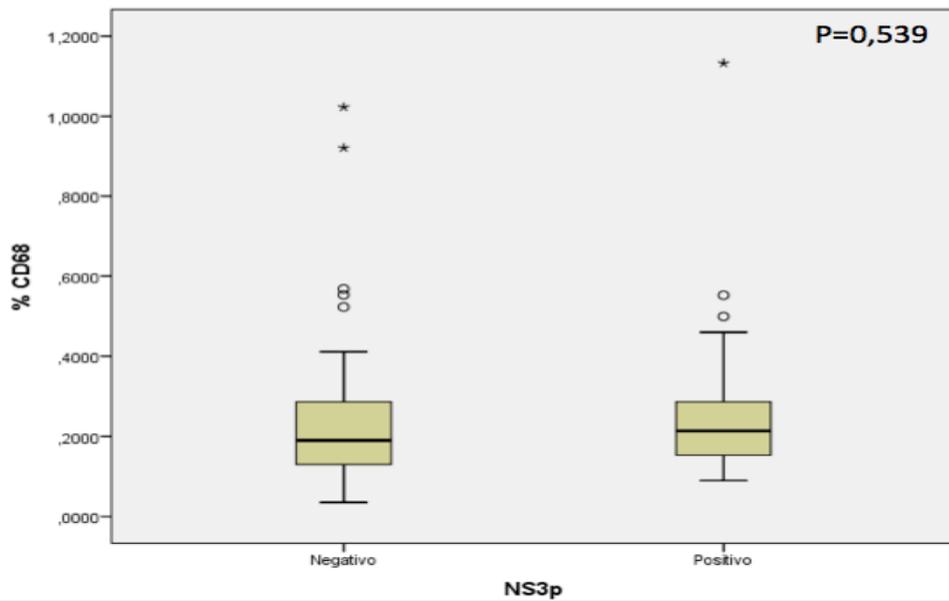


Figura 63 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão do Macrófago CD68
 Fonte: Elaboração própria.

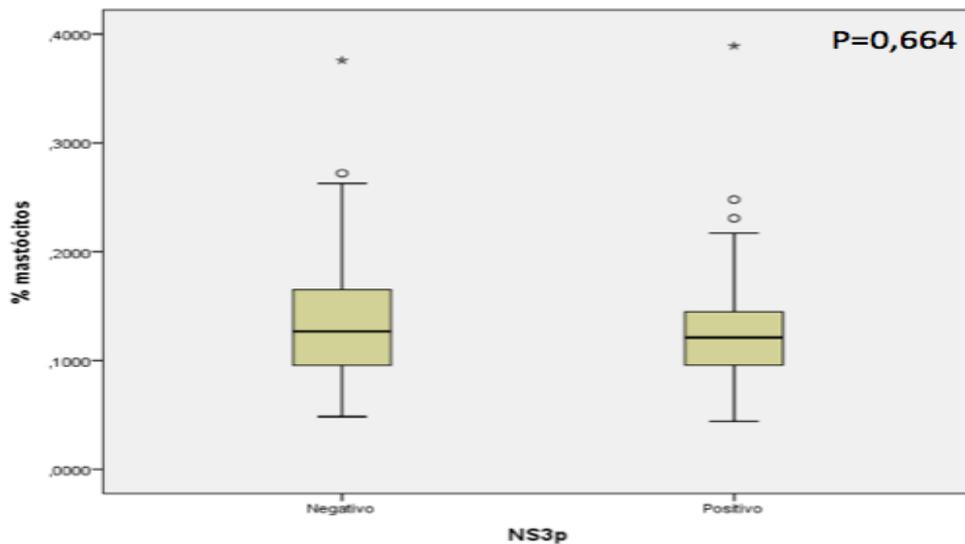


Figura 64 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão dos mastócitos
 Fonte: Elaboração própria.

A fração de área da apoptose das células (Figura 63), avaliada pela marcação de extremidades de dUTP mediada por um TdT (TUNEL), apresentou mediana com

diferença estatisticamente significativa entre a presença ou ausência da NS3 no parênquima pulmonar, com $p = 0,019$.

A proteína não estrutural 3 (NS3) somente está presente dentro das células infectadas pelo DENV, diferente da NS1, que pode ser secretada e permanecer na superfície celular (Nunes et al., 2016). A detecção da NS3 sugere replicação viral nas células marcadas. Nesse sentido, Póvoa demonstrou a presença de proteína NS3 em macrófagos alveolares através da técnica de imuno-histoquímica, assim como, identificou a replicação do DENV nos mesmos casos pela técnica de hibridização *in situ* (Póvoa, 2014).

A proteína NS3 é o principal antígeno viral que estimula a reatividade de células T CD4+ e CD8+, produzindo altos níveis de IFN- γ , bem como TNF- α e TNF- β (Basu et al., 2008). Autores investigaram a resposta de células T à 32 peptídeos de regiões estruturais e não estruturais do DENV, identificando que a proteína NS3 foi o alvo mais importante das mesmas (Duangchinda, 2010).

A presença de NS3 estimula a destruição das células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos (Kurane et al., 1992). A fração de área da expressão da apoptose celular apresentou associação com a presença da NS3 no parênquima pulmonar, demonstrando a importância desse mecanismo fisiopatológico ligado à presença do vírus na agressão pulmonar nos casos fatais de dengue.

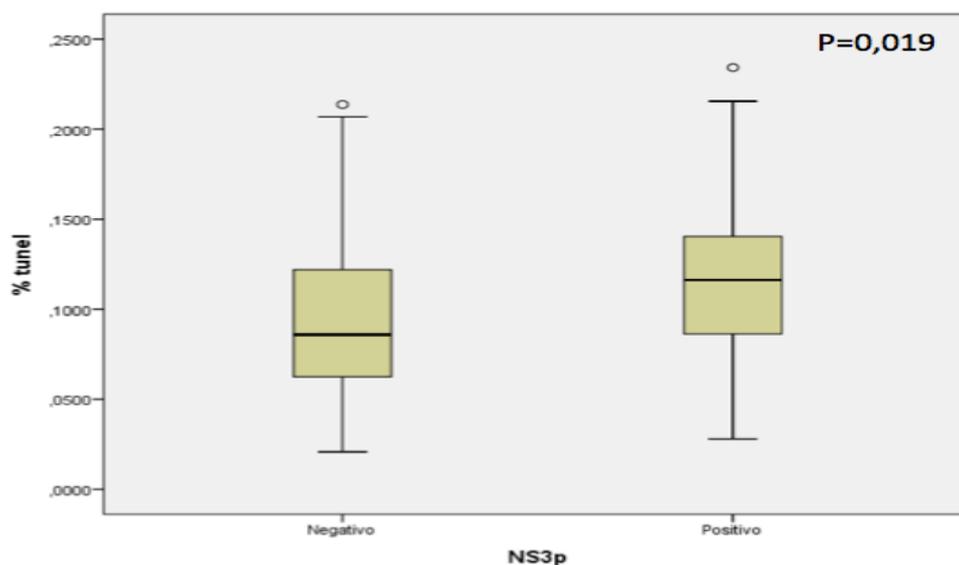


Figura 65 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da apoptose

Fonte: Elaboração própria.

A comparação da imuno-marcação do fator de crescimento endotelial vascular (Figura 66), não apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre presença ou ausência da proteína NS3 imuno-expressa no tecido pulmonar ($p= 0,066$).

