

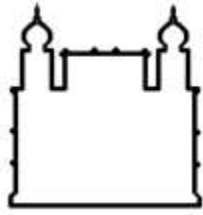
**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz**

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**ESTUDO DA IMUNOPATOGÊNESE EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS DE
CASOS FATAIS DE DENGUE EM CRIANÇAS: DETECÇÃO DO
ANTÍGENO VIRAL, PERFIL DE CITOCINAS E MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS.**

LEANDRO JUNQUEIRA MORAGAS

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz**

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LEANDRO JUNQUEIRA MORAGAS

**ESTUDO DA IMUNOPATOGÊNESE EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS DE
CASOS FATAIS DE DENGUE EM CRIANÇAS: DETECÇÃO DO
ANTÍGENO VIRAL, PERFIL DE CITOCINAS E MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS.**

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção
do título de mestre em Medicina Tropical**

Orientador: Dr. Marciano Viana Paes

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020

Moragas, Leandro .

ESTUDO DA IMUNOPATOGÊNESE EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS DE CASOS FATAIS DE DENGUE EM CRIANÇAS: DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL E PERFIL DE CITOCINAS. / Leandro Moragas, Marciano Viana Paes - Rio de Janeiro, 2020.

86 f.; il.

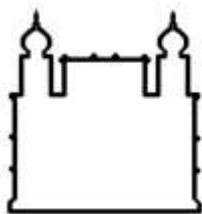
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

Orientador: Marciano Viana Paes .

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Dengue . 2. Imunopatogênese. 3. Citocinas. 4. Ultraestrutura. 5. Crianças . I. , Marciano Viana Paes. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz**

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: LEANDRO JUNQUEIRA MORAGAS

**ESTUDO DA IMUNOPATOGÊNESE EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS DE
CASOS FATAIS DE DENGUE EM CRIANÇAS: DETECÇÃO DO
ANTÍGENO VIRAL, PERFIL DE CITOCINAS E MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS.**

ORIENTADOR: Dr. Marciano Viana Paes

Aprovada em: 14/02/2020

EXAMINADORES:

**Profa. Dra. Elzinandes de Azeredo Braga – Presidente – FIOCRUZ/IOCRJ
Prof. Dr. Damião Carlos Moraes dos Santos – Universidade Estácio de Sá -
Escola de Medicina
Profa. Dra. Ester Maria Motta – FIOCRUZ/ IOC/RJ
Profa. Dra. Lívia Melo Villar FIOCRUZ/IOC/ RJ
Profa. Dra. Jemima Fuentes Ribeiro da Silva – UERJ/RJ**

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente, a Deus, que me concedeu saúde física e psicológica durante toda essa caminhada, me cercado de pessoas amáveis e compreensíveis que sempre me deram todo o suporte necessário, em especial;

À minha família: Minha mãe com seu exemplo de busca constante pelo conhecimento, o meu pai como exemplo de estrutura inabalável e sempre disposta a ajudar o próximo, minha irmã pelo exemplo de mãe e doutora, que nos dias de hoje ganha uma aura ainda mais especial, e meu irmão pelo exemplo de que sonhos são pra serem perseguidos e sonhados juntos;

Aos amigos que são nossa segunda família: o Beto que sempre sabe a hora exata de me fazer dar uma pausa nas leituras ir à praia e que sabia as traduções que não achava em nenhum dicionário. Aos colegas da clínica veterinária que sempre vinham tirar dúvidas das principais “fake-news” que estavam circulando. E aos amigos que cursaram comigo o mestrado em medicina tropical 2018 da FioCruz, sempre me salvando e me lembrando de algum seminário de última hora;

Ao meu orientador, Dr. Marciano Viana Paes, que foi um achado garimpado, a quem sou realmente muito grato pela paciência que teve para comigo e pela confiança em mim depositada para que juntos pudéssemos colocar em prática esse trabalho tão bonito e de que tanto me orgulho;

Ao Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMed) por ter me recebido com braços abertos e muita simpatia. Em especial a Kissila Rabelo, Natalia Gedeão, Felipe Alves, Lucca Siqueira e Hanna;

Ao Dr. Fernando Rosman e Dr. Ronaldo Mohana-Borges pela parceria e colaboração; A parceria com o Hospital Universitário Gaffrée Guinle (HUGG - UNIRIO), que receberam nossa equipe muito cordialmente, desde o técnico Geraldo com sua longa experiência no corte de lâminas e colorações, até o Dr. Professor Basílio de Oliveira que, além de ceder seus espaços para a obtenção das fotos aqui publicadas, cedeu também grande parte de seu conhecimento;

A organização do curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, nas pessoas de Dra. Martha Mutis e Livia Mangeon, pelos grandiosos eventos que tive a oportunidade de participar dentro e fora da instituição, às disciplinas que serviram para fortificar meu embasamento científico, a todos os professores e palestrantes convidados, que vieram multiplicar seus conhecimentos conosco;

Às bancas examinadoras, atual e passadas, por terem aceitado o convite e pelas preciosas dicas oferecidas durante a confecção deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Meu mais sincero obrigado.

“Num país como o Brasil, manter a esperança viva é em si um ato revolucionário”.