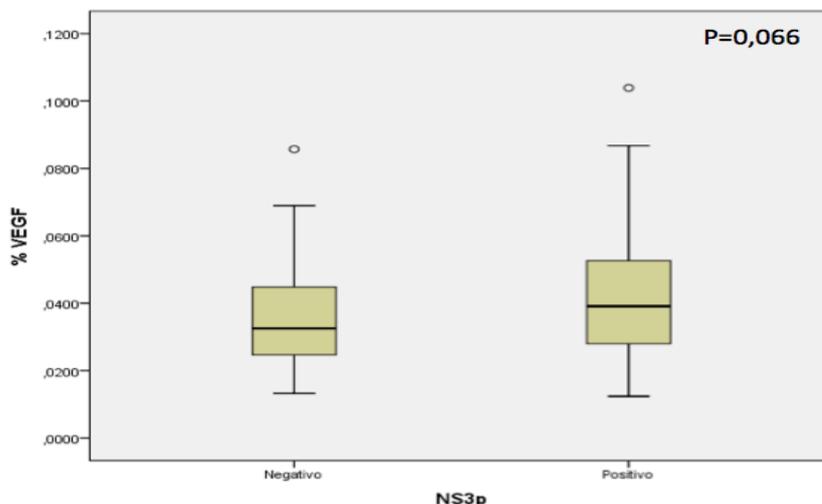


Figura 66 – Comparação entre a presença ou ausência da proteína não estrutural 3 (NS3) identificada por imuno-histoquímica no tecido pulmonar e a Fração de área da imuno-expressão fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
Fonte: Elaboração própria.

5.8 Análise da distribuição dos sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) e comparação das alterações histopatológicas presentes no parênquima pulmonar

A identificação do vírus da dengue realizada, pelo método de *Semi-nested* PCR, encontra-se ilustrada abaixo (Figura 67), onde, uma banda com peso molecular correspondente a amplificação de um segmento do genoma do DENV4 está ressaltada pela seta. Na nossa casuística foram identificados os sorotipos DENV 1, DENV 3 e DENV 4. O DENV 2 não foi identificado em nenhuma autópsia realizada.

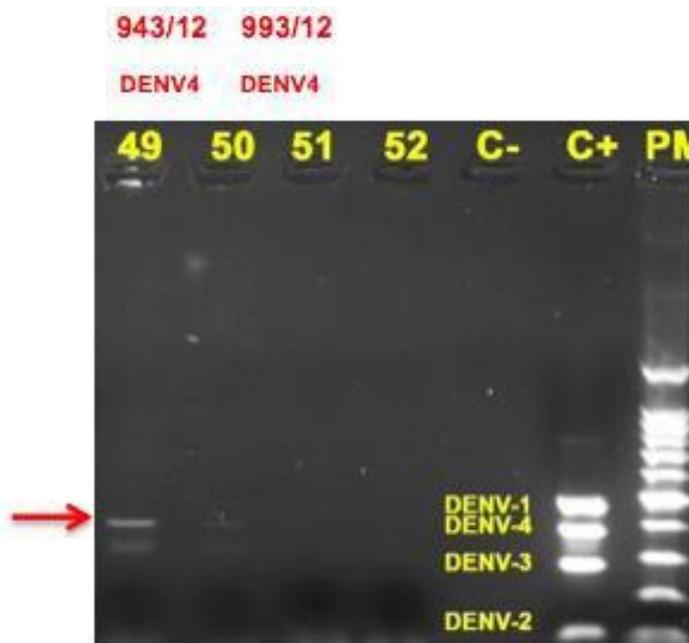


Figura 67 – Semi-nested PCR - Eletroforese de gel de agarose demonstrando bandas com peso molecular compatível com o sorotipo DENV4 (seta)
 Fonte: Laboratório de Imunologia Viral FIOCRUZ- RJ.

A Tabela 27 exibe o cruzamento entre os sorotipos de DENV e os padrões histopatológicos. A categoria base foi considerada o padrão histopatológico hemorragia/edema, que apresenta o valor de razão de chance (RC) igual a 1, sendo os outros padrões comparados com ele.

A maior parte daqueles com o sorotipo DENV-1, apresentou o padrão histopatológico de pneumonite, no total de nove casos, correspondendo a 50% do total de casos de DENV-1. Apenas três casos foram diagnosticados com DENV-3, sendo que desses, dois apresentaram-se com padrão de pneumonite, e um com hemorragia/edema. Quanto aos casos de DENV-4, nove casos apresentaram Hemorragia/edema, correspondendo a 52,94% dos casos de DENV-4, seguido do padrão de pneumonite e dano alveolar difuso proliferativo, com três e dois casos, respectivamente. A maioria dos intervalos de confiança da Razão de Chances engloba o número 1. A única comparação que apresentou diferença significativa, de acordo com o teste da razão de chances, foi o padrão histopatológico Pneumonite e Hemorragia/Edema, onde a Pneumonite (RC 9, IC 95%, 1,42, 57,12) tem cerca de 9 vezes mais chances de ocorrer em indivíduos sorotipo DENV-1 do que a Hemorragia/Edema, ao qual o padrão Hemorragia/Edema ocorre bem mais nos sorotipos DENV-4.

Tabela 27 – Comparação dos sorotipos DENV por padrão histopatológico

Padrão Histopatológico	Sorotipo				RC (IC 95%)	Valor p
	DENV-1	DENV-3	DENV-4	Total		
Broncopneumonia	3 (16,67 %)	-	1 (5,88 %)	4 (10,53 %)	9 (0.66-122.79)	0,13
DAD proliferativa	-	-	2 (11,76 %)	2 (5,26 %)	-	
Edema	1 (5,56 %)	-	1 (5,88 %)	2 (5,26 %)	3 (0.14-64.26)	
Hemorragia/Edema	3 (16,67 %)	1 (33,33 %)	9 (52,94 %)	13 (34,21 %)	1	
Lesão pulmonar aguda	2 (11,11 %)	-	1 (5,88 %)	3 (7,89 %)	6 (0.39-92.28)	
Pneumonite	9 (50 %)	2 (66,67 %)	3 (17,65 %)	14 (36,84 %)	9 (1.42-57.12)	
Total	18 (100 %)	3 (100 %)	17 (100 %)	38 (100 %)		

Nota: Teste Qui-quadrado de independência e Razão de chances. O teste de razão de chances, bem como o teste qui quadrado não consideram o sorotipo DENV-3. O teste de razão de chances não considera o padrão histopatológico DAD proliferativa.

Fonte: Elaboração própria.

Assim como ocorre com os outros vírus RNA, os DENV exibem um alto grau de variabilidade genética, em razão da falta de um mecanismo de correção da RNA polimerase viral durante a replicação, das rápidas taxas de replicação, do grande tamanho populacional e da pressão diante da resposta imunológica do hospedeiro. No Brasil, até 2013, havia sido detectada a circulação de seis genótipos: genótipo V dos DENV-1, genótipo Asiático/Americano dos DENV-2; genótipos III e IV do DENV-3 e genótipos I e II dos DENV-4 (Nunes et al., 2012). Tais variações poderiam modular a infecção, a capacidade de penetrar e se replicar em células específicas do vetor e do hospedeiro, e sobre sua virulência. As cepas com propriedades mais ou menos virulentas têm provocado debate acerca da possível relação entre gravidade da doença e algum genótipo em particular (Torres, 2005; Valle et al., 2015). Halsey estudou a prevalência de manifestações clínicas de quatro países da América do Sul e relatou que a infecção pelo DENV 4 exibiam maiores sintomas respiratórios. Os indivíduos infectados pelo DENV 1 apresentavam maior prevalência de rinorréia, enquanto pelo DENV 4, apresentavam prevalência de faringite (Halsey et al., 2012). Porém estudos comparando o padrão histopatológico pulmonar e o sorotipo da infecção pelo DENV não estão disponíveis na literatura.