Paulo Freire

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DA IMUNOPATOGÊNESE EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS DE CASOS FATAIS DE DENGUE EM CRIANÇAS: DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL, PERFIL DE CITOCINAS E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.

RESUMO (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL)

LEANDRO JUNQUEIRA MORAGAS

A dengue é considerada a arbovirose de maior importância médica devido sua alta taxa de mortalidade e morbidade. A maioria dos casos é assintomática ou autolimitante, porém alguns casos podem evoluir para a forma grave da doença e até a morte. Já se sabe que o fígado e o pulmão são alguns dos órgãos alvos do vírus do dengue. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi investigar os aspectos da patogênese em amostras de tecidos como fígado, pulmão, língua e a traqueia, de três casos fatais dengue em crianças (8 a 12 anos). No fígado foram observadas áreas de necrose hepatocitária, macro e microesteatose, associadas à áreas de hemorragia e dilatação de capilares sinusoidais. Foi mostrado também infiltrado inflamatório no interior dos capilares sinusoidais e ao redor do espaço porta. O pulmão apresentou áreas difusas de espessamento de septo, hemorragia e edema, também com áreas de infiltrado inflamatório, além de macrófagos alveolares hiperplásicos. Os principais danos observados, no fígado e no pulmão, foram quantificados, utilizando uma escala subjetiva com atribuição de diferentes graus, revelando diferenças significativas. Em relação a traqueia foi observada traqueíte focal com metaplasia escamosa e necrose da mucosa com focos hemorrágicos no lúmen traqueal. Na língua foram vistas áreas de hemorragia e hiperplasia dos folículos linfóides. A proteína viral NS3 foi detectada em diferentes grupos celulares de todos os órgãos estudados. No fígado, estavam presentes em hepatócitos, células de Kupffer, macrófagos circulantes e células endoteliais; no pulmão, nos macrófagos alveolares e nos pneumócitos de tipo II; além de estarem presentes também nas células endoteliais e em monócitos da lamina própria da traqueia e nos macrófagos ao redor da camada muscular abaixo do epitélio da língua. A expressão de TNF- α foi detectada em macrófagos, células de Kupffer e células endoteliais ao redor do espaço porta e da veia centro lobular, no fígado. Foi observado também um aumento quantitativo na contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+ ao redor do espaço porta e capilares pulmonares. Um aumento na expressão das citocinas e mediadores inflamatórios como RANTES, VEGF-R2, VCAM-1 e MMP9 foi observado em células do endotélio dos capilares sinusoidais e ao redor do espaço porta, ao redor das veias pulmonares e em monócitos e macrófagos alveolares, sugerindo uma alteração na permeabilidade vascular nos tecidos hepáticos e pulmonares, respectivamente. Esses achados irão contribuir para a investigação das principais células e mediadores envolvidos na patogênese do dengue, ajudando a esclarecer os mecanismos envolvidos durante uma infecção em crianças.

OSWALDO CRUZ INSTITUTE

INJURY IN MULTIPLE ORGANS OF FATAL CASES DENGUE IN CHILDREN: VIRAL DETECTION, PROFILE OF CYTOKINES AND INFLAMMATORY MEDIATORS.

ABSTRACT (MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL).

LEANDRO JUNQUEIRA MORAGAS

Dengue is an important arbovirus today due to its high mortality and morbidity rates. In most cases, symptoms are self-limiting, but some cases may develop into severe forms and death. The pathogenesis is not yet fully elucidated, but it is known that liver and lung are the main targets of the virus, causing painful hepatomegaly and increased liver transaminases and hemorrhage, edema and thickening membrane in the lung. This study aims to investigate liver, lung, tracheal and tongue changes caused by DENV in three fatal cases of dengue (IgM+) in children (8 to 12 years) hospitalized in Municipal Jesus Hospital (Rio de Janeiro) from 2008 to 2012. In the liver was observed areas of hepatocytes necrosis, macrovesicular and microvesicular steatosis associated with bleeding areas, dilatation of sinusoidal capillaries, mononuclear infiltrates in sinusoidal capillaries and in the portal space. At lung was showed diffuse areas of septal thickening, edema, and hemorrhage with the presence of mononuclear infiltrates and hyperplastic alveolar macrophages. Focal tracheitis with squamous metaplasia and necrosis in the mucosa and bleeding in the tracheal lumen. Tongue was also observed hemorrhages and hyperplastic lymphoid follicle. NS3 viral protein was detected in hepatocytes, Kupffer cells, circulating macrophages and endothelial cells in liver tissue; alveolar macrophages and type II pneumocytes in the lung; endothelial cells and monocytes in the tracheal lamina propria; and in macrophages around the muscle bundle below the tongue epithelium, showing its replication in these places. TNF- α expression was observed in macrophages, Kupffer cells and portal space endothelial cells and in the centrilobular vein endothelium. In addition to a quantitative increase in TCD8 + lymphocytes in the portal space and pulmonary capillaries. The expression of RANTES, VCAM 1 and VEGF-R2 was shown in sinusoidal capillary endothelial cells and portal space suggesting a change in vascular permeability in liver tissue. These results will contribute to the investigation of the main cells involved in dengue pathogenesis, elucidating the mechanisms involved during dengue infection in children.

Índice

| | |
|---|------|
| Resumo | VI |
| Abstract | VII |
| Índice das figuras | XI |
| Índice dos gráficos | XIII |
| Índice das tabelas | XIV |
| Índice das siglas e abreviações | XV |
| 1 – Introdução | 01 |
| 1.1 – A dengue | 01 |
| 1.2 – A Epidemiologia | 01 |
| 1.2.1 – No Mundo | 01 |
| 1.2.2 – Nas Américas | 03 |
| 1.3 – Os vetores | 04 |
| 1.4 – O vírus do dengue e o ciclo replicativo | 05 |
| 1.5 – As proteínas virais | 07 |
| 1.6 – Os sinais e sintomas | 08 |
| 1.7 – A Patogênese | 10 |
| 1.7.1 – A patogênese do dengue no fígado | 11 |
| 1.7.2 – A patogênese do dengue no pulmão | 12 |
| 1.7.3 – A patogênese do dengue na traquéia | 12 |
| 1.7.4 – A patogênese do dengue na língua | 12 |
| 1.8 – A morfologia dos tecidos | 12 |
| 1.8.1 – Morfologia do fígado | 12 |
| 1.8.2 – Morfologia do pulmão | 13 |
| 1.8.3 – Morfologia da traquéia | 15 |
| 1.8.4 – Morfologia da língua | 15 |
| 1.9 – A resposta imune na dengue | 16 |
| 1.9.1 – A Teoria da tempestade de citocinas | 18 |
| 1.9.2 – A Teoria da ADE | 19 |
| 1.9.3 – A Teoria do Pecado Antigênico Original | 20 |
| 2 – Justificativa | 21 |
| 3- Objetivos | 22 |
| 3.1 – Objetivo Geral | 22 |
| 3.2 – Objetivos Específicos | 22 |
| 4 – Materiais e Métodos | 23 |
| 4.1 – Paciente 1 | 23 |
| 4.2 – Paciente 2 | 23 |
| 4.3 – Paciente 3 | 23 |
| 4.4 – Controle | 23 |
| 4.5 – O processamento das amostras | 24 |
| 4.6 – As colorações | 24 |
| 4.6.1 – Coloração Hematoxilina e Eosina (H.E.) | 24 |
| 4.6.2 – Coloração Tricrômio de Masson (T.M.) | 24 |
| 4.6.3 – Coloração Periódico Ácido Reativo de Schiff (P.A.S) | 24 |
| 4.6.4 – Coloração Picrossírius | 25 |
| 4.7 – A imunohistoquímica | 25 |
| 4.8 – Gráfico da quantificação dos linfócitos T CD8+ e macrófagos (CD68+) no fígado e no pulmão | 25 |

| | |
|--|----|
| 4.9 – Gráfico da avaliação semiquantitativa dos danos no fígado e no pulmão dos casos fatais de dengue em crianças | 26 |
| 4.10 – Considerações Éticas | 26 |
| 5 – Resultados | 27 |
| 5.1 – Hemograma | 27 |
| 5.2 – Bioquímica | 28 |
| 5.3 – Histopatologia hepática | 29 |
| 5.3.1 – Coloração hematoxilina e eosina (HE) | 29 |
| 5.3.2 – Coloração Tricrômio de Masson | 30 |
| 5.3.3 – Coloração Ácido Periódico de Schiff | 31 |
| 5.3.4 – Coloração Picrosirius | 32 |
| 5.4 – Avaliação semiquantitativa dos danos no fígado | 33 |
| 5.4.1 – Grau de fibras colágenas | 33 |
| 5.4.2 – Grau de micro e macroesteatose | 34 |
| 5.4.3 – Grau de degeneração nuclear e necrose | 35 |
| 5.4.4 – Grau de hemorragia, edema e congestão vascular | 36 |
| 5.4.5 – Grau de infiltrado inflamatório | 37 |
| 5.5 – Imunohistoquímica hepática | 38 |
| 5.5.1 – Detecção de linfócitos T CD4+ em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 38 |
| 5.5.2 – Detecção de linfócitos T CD8+ em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 39 |
| 5.5.3 – Quantificação do número de linfócitos T CD8+ no tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 40 |
| 5.5.4 – Detecção de macrófagos (CD68+) em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 41 |
| 5.5.5 – Quantificação do número de macrófagos (CD68+) no tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 42 |
| 5.5.6 – Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 43 |
| 5.5.7 – Detecção de TNF- α em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 44 |
| 5.5.8 – Detecção de RANTES em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 45 |
| 5.5.9 – Detecção de VEGF-R2 em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 46 |
| 5.5.10 – Detecção de VCAM-1 em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 47 |
| 5.5.10 – Detecção de MMP9 em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças | 48 |
| 5.5.11 – Detecção do antígeno de DENV2, pelo anticorpo 3H5 em tecido hepático do caso 1 | 49 |
| 5.6 – Histopatologia pulmonar | 50 |
| 5.6.1 – Coloração Hematoxilina e Eosina (HE) | 50 |
| 5.6.2 – Coloração Tricrômio de Masson (TM) | 51 |
| 5.6.3 – Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) | 52 |
| 5.6.4 – Coloração Picrosirius | 53 |
| 5.7 – Análise semiquantitativa dos danos no pulmão | 54 |
| 5.7.1 – Grau de espessamento de septo e membrana hialina | 54 |
| 5.7.2 – Grau de edema e hemorragia | 55 |