O cruzamento dos sorotipos em relação as classes de dengue não exibiu relação significativa, ao nível de 95% de confiança, Tabela 28. Nosso estudo encontra-se de acordo com os achados de Sharp et al., onde a comparação da infecção pelos sorotipos DENV 1, DENV 2 e DENV 4, em relação a quadro clínico fatal não apresentou diferença estatística (Sharp et al., 2013).

6 CONCLUSÕES

- A dengue acomete todas as idades, porém a faixa etária mais frequente foi a de 30 a 59 anos.
- A frequência no sexo masculino foi discretamente maior que no feminino.
- A febre e o desconforto respiratório foram os principais sinais observados pelos familiares e pelas equipes de saúde na nossa casuística.
- A dispnéia foi principal sintoma da nossa série.
- A co-morbidade mais frequente foi a hipertensão arterial sistêmica.
- As causas imediatas de óbito relatadas pelo médicos patologistas foram a insuficiência respiratória e o choque.
- O grupo de febre hemorrágica da dengue(FHD) apresentou o número de plaquetas significativamente inferior ao grupo de dengue com complicações (DCC).
- O peso dos pulmões em gramas na FHD apresentou-se significativamente elevado em relação ao grupo de DCC.
- Os três achados histopatológicos mais frequentes nos grupos de FHD e DCC foram edema alveolar, hemorragia alveolar, pneumonite intersticial crônica. Outras alterações são bronquiolite, broncopneumonia, presença de megacariócitos, efeitos citopáticos epiteliais, hiperplasia de pneumócito II, presença de trombo de fibrina, membrana hialina, necrose.
- A fração de área do edema e da hemorragia encontraram-se estatisticamente superiores em ambos os grupos da dengue em comparação ao grupo controle.
- Foram identificados os padrões histopatológicos encontrados na dengue, estabeleceu-se a frequência de cada um deles. A hemorragia/edema e o edema isolado estiveram presentes em quase a metade dos casos. Porém o padrão de dano alveolar difuso, esteve presente isoladamente sem relação à broncopneumonia, logo após a pneumonite intersticial crônica.

- A distribuição dos padrões histopatológicos pulmonares sugere uma polaridade, onde a criança tem mais pneumonite, enquanto os idosos apresentam mais edema e hemorragia. As outras faixas etárias exibem tanto as doenças por aumento da permeabilidade quanto a inflamatória.
- A fração de área dos linfócitos T CD4+ foi maior no padrão histopatológico de dano alveolar difuso.
- A fração de área dos linfócitos T CD8+ nos diversos padrões histopatológicos mostrou um valor mais elevado no dano alveolar difuso, seguida da broncopneumonia.
- A fração de área do macrófago CD68 obedeceu a seguinte sequência descendente: broncopneumonia, dano alveolar difuso, hemorragia/edema, pneumonite, edema isolado, doença pulmonar prévia, lesão pulmonar aguda e controles.
- A mediana da fração de área dos mastócitos nos diversos padrões histopatológicos foi superior na broncopneumonia.
- A processo de apoptose está mais intenso na pneumonite.
- O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) apresenta maior fração de área com imuno-expressão no padrão histopatológico de broncopneumonia.
- A histomorfometria da imuno-expressão dos linfócitos T CD4+ exibiu a mediana da fração de área maior na forma clínica de DCC em relação a FHD e ao controle, com significância entre as formas clínicas da dengue.
- A morfometria da imuno-marcação dos linfócitos T CD8+ exibiu a mediana da fração de área semelhante na DCC, na FHD e no controle.
- A média da densidade da relação células T CD4+/ CD8+ encontra-se invertida nos grupos FHD e DCC em comparação ao grupo controle, demonstrando que as células CD8+ estão em maior número no pulmão que as células CD4+.
- A mediana da fração de área da imuno-expressão dos macrófagos CD68 apresenta uma diferença significativa entre a DCC em relação ao grupo controle, da FHD em relação ao grupo controle.

- A morfometria da imuno-marcação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre as duas formas de apresentação da dengue.
- A apoptose das células mononucleares septais é maior na presença da proteína não estrutural 3 no parênquima pulmonar.
- A comparação da imuno-marcação do fator de crescimento endotelial vascular, não apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre presença ou ausência de NS3 imuno-expressa no tecido pulmonar.
- Na comparação dos sorotipos DENV por padrão histopatológico a Pneumonite tem cerca de 9 vezes mais chances de ocorrer em indivíduos sorotipo DENV-1 do que a Hemorragia/Edema, que ocorre bem mais nos sorotipos DENV-4.
- O envolvimento pulmonar nas formas graves de dengue são importantes para o desfecho letal, apresentando indícios de participação de várias células efetoras nos mecanismos fisiopatológicos presentes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadie Y, Bregeon F, Papazian L, Lange F, Chailley-Heu B, Thomas P, et al. Decreased VEGF concentration in lung tissue and vascular injury during ARDS. *Eur Respir J* 2005;25(1):139-46.

Ahmed S, Mohammad WW, Hamid F, Akhter A, Afzal RK, Mahmood A. The 2011 dengue haemorrhagic fever outbreak in Lahore - an account of clinical parameters and pattern of haemorrhagic complications. *J Coll Physicians Surg Pak* 2013;23(7):463-7.

Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health* 2011;16(8):936-48.

Almeida RR, Paim B, de Oliveira SA, Souza AS, Gomes ACP, Escuissato DL, et al. Dengue Hemorrhagic Fever: A State-of-the-Art Review Focused in Pulmonary Involvement. *Lung* 2017;195(4):389-95.

Amorim JH, Alves RP, Boscardin SB, Ferreira LC. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res* 2014;181:53-60.

Andersson-Sjöland A, Nihlberg K, Eriksson L, Bjermer L, Westergren-Thorsson G. Fibrocytes and the tissue niche in lung repair. *Respir Res* 2011;12:76.

Andrews BS, Theofilopoulos AN, Peters CJ, Loskutoff DJ, Brandt WE, Dixon FJ. Replication of dengue and junin viruses in cultured rabbit and human endothelial cells. *Infect Immun* 1978;20(3):776-81.

Arismendi-Morillo G, Mauriello-Rivas C, Maldonado-Reverol M, Fernández-Abreu M, Larreal M, Torres-Nava VG, et al. Clinical and pathological correlation in fatal dengue cases found in Maracaibo, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop* 2011;63(1):44-51.

Arora MM. Pathology of dengue fever. In: Talib VH, Shahi SK, eds. *Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever*. Jodhpur (India): Indian Association of Pathologist and Microbiologist (APCON 1997); 1997:39e54.

Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med* 2010;207(4):793-806.

Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol* 2011;187(1):424-33.

Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* 1998;161(11):6338-46.

Avirutnan P, Matangkasombut P. Unmasking the role of mast cells in dengue. *Elife* 2013;2:e00767.

- Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 2006;193(8):1078-88.
- Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog* 2007;3(11):e183.
- Azizan A, Fitzpatrick K, Signorovitz A, Tanner R, Hernandez H, Stark L, et al. Profile of time-dependent VEGF upregulation in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with DENV-1, -2, -3, and -4 viruses. *Virol J* 2009;6:49.
- Azizan A, Sweat J, Espino C, Gemmer J, Stark L, Kazanis D. Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus. *J Virol Methods* 2006;138(1-2):211-7.
- Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80(3):416-24.
- Basílio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA, Paes MV. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2005;9(4):341-7.
- Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53(3):287-99.
- Beasley MB. The pathologist's approach to acute lung injury. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134(5):719-27.
- Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med* 2015;7(304):304ra141.
- Berg K, Wright JL. The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Progress in the 20th and 21st Centuries. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(12):1423-8.
- Bhamarapavati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol* 1967;61(4):500-10.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496(7446):504-7.
- Bhoi SK, Naik S, Kumar S, Phadke RV, Kalita J, Misra UK. Cranial imaging findings in dengue virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* 2014;342(1-2):36-41.
- Bhoopat L, Bhamarapavati N, Attasiri C, Yoksarn S, Chaiwun B, Khunamornpong S, et al. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1996;14(2):107-13.

Boonpucknavig S, Boonpucknavig V, Bhamarapavati N, Nimmannitya S. Immunofluorescence study of skin rash in patients with dengue hemorrhagic fever. Arch Pathol Lab Med 1979;103(9):463-6.

Bosch IK, Xhaja I, Estevez G, Raines H, Melichar RV, Warke MV. et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. Virology Journal 2002;76:5588.

Braga, DNM. Aspectos laboratoriais e anatomopatológicos no diagnóstico da dengue no Ceará em 2011 e 2012: papel do serviço de verificação de óbitos de Fortaleza [dissertação mestrado]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2014.

Brasil. Dengue: diagnóstico e manejo clínico. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde; 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [homepage na internet]. Dengue. Boletim da semana 48/2008 [acesso em 13 dez 2016]. Brasília, DF, 2008. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/boletim/epidemiologico>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [homepage na internet]. Informe epidemiológico da dengue: semanas de 1 a 52 de 2009 [acesso em 13 dez 2016]. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://www.ror.gov.br/web/Sms>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [homepage na internet]. Óbitos por febre hemorrágica da dengue: Brasil, grandes regiões e unidades federadas – 1990 a 2013 [acesso em 13 dez 2016]. Brasília, DF, 2014. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/-bitos-por-casos-graves-at-2013.pdf>

Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). Trans R Soc Trop Med Hyg 1987;81(5):816-20.

Burke T. Dengue haemorrhagic fever: A pathological study. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1968;62(5):682-92.

Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2001;65(6):848-51.

Capelozzi VL. Understanding the microscopic and submicroscopic structure of the alveolar-capillary membrane in acute lung injury. Pulmão 2011; 20(1):24-30.

Cardier JE, Mariño E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. Cytokine 2005;30(6):359-65.

Cardier JE, Rivas B, Romano E, Rothman AL, Perez-Perez C, Ochoa M, et al. Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells. *Endothelium* 2006;13(5):335-40.

Carlos CC, Oishi K, Cinco MT, Mapua CA, Inoue S, Cruz DJ, et al. Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73(2):435-40.

Castro CY. ARDS and diffuse alveolar damage: a pathologist's perspective. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*, WB Saunders 2006;18(1).

Ceará. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará – SESA [homepage na internet] Boletim da dengue 2012 [acesso em 13 mar 2016]. Disponível em: www.saude.ce.gov.br

Ceará. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará – SESA [homepage na internet] Boletim da dengue 2014 [acesso em 13 mar 2016]. Disponível em: www.saude.ce.gov.br

Ceará. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará – SESA [homepage na internet] Boletim da dengue 2016 [acesso em 13 mar 2016]. Disponível em: www.saude.ce.gov.br

Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-[alpha] & interferon-[gamma] in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian Journal of Medical Research* 2006;123(1):25-30.

Chakravartia A, Kumariaa R, Karb P, Batrac VV, Vermaa V. Improved detection of dengue virus serotypes from serum samples: evaluation of single-tube multiplex rt-pcr with cell culture. *Dengue Bulletin* 2006;30:133-40.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology* 1990;44:649-88.

Chan KP, Lau GK, Doraisingham S, Chan YC. Adult dengue deaths in Singapore. *Clin Diagn Virol* 1995;4(3):213-22.

Chandele A, Sewatanon J, Gunisetty S, Singla M, Onlamoon N, Akondy RS, et al. Characterization of human CD8 T cell responses in dengue virus infected patients from India. *Journal of Virology* 2016;JVI-01424.

Chang J, Block TM, Guo J. Antiviral therapies targeting host ER alpha-glucosidases: Current status and future directions. *Antiviral Research* 2013;99(3),251-60.

Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Pathogens and Disease* 2000; 28(3),183-8.

Chaturvedi UC, Raghupathy R, Pacsa AS. Shift from a th1-type response to th2-type in dengue haemorrhagic fever. *Current Science* 1999;76:63-9.

- Chaturvedi UC, Shrivastava R, Tripathi RK, Nagar R. Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2007;50(3):285-99.
- Chen R, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, Cheng JT. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101(11):1106-13.
- Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 2008; 453(7195), 672-676.
- Chuang YC, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Fu TF, Yeh TM. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. *Cytokine* 2011;54(2),222-231.
- Chuang YC, Lin J, Lin YS, Wang S, Yeh TM. Dengue Virus Nonstructural Protein 1-Induced Antibodies Cross-React with Human Plasminogen and Enhance Its Activation. *J Immunol* 2016;196(3):1218-26.
- Chuang YC, Wang SY, Lin YS, Chen HR, Yeh TM. 2013. Reevaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *J Biomed Sci* 20:42.
- Clark I. The advent of the cytokine storm. *Immunology and cell biology* 2007: 85, 271-3.
- Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. *Journal of Virology* 2005;79(2):853-9.
- Couvelard AP, Marianneau C, Bedel MT, Drouet F, Vachon D, Deube H. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol* 1999;30:1106-10.
- Cunha RV, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Barbosa AM, Paiva FG, Miranda RM, et al. Dengue epidemic in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, in 1997. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93(3):247-9.
- Dalrymple NA, Mackow ER. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Advances in Virology* 2012;8.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 13):2115-22.
- Despres P, Flamand M, Ceccaldi PE, Deubel V. Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *Journal of Virology* 1996; 70(6):4090-6.
- Desprès P, Frenkiel MP, Ceccaldi PE, Dos Santos CD, Deubel V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *Journal of Virology* 1998;72(1):823-9.

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with down regulation of vascular endothelial cadherin. *Journal of General Virology* 2008;89: 642-52.

Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* 2000;74(17):7814-23.

Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(39):16922-7.

Duyen HT, Ngoc TV, Ha dT, Hang VT, Kieu NT, Young PR, et al. Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *J Infect Dis* 2011;203(9):1292-300.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *American Journal of Pathology* 1995;146(5).

Dvorak HF. Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp Cell Res* 2006;312(5):522-6.

Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 1997;142(5):897-916.