| | |
|--|----|
| 5.7.3 – Grau de infiltrado inflamatório | 56 |
| 5.8 – Imunohistoquímica pulmonar | 57 |
| 5.8.1 – Detecção de linfócitos T CD4+ em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 57 |
| 5.8.2 - Detecção de linfócitos T CD8+ em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 58 |
| 5.8.3 – Quantificação do número de linfócitos T CD8+ no tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 59 |
| 5.8.4 – Detecção da macrófagos (CD68+) em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 60 |
| 5.8.5 – Quantificação do número de macrófagos (CD68+) no tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 61 |
| 5.8.6 – Detecção da antígeno da proteína NS3 em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 62 |
| 5.8.7 – Detecção de TNF- α em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 63 |
| 5.8.8 – Detecção de RANTES em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 64 |
| 5.8.9 – Detecção de VEGF-R2 em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 65 |
| 5.8.10 – Detecção de VCAM-1 em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 66 |
| 5.8.11 – Detecção de MMP9 em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças | 67 |
| 5.9 – Histopatologia da língua | 68 |
| 5.9.1 – Coloração Hematoxilina e Eosina (HE) | 68 |
| 5.10 – Imunohistoquímica da língua | 68 |
| 5.10.1 - Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido da língua de casos fatais de dengue em crianças | 68 |
| 5.11 - Histopatologia da traquéia | 69 |
| 5.11.1 – Coloração Hematoxilina e Eosina (HE) | 69 |
| 5.12 – Imunohistoquímica da traquéia | 69 |
| 5.12.1 - Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido da traquéia de casos fatais de dengue em crianças | 69 |
| 6 – Discussão | 70 |
| 7 – Perspectivas | 77 |
| 8 – Conclusão | 78 |
| 9 – Referências Bibliográficas | 79 |

Índice das Figuras

| | | |
|------------------|--|-----------|
| <i>Figura 01</i> | <i>Mapa das taxas de incidência do dengue</i> | <i>02</i> |
| <i>Figura 02</i> | <i>Partícula viral do DENV</i> | <i>05</i> |
| <i>Figura 03</i> | <i>Código genético do DENV</i> | <i>06</i> |
| <i>Figura 04</i> | <i>Ciclo replicativo do DENV</i> | <i>06</i> |
| <i>Figura 05</i> | <i>Representação de um lóbulo hepático e suas estruturas</i> | <i>13</i> |
| <i>Figura 06</i> | <i>Representação do pulmão e seus lobos</i> | <i>14</i> |
| <i>Figura 07</i> | <i>Representação do parênquima pulmonar</i> | <i>14</i> |
| <i>Figura 08</i> | <i>Esquema da anatomia da traquéia</i> | <i>15</i> |
| <i>Figura 09</i> | <i>Representação esquemática da língua e papilas linguais</i> | <i>16</i> |
| <i>Figura 10</i> | <i>Teoria da Tempestade de citocinas no dengue</i> | <i>18</i> |
| <i>Figura 11</i> | <i>Teoria da Facilitação anticorpo dependente</i> | <i>19</i> |
| <i>Figura 12</i> | <i>Teoria do Pecado antigênico original</i> | <i>20</i> |
| <i>Figura 13</i> | <i>Cortes histológicos de tecido hepático de criança controle e de tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV e corados com H.E.</i> | <i>29</i> |
| <i>Figura 14</i> | <i>Cortes histológicos de tecido hepático de criança controle e de tecidos hepáticos de crianças infectadas com o DENV e corados com Tricrômio de Masson</i> | <i>30</i> |
| <i>Figura 15</i> | <i>Cortes histológicos de tecido hepático de criança controle e de tecidos hepáticos de crianças infectadas com o DENV e corados com P.A.S.</i> | <i>31</i> |
| <i>Figura 16</i> | <i>Cortes histológicos de tecido hepático de criança controle e de tecidos hepáticos de crianças infectadas com o DENV e corados com Picrosírius</i> | <i>32</i> |
| <i>Figura 17</i> | <i>Detecção de L T CD4+ em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>38</i> |
| <i>Figura 18</i> | <i>Detecção de L T CD8+ em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>39</i> |
| <i>Figura 19</i> | <i>Detecção de CD68+ em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>41</i> |
| <i>Figura 20</i> | <i>Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>43</i> |
| <i>Figura 21</i> | <i>Detecção de TNF-α em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>44</i> |
| <i>Figura 22</i> | <i>Detecção de RANTES em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>45</i> |
| <i>Figura 23</i> | <i>Detecção de VEGF-R2 em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>46</i> |
| <i>Figura 24</i> | <i>Detecção de VCAM-1 em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>47</i> |
| <i>Figura 25</i> | <i>Detecção de MMP9 em tecido hepático de criança controle e em tecidos hepáticos de crianças infectadas com DENV</i> | <i>48</i> |
| <i>Figura 26</i> | <i>Detecção do antígeno da proteína E do DENV2 em tecido hepático de criança infectada com DENV</i> | <i>49</i> |
| <i>Figura 27</i> | <i>Cortes histológicos de tecido pulmonar de criança controle e de tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV e corados com H.E.</i> | <i>50</i> |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 28 | <i>Cortes histológicos de tecidos pulmonares de criança controle e de tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV e corados com Tricrômio de Masson</i> | 51 |
| Figura 29 | <i>Cortes histológicos de tecidos pulmonares de criança controle e de tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV e corados com P.A.S.</i> | 52 |
| Figura 30 | <i>Cortes histológicos de tecidos pulmonares de criança controle e de tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV e corados com Picrosúrius</i> | 53 |
| Figura 31 | <i>Detecção de T CD4+ em tecidos pulmonares de criança controle e em tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 57 |
| Figura 32 | <i>Detecção de T CD8+ em tecidos pulmonares de criança controle e de tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 58 |
| Figura 33 | <i>Detecção de CD68+ em tecidos pulmonares de criança controle e em tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 60 |
| Figura 34 | <i>Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecidos pulmonares de criança controle e em tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 62 |
| Figura 35 | <i>Detecção de TNF-α em tecidos pulmonares de criança controle e em tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 63 |
| Figura 36 | <i>Detecção de RANTES em tecidos pulmonares de criança controle e em tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 64 |
| Figura 37 | <i>Detecção de VEGF-R2 em tecidos pulmonares de criança controle e de tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 65 |
| Figura 38 | <i>Detecção de VCAM-1 em tecidos pulmonares de criança controle e em tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 66 |
| Figura 39 | <i>Detecção de MMP9 em tecidos pulmonares de criança controle e em tecidos pulmonares de crianças infectadas com DENV</i> | 67 |
| Figura 40 | <i>Cortes histológicos de tecido da língua de criança infectada com DENV e corado com H.E.</i> | 68 |
| Figura 41 | <i>Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido da língua de criança infectada com DENV</i> | 68 |
| Figura 42 | <i>Cortes histológicos de tecido da traquéia de criança infectada com DENV e corado com H.E</i> | 69 |
| Figura 43 | <i>Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido da traqueia de criança infectada com DENV</i> | 69 |

Índice dos Gráficos

| | | |
|------------|--|----|
| Gráfico 01 | <i>Taxas de incidência do dengue nas Américas e no Brasil, desde 1980 até 2019</i> | 03 |
| Gráfico 02 | <i>Avaliação dos níveis de leucócitos e de plaquetas dos três casos fatais de dengue em crianças</i> | 27 |
| Gráfico 03 | <i>Avaliação dos níveis séricos de AST e ALT dos três casos fatais de dengue em crianças</i> | 28 |
| Gráfico 04 | <i>Avaliação semiquantitativa de fibras colágenas no fígado de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 33 |
| Gráfico 05 | <i>Avaliação semiquantitativa do grau de degeneração gordurosa no fígado de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 34 |
| Gráfico 06 | <i>Avaliação semiquantitativa do grau de dano celular no fígado de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 35 |
| Gráfico 07 | <i>Avaliação semiquantitativa do grau da alteração vascular no fígado de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 36 |
| Gráfico 08 | <i>Avaliação semiquantitativa do grau de infiltrado inflamatório no fígado de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 37 |
| Gráfico 09 | <i>Quantificação do número de linfócitos T CD8+ por campo em tecidos hepáticos de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 40 |
| Gráfico 10 | <i>Quantificação do número de macrófagos (CD68+) por campo em tecidos hepáticos de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 42 |
| Gráfico 11 | <i>Análise semiquantitativa do grau de espessamento de septo em tecidos pulmonares de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 54 |
| Gráfico 12 | <i>Análise semiquantitativa do grau de alteração vascular em tecidos pulmonares de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 55 |
| Gráfico 13 | <i>Análise semiquantitativa do grau de infiltrado inflamatório em tecidos pulmonares de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 56 |
| Gráfico 14 | <i>Quantificação do número de linfócitos T CD8+ por campo em tecidos pulmonares de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 59 |
| Gráfico 15 | <i>Quantificação do número de macrófagos (CD68+) por campo em tecidos pulmonares de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | 61 |

Índice das Tabelas

| | | |
|------------------|--|-----------|
| <i>Tabela 01</i> | <i>Níveis de gravidade do dengue e seus sintomas</i> | <i>09</i> |
| <i>Tabela 02</i> | <i>Lista dos anticorpos utilizados para a realização da imunohistoquímica</i> | <i>25</i> |
| <i>Tabela 03</i> | <i>Tabela da análise estatística da contagem de linfócitos T CD8+ em tecidos hepáticos de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | <i>40</i> |
| <i>Tabela 04</i> | <i>Tabela da análise estatística da contagem de macrófagos (CD68+) em tecidos hepáticos de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | <i>42</i> |
| <i>Tabela 05</i> | <i>Tabela da análise estatística da contagem de células T CD8+ em tecidos pulmonares de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | <i>59</i> |
| <i>Tabela 06</i> | <i>Tabela da análise estatística da contagem de macrófagos (CD68+) em tecidos pulmonares de crianças controles e de crianças infectadas com DENV</i> | <i>61</i> |