Fatima A, Wang J. Progress in the diagnosis of dengue virus infections and importance of point of care test: A Review. *Pak. J. Pharm. Sci* 2015;28(1):271-80.

Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003;9(6):669-76.

Figueiredo LT. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. *Virus Reviews & Research* 1996;1;1(1-2):9-16.

Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection* 2000;2(13):1643-9.

Figueiredo MA, Rodrigues LC, Barreto ML, Lima JW, Costa MC, Morato V, et al. Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: results of a case control study. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(6):e699.

Furuta T, Murao LA, Lan NTP, Huy NT, Huong VTQ, Thuy TT, et al. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012;6(2):e1505.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.

Gavrilovskaya IN, Gorbunova EE, Mackow NA, Mackow ER. Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *Journal of Virology* 2008; 82(12):5797-806.

Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis* 1999;179(4):755-62.

Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19(5):429-36.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 1997;8(1):3-9.

Gubler DG. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social, and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2002;10:100-3.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):480-96.

Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* 2005;2(1):1.

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96(5):379-94.

Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, Cecilia D. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology Journal* 2009;6:10.

Guzman MG, Koun G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Stoer M, Vazquez S, Morier LD. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Bull Pan American Health Organ* 1987;21:270-9.

Guzman MG, Kouri G, Soler M, Bravo J, Rodríguez de La Vega A, Vazquez S, et al. Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non asthmatic individual. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87(4):559-64.

Guzmán MG, Alvarez M, Rodríguez R, Rosario D, Vázquez S, Valdés L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 1999;3(3):130-5.

Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdés L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis* 2002;6(2):118-24.

Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet* 2002;2(1):33-42.

Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003;27(1):1-13.

Guzman MG¹, Harris E. *Dengue Lancet* 2015;385(9966):453-65.

Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F, et al. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(4):408-17.

Halsey ES, Marks MA, Gotuzzo E, Fiestas V, Suarez L, Vargas J, et al. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(5):e1638.

Halstead SB, Venkateshan CN, Gentry MK, Larsen LK. Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology* 1984;132(3):1529-32.

Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhage: a pathogenic cascade. *Rev Infect Dis* 1989;11(Suppl 4):S830-9.

Halstead SB, Cohen SN. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 2015;79:3281-291.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic. *Cell* 1996;68(3):353-64.

Harris E, Videa E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63(1-2):5-11.

Hashisako M and Fukuoka J. Pathology of idiopathic interstitial pneumonias clinical medicine insights. *Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine* 2015:9(S1).

Hathirat P, Isarangkura P, Srichaikul T, Suvatte V, Mitrakul C. Abnormal hemostasis in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24(Suppl 1):80-5.

Holt PG. Postnatal maturation of immune competence during infancy and childhood. *Pediatr Allergy and Immunol* 1995;6:59-70.

Horstick O, Martinez E, Guzman MG, San Martin JL, Ranzinger SR. WHO Dengue Case Classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathogens and Global Health* 2015;109(1).

Hothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 1999;257:1.

Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2000;63(1):71-5.

Huerre MR, Trong Lan N, Marianneau P, Bac Hue N, Khun H, Thanh Hung N, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Archiv* 2001;438(2):107-15.

Hughes KT, Beasley MB. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141(7):916-22.

Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J* 2000;14(11):1603-10.

Jessie K, Fong M Y, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of Infectious Diseases* 2004;189(8):1411-8.

Jhamb R, Kashyap B, Ranga G S, Kumar A. Dengue fever presenting as acute liver failure - a case report. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2011;4(4):323-4.

John ALS, Rathore AP, Raghavan B, Ng ML, Abraham SN. Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. *Elife* 2013;2:e00481.

John ALS. Influence of mast cells on dengue protective immunity and immune pathology. *Plos Pathogens* 2013;9(12):e1003783.

Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun* 2000;68(2):702.

Kabra SK, Jain Y, Pandey RM, Madhulika, Singhal T, Tripathi P, et al. Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93(3):294-8.

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

Kang D, Nakayama T, Togashi M, Yamamoto M, Takahashi M, Kunugi S, et al. Two forms of diffuse alveolar damage in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Human Pathology* 2009;40(11):1618-27.

Kangwanpong D, Bhamarapavati N, Lucia HL. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method: a case report. *Clin Diagn Virol* 1995;3(2):165-72.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972; 26(4):239.

Killen H, O'Sullivan MA. Detection of dengue virus by in situ hybridization. *J Virol Methods* 1993;41(2):135-46.

Kim EA, Lee KS, Primack SL, Yoon HK, Byun HS, Kim TS, et al. Viral pneumonias in adults: radiologic and pathologic findings. *Radiographics* 2002;22(Spec No):S137-49.

King AD, Nisalak A, Kalayanaroj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, et al. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999;30(4):718-28.

Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, Siripanichgon K. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J Clin Virol* 2007;39(2):76-81.

- Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2006;138(12):123-30.
- Koraka P, Murgue B, Deparis X, Van Gorp EC, Setiati TE, Osterhaus AD, et al. Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity. *J Med Virol* 2004;72(3):445-50.
- Kulkarni RD, Patil SS, Ajantha GS, Upadhya AK, Kalabhavi AS, Shubhada RM. Association of platelet count and serological markers of dengue infection- importance of NS1 antigen. *Indian journal of medical microbiology* 2011;29(4):359-62.
- Kurane I, Innis BL, Nisalak A, Hoke C, Nimmannitya S, Meager A, et al. Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. *J Clin Invest* 1989;83(2):506-13.
- Kurane I, Ennis FA. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* 1992;4:121-7.
- Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, Green S, Gagnon SJ, Janus J, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Ennis FA. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Archives of virology. Supplementum* 1994;9:59.
- Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362(4):1051-6.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* 1992;30(3):545-51.
- Laughlin CA, Morens DM, Cassetti MC, Costero-Saint Denis A, San Martin JL, Whitehead SS, Fauci AS. Dengue research opportunities in the Americas. *The Journal of infectious diseases* 2012; 206(7):1121-7.
- Lee IK, Liu JW, Yang KD. Clinical and laboratory characteristics and risk factors for fatality in elderly patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79(2):149-53.
- Lee Chi-Hang, Teo C, Low AF. Fulminant dengue myocarditis masquerading as acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* 2009;136:e69-e71.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of virology* 1999;73(6):4738-47.
- Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002;186(8):1165-8.

- Lili Y, Yi W, Ji Y, Yue S, Weimin S, Ming L. Global activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized vitiligo. *PLoS One* 2012;7(5):e37513.
- Limonta D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Guzmán MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *Journal of Clinical Virology* 2007;40(1):50-4.
- Limonta D, Capó V, Torres G, Guzmán MG, López LX, Pérez AB, et al. New evidence of the contribution of apoptosis to dengue hemorrhagic fever pathophysiology. *Biotechnologia Aplicada* 2010;27(1):62-5.
- Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MH, Peixoto AA. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One* 2011;6(3):e17690.
- Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol* 2005;174(1):395-403.
- Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol* 2001;63(2):143-9.
- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol* 2002;169(2):657-64.
- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol* 2003;69(1):82-90.
- Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003;59:23-61.
- Lindenbach, B.D., C.L. Murray, H.-J. Thiel, C.M. Rice. "*Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.*" Chapter 26 in D.M. Knipe, et al. (eds.), *Fields Virology*, 6th Edition. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- Liu CC, Huang KJ, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Lei HY. Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J Med Virol* 2002;68(2):241-52.
- Liu CC, Huang KJ, Huang MC, Lin JJ, Wang SM, et al. High case fatality rate of adults with dengue hemorrhagic fever during an outbreak in nonendemic Taiwan risk factors for dengue-infected elders. *Am J Infect Dis* 2008;4:10.
- Liu JY, Liu Y, Nie KX, Du SY, Pang XJ, Wang PH, Cheng G. Flavivirus acquisition by mosquitoes requires the secretion of nonstructural protein 1 from infected hosts. *Nature Microbiology* 2016;1:16087.
- Lum LC, Goh AY, Chan PW, El-Amin AL, Lam SK. Risk factors for hemorrhage in severe dengue infections. *J Pediatr* 2002;140(5):629-31.