Índice de siglas e abreviaturas

| | |
|-----------------|---|
| ADE | Aumento da replicação viral dependente de anticorpos (do inglês “antibody dependent enhancement”) |
| Ae. | Gênero Aedes |
| ALT | Alanina aminotransferase (do inglês, “Alanine aminotransferase”) |
| AST | Aspartato aminotransferase (do inglês, “Aspartate aminotransferase”) |
| C3a | Complemento 3a |
| C5a | Complemento 5a |
| CD68+ | Macrófago |
| CXCL8 | Interleucina 8 (|
| DENV | Vírus do dengue |
| DENV-1 | Vírus do dengue sorotipo 1 |
| DENV-2 | Vírus do dengue sorotipo 2 |
| DENV-3 | Vírus do dengue sorotipo 3 |
| DENV-4 | Vírus do dengue sorotipo 4 |
| d.C. | Depois de Cristo |
| d.p.i. | Dias pós infecção |
| dsRNA | Fita dupla de RNA (double strain RNA) |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FcγR | Receptores de Fc gama (do inglês, “Fc gamma receptors”) |
| FD | Febre do dengue |
| FDH | Febre do dengue hemorrágica |
| H.E. | Hematoxilina e eosina |
| H.I.V. | Vírus da Imunodeficiência humana (do inglês, “human immunodeficiency virus”) |
| IFN | Interferon |
| HLA | Antígeno Leucocitário Humano (Human leukocyte antigen) |
| ICAM | Molécula de adesão intercelular (Intercellular cell adhesion molecule) |
| IL | Interleucina |
| i.v. | Intravenosa |
| JEV | Vírus da encefalite Japonesa (Japanese Encephalitis Virus) |
| Kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| MCP-1 | Proteína quimioatraente de monócitos – 1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) |
| μL | Microlitro |
| mL | Mililitro |
| mm ³ | Milímetro cúbico |
| NF-κB | Fator nuclear kappa B (Nuclear factor kappa B) |
| NK | Natural killer |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| ORF | Fase de leitura aberta (do inglês, “open-reading frame”) |
| PAS | Ácido Periódico de Schiff (Periodic Acid Schiff) |
| PAHO | Organização Pan Americana de Saúde (do inglês “Pan American Health Organization”) |
| PBS | Tampão fosfato salino (do inglês “Phosphate buffered saline”) |
| Proteína C | Proteína do capsídeo |

| | |
|---------------|--|
| Proteína E | Proteína do envelope |
| Proteína NS1 | Proteína não estrutural 1 |
| Proteína NS2a | Proteína não estrutural 2A |
| Proteína NS2b | Proteína não estrutural 2B |
| Proteína NS3 | Proteína não estrutural 3 |
| Proteína NS4a | Proteína não estrutural 4A |
| Proteína NS4b | Proteína não estrutural 4B |
| Proteína NS5 | Proteína não estrutural 5 |
| Proteína prM | Proteína precursora de membrana |
| PAMPs | Padrões moleculares associados à patógenos (do inglês Pathogen-associated molecular pattern) |
| PRRs | Receptor de reconhecimento de padrões (do inglês Pattern recognition receptors) |
| RANTES | Acrônimo para Regulada por Ativação, Normal T Expressa e Secretada |
| RE | Retículo Endoplasmático |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| SARA | Síndrome da Agustia Respiratória Aguda |
| SCD | Síndrome do choque do dengue |
| Spp | Espécies pertencentes ao mesmo gênero |
| ssRNA | Fita simples de RNA (do inglês single strain RNA) |
| T CD4+ | Linfócito T CD4 |
| T CD8+ | Linfócito T CD8 |
| TGF | Fator de transformação de crescimento (do inglês Transforming growth factor) |
| TLR | Receptor do tipo Toll (do inglês Toll like receptor) |
| TM | Tricrômio de Masson |
| TNF | Fator de necrose tumoral (do inglês Tumoral necrosis factor) |
| VCAM1 | Molécula de Adesão vascular (do inglês Vascular cell adhesion molecule) |
| VEGF-R2 | Receptor 2 do Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês Vascular endothelial growth factor receptor 2) |
| WNV | Vírus do Nilo Ocidental (do inglês West Nile Virus) |
| YFV | Vírus da Febre Amarela (do inglês Yellow Fever Virus) |

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – A dengue

A dengue é uma arbovirose, ou seja, uma virose transmitida por um artrópode infectado com o vírus dengue (DENV). No caso do dengue, os vetores são as fêmeas do mosquito do gênero *Aedes*. É considerada pela Organização Mundial da Saúde a arbovirose de maior importância em saúde pública, devido sua alta mortalidade e morbidade. Está amplamente disseminada em países tropicais e subtropicais, com variações locais devido a frequência de chuvas, temperatura e intensa urbanização. Em várias partes do mundo é uma pandemia na iminência de ocorrer, alavancada pelas rápidas mudanças climáticas, desmatamento desordenado, grande fluxo migratório, ocupação não planejada de áreas urbanas, precariedade das condições sanitárias que favorecem a disseminação do mosquito vetor e do vírus (Gubler, 2011). Ocorre principalmente em áreas pobres, subúrbios e regiões periurbanas. De acordo com a OMS, é a segunda doença febril mais diagnosticada, após a malária.

Até a década de 50, a dengue era conhecida como uma doença causadora de epidemias caracterizadas por febre aguda exantemática autolimitante e com baixa mortalidade. Esse conceito mudou após o aparecimento de casos com relatos de choque e hemorragias gastrointestinais associados a quadros de dengue (Hammon et al., 1960).

Uma vez infectado, o ser humano se torna o principal reservatório do vírus, servindo de fonte para mosquitos que ainda não estão infectados. A fêmea do mosquito *Aedes spp* ingere o vírus do dengue ao fazer o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado com o vírus do dengue durante o período de viremia, caracterizado por febre alta que pode durar de 2 a 10 dias. Após um período de incubação extrínseco de 8 a 12 dias, o mosquito é capaz de transmitir o vírus e passa a albergar o vírus em sua glândula salivar. Ao fazer novo repasto sanguíneo, a fêmea regurgita a saliva contendo anticoagulantes e o vírus. Após um período de incubação intrínseco de 3 a 14 dias, em média 4 a 6 dias, os sintomas se manifestam (Siler et. al, 1926; Gubler, 1998).

A mortalidade por dengue pode ser drasticamente reduzida se forem realizados diagnósticos corretos na fase inicial, possibilitando uma administração de fluidos mais eficiente. Testes prognósticos que detectam biomarcadores, associados com a gravidade do dengue, permitiriam uma melhor triagem e melhor encaminhamento para o tratamento dos pacientes. Porém, as manifestações clínicas são atualmente as únicas informações que o clínico tem para prever a gravidade da doença. Com o conhecimento atual, as citocinas e moléculas encontradas durante a evolução da doença, poderiam ser utilizadas para a produção de novos testes, uma vez que a tecnologia vem avançando e permitindo a análise de múltiplos biomarcadores com pouco volume de sangue (Katzelnick et al., 2017).

1.2 – A epidemiologia

1.2.1 – No mundo

Relatos de uma doença clinicamente compatível com a dengue datam de 265-420 d.C. Porém o vírus só foi isolado em 1943 no Japão. Em 1945, no Havaí, vírus semelhantes, mas com características antigênicas diferentes foram isolados e receberam o nome, respectivamente, de DENV1 e DENV2 (Hotta, 1953). Até a década de 50, a dengue era considerada endêmica somente no Sudeste Asiático, quando houve a ocorrência de várias epidemias de dengue desde a Índias até as ilhas do Pacífico (Wilder-Smith et al., 2017). Mas, ainda assim, era considerada uma

doença sem muita gravidade, até que uma epidemia nas Filipinas e Tailândia (Agrupis et al., 2019), caracterizada por intensa plaquetopenia e hemorragia, foi reconhecida pela OMS como dengue hemorrágica. Nessa epidemia foram isolados os sorotipos DENV3 e DENV4 (Barreto e Teixeira, 2008).

Acredita-se que, até a segunda guerra mundial, as epidemias de dengue não eram tão graves devido ao fato dos meios de transportes serem lentos e de baixo acesso, com isso, os surtos eram causados pelo mesmo sorotipo e de maneira sazonal, pois dependiam de uma nova geração de indivíduos suscetíveis. Com o fim da guerra e o surgimento de meios de transportes mais rápidos e acessíveis, os sorotipos se disseminaram se misturaram, causando quadros mais graves da doença e com intervalos de tempo menores (Barreto e Teixeira 2008).

A transmissão passou de 8,3 milhões de casos aparentes em 1990 para 58,7 milhões de casos aparentes em 2013. Com 8.277 mortes em 1992 para 11.302 mortes em 2010 (Araújo et al., 2017). Nos últimos anos, aproximadamente uma média de 50 a 100 milhões de casos aparentes são notificados por ano, com cerca de 22.000 mortes, principalmente em crianças (Stanaway et al., 2016).

Em 2011, as áreas tropicais foram consideradas hiperendêmicas, com os quatro sorotipos co-circulando (Gubler, 2011). A incidência do dengue vêm aumentando consideravelmente nas últimas décadas, devido a migração populacional, ocupação urbana desordenada com péssima infraestrutura sanitária, invasão e destruição de áreas de florestas, associadas as mudanças climáticas que permitem a disseminação do mosquito transmissor aumentando a quantidade de pessoas expostas ao vírus (Mota et al., 2016).

Cerca de 80% dos casos são assintomáticos, além disso, muitos casos não são reportados ou são diagnosticados erroneamente. Estima-se que cerca de 2.5 bilhões de pessoas sejam expostas globalmente, sendo 975 milhões residentes em áreas urbanas de países tropicais e subtropicais no sudeste asiático, pacífico e nas américas. Estima-se que 390 milhões de pessoas sejam infectadas por ano, das quais