- Lumbiganon P, Kosalaraksa P, Thepsuthammarat K, Sutra S. Dengue mortality in patients under 18 years old: an analysis from the health situation analysis of Thai population in 2010 project. *J Med Assoc Thai* 2012;S108-113.
- Luplertlop N, Luplerdlop N, Missé D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, et al. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep* 2006;7(11):1176-81.
- Macedo FC, Nicol AF, Cooper LD, Yearsley M, Pires, ARMA*; Nuovo GJ. Histologic, Viral, and Molecular Correlates of Dengue Fever Infection of the Liver Using Highly Sensitive Immunohistochemistry. *Diagnostic Molecular Pathology* 2006;15(4):223-8.
- Mandarim-De-Lacerda CA. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: EDUERJ; 1995.
- Manokaran G, Finol E, Wang C, Gunaratne J, Bahl J, Ong EZ, Tan HC, Sessions OM, Ward AM, Gubler DJ, Harris E. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* 2015;350(6257):217-21.
- Marchette NJ, Halstead SB, Nash DR, Stenhouse AC. Recovery of dengue viruses from tissues of experimentally infected rhesus monkeys. *Appl Microbiol.* 1972;24(3):328-33.
- Marianneau P, Flamand M, Deubel V, Desprès P. Apoptotic cell death in response to dengue virus infection: the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever revisited. *Clin Diagn Virol* 1998;10(2-3):113-9.
- Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4(10):787-99.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(4):564-81.
- Mathew A, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. *J Immunol* 1999;162(9):5609-15.
- Matos AM, Carvalho KI, Rosa DS, Villas-Boas LS, da Silva WC, de Lima Rodrigues CL. CD8+ T lymphocyte expansion, proliferation and activation in dengue fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015;9(2):e0003520.
- Mauad T, van Schadewijk A, Schrumph J, Hack CE, Fernezlian S, Garippo AL, et al. Lymphocytic inflammation in childhood bronchiolitis obliterans. *Pediatr Pulmonol* 2004;38(3):233-9.
- Mentor NA, Kurane I. Dengue virus infection of human T lymphocytes. *Acta virologica* 1997;41(3):175-6.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* 1997;16(4):204-8.

Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *Journal of Clinical Virology* 1999;14(3):183-9.

Middleton EA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in pulmonary immune responses and inflammatory lung diseases. *Physiological Reviews* 2016;96(4):1211-59.

Misra UK, Kalita J, Syam UK, Dhole TN. Neurological manifestations of dengue virus infection. *Journal of the neurological sciences* 2006;244(1):117-22.

Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med* 2015;7(304):304ra142.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xiao-ning X, Vasanaawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenichitsomanus² P, McMichael A, Malasit P, Screaton G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature Medicine* 2003;9:921-7.

Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition--a critical review. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7(2):223-45.

Moreno EA, Cuéllar CG, González AD. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 2000;46(4).

Mura M, Han B, Andrade C, Seth R, Hwang D, Waddell TK, et al. The early responses of VEGF and its receptors during acute lung injury: implication of VEGF in alveolar epithelial cell survival. *Critical Care* 2006;10(5):R130.

Murărescu ED, Mitrofan EC, Mihailovici MS. Chronic obstructive pulmonary disease in a new concept. *Rom J Morphol Embryol* 2007;48(3):207-14.

Murphy S, Florman AL. Lung defenses against infection: a clinical correlation. *Pediatrics* 1983;72(1):1-15.

Nagassar RP, Bridgelal-Nagassar RJ, McMorris N, Roye-Green KJ. *Staphylococcus aureus* pneumonia and dengue virus co-infection and review of implications of coinfection. *BMJ case reports* 2012 Jul 3.

Narayanan M, Aravind MA, Thilothammal N, Prema R, Sargunam CS, Ramamurty N. Dengue fever epidemic in Chennai: A study of clinical profile and outcome. *Ind Pediatr* 2002;39:1027.

Neri M, Othman SM, Cantatore S, De Carlo D, Pomara C, Riezzo L. Sudden Infant Death in an 8-Month-Old Baby with Dengue Virus Infection: Virus in Postmortem Tissues by Immunohistochemistry and Western Blotting. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2012;31(8):878-880.

Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sizirensen FB, Vesterby A. and West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-94.

- Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margotta MR. Dengue and chickenguinya virus infection in Thailand 1962-64; observation on hospitalised patients with hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1969;18:954-7.
- Nisalak A, Halstead SB, Singharaj P, Udomsakdi S, Nye SW, Vinijchaikul K. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. 3. Virologic studies of fatal disease. *Yale J Biol Med* 1970;42(5):293-310.
- Nishioka K. Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. *Allerg Immunol (Leipz)* 1974;20-21(4):385-92.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2001;96(7):925-6.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1990;85(2).
- Noisakran S, Chokephaibulkit K, Songprakhon P, Onlamoon N, Hsiao HM, Villinger F, et al. A Re-evaluation of the Mechanisms Leading to Dengue Hemorrhagic Fever. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009;1171(1).
- Nunes PCG, Paes MV, de Oliveira CAB, Soares ACG, de Filippis AMB, Lima MDRQ, et al. Detection of dengue NS1 and NS3 proteins in placenta and umbilical cord in fetal and maternal death. *Journal of Medical Virology* 2016;88(8),1448-52.
- Oliveira Poersch C, Pavoni DP, Queiroz MH, de Borba L, Goldenberg S, dos Santos CND, et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *Journal of Clinical Virology* 2005;32(4),272-277.
- Ong A, Sandar M, Chen MI, Sin LY. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int J Infect Dis* 2007;11(3):263-7.
- Osanaí CH, Travassos DR, Tang AT, Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Outbreak of dengue in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1983;25(1):53-4.
- Pagliari C, Vijaykumar S. Digital Participatory Surveillance and the Zika Crisis: Opportunities and Caveats. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(6):e0004795.
- Parra ER, Pinto Ruppert AD, Capelozzi VL. Angiotensin II type 1 and 2 receptors and lymphatic vessels modulate lung remodeling and fibrosis in systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinics* 2014;69(1):47-54.
- Pawitan JA. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. *Acta Med Indones* 2011;43(2):129-35.
- Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, Enria DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8:S30-7.

- Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 1997;50(3-4):161-9.
- Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, Dalalio MM, Coimbra MT, Moliterno RA. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004;99(6):559-62.
- Póvoa TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes M V. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One* 2014;9(4):e83386.
- Póvoa TF, Oliveira ER, Basílio-de-Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Salomão NG, et al. Peripheral Organs of Dengue Fatal Cases Present Strong Pro-Inflammatory Response with Participation of IFN-Gamma-, TNF-Alpha- and RANTES-Producing Cells. *PLoS One* 2016;11(12):e0168973.
- Putintseva E, Vega G, Fernández L. Alterations in thrombopoiesis in patients with thrombocytopenia produced by dengue hemorrhagic fever. *Nouv Rev Fr Hematol* 1986;28(5):269-73.
- Rachman A, Harahap AR, Widhyasih RM. The role of antidengue virus NS-1 and anti-protein disulfide isomerase antibodies on platelet aggregation in secondary dengue infection. *Acta Med Indones* 2013;45:44-48.
- Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003;59:315-41.
- Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174(2):479-93.
- Rigau-Pérez JG, Laufer MK. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals. *Clin Infect Dis* 2006;42(9):1241-6.
- Rosen, L., M. T. Drouet, and V. Deubel. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1999;61:720-4.
- Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *Journal of Clinical Investigation* 2004;113(7):946.
- Sahaphong S, Riengrojpitak S, Bhamarapavati N, Chirachariyavej T. Electron microscopic study of the vascular endothelial cell in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1980;11(2):194-204.
- Saltini C, Hance AJ, Ferrans VJ, Basset F, Bitterman PB, Crystal RG. Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1984;130(4):650-8.
- Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax* 2001;56(12):902-6.

Sam SS, Omar SF, Teoh BT, Abd-Jamil J, AbuBakar S. Review of Dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: a retrospective study. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(5):e2194.

San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, Guzmán MG. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2010;82(1):128-35.

Sanchez LF, Hotta H, Hotta S, Homma M. Degranulation and histamine release from murine mast cells sensitized with dengue virus-immune sera. *Microbiol Immunol* 1986;30(8):753-9.

Sarasombath S, Suvatte V, Homchampa P. Kinetics of lymphocyte subpopulations in dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1988;19(4):649-56.

Schatzmayr HG, Nogueira RM. Dengue virus type 1 has been isolated in *Aedes albopictus* cell strain, from sera of patients living in the Nova Iguaçu county, by Rio de Janeiro. The clinical picture was characterized by fever, headache, retrobulbar pain, backache, pains in the muscles and the joints and prostration. Studies in paired sera confirmed the presence of recent infection by dengue virus type 1. The outbreak reached adjacent areas, including Rio de Janeiro city (May, 1986). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1986;81(2):245-6.

Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, Hombach J. Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development. *Vaccine* 2011;29(42):7276-84.

Schnettler E, Sterken MG, Leung JY, Metz SW, Geertsema C, Goldbach RW, Vlak JM, Kohl A, Khromykh AA, Pijlman GP. Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and mammalian cells. *Journal of virology* 2012;86(24):13486-500.

Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol* 2015;15(12):745-59.

Seet RC, Chow AW, Quek AM, Chan YH, Lim EC. Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in adults with dengue virus infection: a case-control study. *International Journal of Infectious Diseases* 2009;13(5):e248-e253.

Shiao MF, Chang FY, Hou SC. Complement pathway activity in serum from patients with classical dengue fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86(6):672-5.

Shivanthan MC, Navinan MR, Constantine GR, Rajapakse S. Cardiac involvement in dengue infection. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2015;15;9(04):338-46.

Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *New England Journal of Medicine* 2012;366(15):1423-32.

Siqueira JB, Vinhal LC, Said RFC, Hoffmann JL, Martins J, Barbiratto SB, et al. Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Sittisombut N. Pathogenesis of dengue viral diseases. *The Southeast Asian J Trop Med and Public Health* 2017;48(Sup1):53-9.

Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanarooj S, Libraty DH, Green S, et al. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *J Virol* 2007;81(4):1592-600.

Srikiatkachorn A, Kelley JF. Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2014;109:160-70.

St John AL, Rathore AP, Raghavan B, Ng ML, Abraham SN. Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. *Elife* 2013;2:e00481.

St John AL, Rathore AP, Yap H, Ng ML, Metcalfe DD, Vasudevan SG, et al. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(22):9190-5.

Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, et al. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost* 2007;5(11):2291-9.

Suresh R, Chandrasekaran P, Sutterwala FS, Mosser DM. Complement-mediated 'bystander' damage initiates host NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci* 2016;129:1928-39.

Teixeira MDG, Barreto ML, Costa MDCN, Ferreira LDA, Vasconcelos PF, Cairncross S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Tropical Medicine & International Health* 2002;7(9):757-762.

Teixeira MG, Costa MDCN, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 2009;25:S7-S18.

Thachil J. The lung megakaryocytes and pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Medical Hypotheses* 2009;72(3):291-3.

Thai KT, Anders KL. The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue. *Experimental Biology and Medicine* 2011;236(8):944-54.

Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, Aye KM, Aaskov J. Risk factors in dengue shock syndrome. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1997;56(5):566-72.

Theofilopoulos AN, Brandt WE, Russell PK, Dixon FT. Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes. *J Immunol* 1976;117(3):953-61.

Tomashefski Jr JF, Davies P, Boggis C, Greene R, Zapol WM, Reid LM. The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome. *The American journal of pathology* 1983;112(1):112.

Torres EM. Dengue. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2005.

Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(6):733-48.

Tseng CS, Lo HW, Teng HC, Lo WC, Ker CG. Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever. *Pathogens and Disease* 2005;43(1):99-102.

Tuchinda M, Dhorraintra B, Tuchinda P. Histamine content in 24-hour urine in patients with dengue haemorrhagic fever. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 1977;8(1):80-3.

Ubol S, Chareonsirisuthigul T, Kasisith J, Klungthong C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. *Virology* 2008;376(2):290-6.

Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanarooj S, Charoensirisuthikul T, Kasisith J. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases* 2008;197(10):1459-67.

Valle D; Pimenta DN; Cunha RV. Dengue: Teorias e Práticas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2015.

Varatharaj A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. *Neurology India* 2010;58(4):585.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;181(1):2-9.

Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International 1997:313-33.

Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, Ballesteros G, Guo FP, Balmaseda A, Karunaratne K, Harris E, Pinsky BA. Comparison of the FDA-approved CDC DENV-1-4 real-time reverse transcription-PCR with a laboratory-developed assay for dengue virus detection and serotyping. *Journal of clinical microbiology* 2013;51:3418-20.

Wali JP, Biswas A, Handa R, Aggarwal P, Wig N, Dwivedi SN. Dengue haemorrhagic fever in adults: a prospective study of 110 cases. *Trop Doct* 1999;29(1):27-30.

Wan SW, Lu YT, Huang CH, Lin CF, Anderson R, Liu HS, et al. Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural protein 1. *PLoS One* 2014;9(3):e92495.

- Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology* 1995;213(1):254-7.
- Wang TT, Sewatanon J, Memoli MJ, et al. IgG antibodies to dengue enhanced for FcγRIIIA binding determine disease severity. *Science* 2017;355:395-8.
- Wang WK, Sung TL, Tsai YC, Kao CL, Chang SM, King CC. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4472-8.
- Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in lung biology. *Annual review of physiology* 2013;75:569-91.
- World Health Organization (WHO). Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue hemorrhagic fever. New Delhi: WHO-Asia; 1999.
- World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Fact sheet no 117, dengue and dengue haemorrhagic fever [acesso em 16 ago 2016]. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/print.html>
- World Health Organization (WHO). Dengue, guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 2009.
- World Health Organization (WHO). Dengue and severe dengue. Fact sheet n°117, Geneva; 2015.
- Wiwanitkit V. Importance of platelet count in dengue infection: 35 casrs and literature review. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2004;10(4):399-402.
- Wiwanitkit V. Lung Diseases in Dengue. *J Resp. Research* 2015;1(1):7-9.
- Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Hao W, He LJ, et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44(8):2872-8.
- Yoskan S, Bhamarapravati N. Localization of dengue antigen in tissue from fatal cases of DHF. In: *Proceedings of the International Conference on Dengue Haemorrhagic Fever (Kuala Lumpur, Malaysia)*. Kuala Lumpur: University of Malaysia; 1983:406-10.
- Zagne SM, Alves VG, Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Tavares W. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88(6):677-9.
- Zara ALSA, Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE *Aedes aegypti* control strategies: a review. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2016;25(2):391-404.
- Zhang FC, Zhao H, Li LH, Jiang T, Hong WX, Wang J, et al. Severe dengue outbreak in Yunnan, China, 2013. *Int J Infect Dis* 2014;27:4-6.

8 ANEXOS

Anexo A

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER		
Informe o número do CAAE ou do Parecer:		
Número do CAAE:	Número do Parecer:	<input type="button" value="Pesquisar"/>
<input type="text" value="58571016.0.0000.5054"/>	<input type="text"/>	
<i>Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.</i>		
DETALHAMENTO		
Título do Projeto de Pesquisa:		
<input type="text" value="ALTERAÇÕES PULMONARES NA DENGUE"/>		
Número do CAAE:	Número do Parecer:	
<input type="text" value="58571016.0.0000.5054"/>	<input type="text" value="1693117"/>	
Quem Assinou o Parecer:	Pesquisador Responsável:	
<input type="text" value="FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA"/>	<input type="text" value="FERNANDA CAPELO BARROSO"/>	
Data Início do Cronograma:	Data Fim do Cronograma:	Contato Público:
<input type="text" value="15/07/2017"/>	<input type="text" value="15/09/2017"/>	<input type="text" value="Margarida Maria de Lima Pompeu"/>

Anexo B

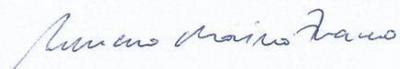
CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, LUCIANO MONTEIRO FRANCO, Diretor Técnico do Serviço de Verificação de óbitos Dr. Rocha Furtado da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, declaro estar ciente e de acordo com a participação desta instituição na execução do projeto de pesquisa denominado “**Alterações Pulmonares na Dengue**”, desenvolvido pela doutoranda Fernanda Capelo Barroso, CPF 208850833-34, do curso de Medicina Tropical - doutorado interinstitucional (DINTER) da Fundação Oswaldo Cruz com a Universidade Federal do Ceará. Essa aluna não possui vínculo empregatício ou funcional junto ao Serviço de Verificação de óbitos Dr. Rocha Furtado.

Afirmo disponibilizar a referida pesquisadora toda infra-estrutura necessária, fornecimento de blocos de parafina de pulmão das autópsias de casos de Dengue do período de 01 de janeiro de 2011 a 31 de dezembro de 2013, e as facilidades pertinentes à consecução do seu projeto, até o seu término.

Declaro conhecer e cumprir com as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS nº 466/2012. Estou ciente ainda de que o referido projeto de pesquisa somente poderá ser iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Fortaleza, 9 julho de 2014.



LUCIANO MONTEIRO FRANCO

Diretor Técnico do Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado

Anexo C

CARTA DE ANUENCIA

Ilma. Dra. Helena Maria Barbosa Carvalho
Coordenadora de Medicina Legal da Perícia Forense do Estado do Ceará

Solicito autorização para a realização da pesquisa intitulada “**ALTERAÇÕES PULMONARES NA DENGUE HUMANA**” nesta Coordenadoria, pela pesquisadora FERNANDA CAPELO BARROSO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Ao mesmo tempo peço autorização para que o nome desta instituição possa constar na pesquisa, bem como, em futuras publicações.

Na certeza de contar com a colaboração e empenho desta coordenadoria, agradeço antecipadamente a atenção, ficando à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Fortaleza, 01 de JULHO de 2014.

Concordo com a solicitação () Não concordo com a solicitação


Dra. Helena Maria Barbosa Carvalho
Coordenadora de Medicina Legal da Perícia Forense do Estado do Ceará

Anexo D



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Saúde

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA-LACEN-CE.

CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá, Diretor do Laboratório Central do Ceará (LACEN-CE), declaro estar ciente e de acordo com a participação desta instituição na realização do projeto de pesquisa denominado “**Alterações Pulmonares na Dengue**”, desenvolvido pela doutoranda **Fernanda Capelo Barroso**, CPF 208850833-34, do curso de Medicina Tropical - Doutorado Interinstitucional (DINTER) da Fundação Oswaldo Cruz com a Universidade Federal do Ceará. Essa aluna não possui vínculo empregatício ou funcional junto ao LACEN-CE.

Afirmo autorizar a referida pesquisadora, a utilização dos resultados de 01 de janeiro de 2011 a 31 de dezembro de 2012 da sorologia, RT-PCR e Imunoistoquímica dos casos de diagnóstico de Dengue que foram necropsiados no Serviço de Verificação de óbitos Dr. Rocha Furtado do Estado do Ceará (SVO-CE).

Declaro conhecer e cumprir com as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS nº 466/2012. Estou ciente ainda de que o referido projeto de pesquisa somente poderá ser iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Fortaleza, 16 julho de 2014.

Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá.
Diretora do Laboratório Central (LACEN – CE).

Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá
CPF: 210.559.633-91
DIRETOR DO LACEN.

LACEN-CE - Av. Barão de Studart, 2405 – Aldeota – Fortaleza – CE - CEP: 60120-002
Fone: 3101.1472 / 3101.1480 Fax: 3101.1485 – e-mail: lacen@lacen.ce.gov.br

Anexo E



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Saúde

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA-LACEN-CE.

CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá, Diretor do Laboratório Central do Ceará - LACEN-CE, declaro estar ciente e de acordo com a participação desta instituição na realização do projeto de pesquisa denominado "**Alterações Pulmonares na Dengue**", desenvolvido pela doutoranda Fernanda Capelo Barroso, CPF 208850833-34, do curso de Medicina Tropical - Doutorado Interinstitucional (DINTER) da Fundação Oswaldo Cruz com a Universidade Federal do Ceará. Essa aluna não possui vínculo empregatício ou funcional junto ao LACEN-CE.

Afirmo autorizar a referida pesquisadora, a utilização dos os resultados de 01 de janeiro a 31 dezembro de 2013, da sorologia, da RT-PCR e da Imunoistoquímica dos casos de diagnóstico de Dengue que foram necropsiados no Serviço de Verificação de óbitos Dr. Rocha Furtado do Estado do Ceará (SVO-CE).

Declaro conhecer e cumprir com as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS nº 466/2012. Estou ciente ainda de que o referido projeto de pesquisa somente poderá ser iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Fortaleza, 26 abril de 2016



Dr. Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá
Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN - CE

Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá
CPF: 210.559.633-01
DIRETOR DO LACEN.

LACEN-CE - Av. Barão de Studart, 2405 - Aldeota - Fortaleza - CE - CEP: 60120-002
Fone: 3101.1472 / 3101.1480 Fax: 3101.1485 - e-mail: lacen@lacen.ce.gov.br