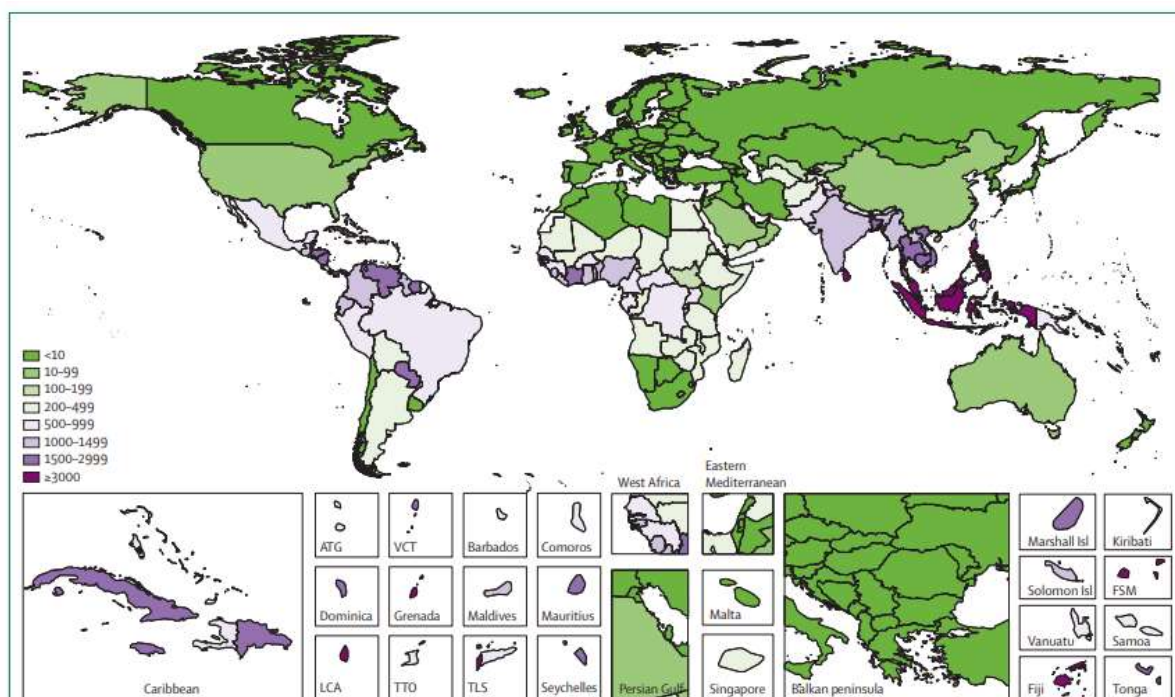


Figura 1 - Mapa das taxas de incidência do dengue (por 100.000 pessoas ao ano), em 2013. Adaptado de Bhatt et al., 2013.

96 milhões irão manifestar sintomas com alguma gravidade (Bhatt et al., 2013; Zou et al., 2019). Destes, cerca de 500.000 necessitam de hospitalização por dengue grave, principalmente as crianças, com uma taxa de mortalidade chegando a quase 5% em algumas áreas. Conseqüentemente, a dengue é considerada como uma das causas mais comuns de hospitalização e óbito em crianças residentes em áreas endêmicas. A transmissão também ocorre na África e nos países do mediterrâneo e em as áreas rurais (Gubler, 2004).

Atualmente, a transmissão do dengue é onipresente na área compreendida entre os trópicos, tendo a América latina e a Ásia como zonas de maior risco. A África apresenta baixa taxa de transmissão devido ao clima seco e devido a subnotificação. A proximidade com áreas de baixa renda e regiões peri-urbanas são as que apresentam maiores taxas de transmissão, principalmente quando associado a alta concentração populacional (Fig. 1) (Bhatt et al., 2013).

Além do aumento na incidência do dengue em países considerados endêmicos, novos países passaram a apresentar transmissão autóctone nos últimos anos, como por exemplo França e Croácia, em 2010 e Portugal, em 2012, o que contribuiu para a disseminação pela Europa, devido aos intensos fluxos migratórios de viajantes infectados (Ruche et al. 2010; Lourenço e Recker, 2014). Os quatro sorotipos do vírus do dengue são endêmicos em áreas urbanas e rurais de mais de 100 países tropicais e subtropicais (Stanaway et al. 2016) sendo uma das maiores causas de internação e óbito de adultos e jovens. A tendência é uma disseminação cada vez maior, devido ao um crescimento populacional sem precedentes e a facilitação do deslocamento de pessoas, animais e comércio via transporte aéreo (Gubler, 2011).

1.2.2 – Nas Américas e no Brasil

Após uma campanha de erradicação do mosquito vetor *Aedes aegypti* para controle da febre amarela, bem sucedida em 23 países durante a década de 50 e 60, a transmissão de dengue esteve sobre controle (Gubler, 1989). Com o final do suporte à campanha de erradicação, no início da década de 70, o vírus dengue voltou a reinfestar áreas onde havia sido eliminado além de ter alcançado áreas onde nunca havia sido reportado (Wilson e Chen 2002).

Em 1981, ocorreu uma grande epidemia em Cuba, com cerca de 300.000 casos, sendo 10.000 casos de dengue hemorrágica, com 158 óbitos, dos quais 101 em crianças (Werneck et al., 2018).

Uma segunda grande epidemia, ocorrida entre os anos de 1988 a 1990, na Venezuela, onde foram registrados mais de 3.000 casos de dengue hemorrágica. O DENV2 foi o sorotipo mais predominante em ambos casos (Wilson e Chen 2002).

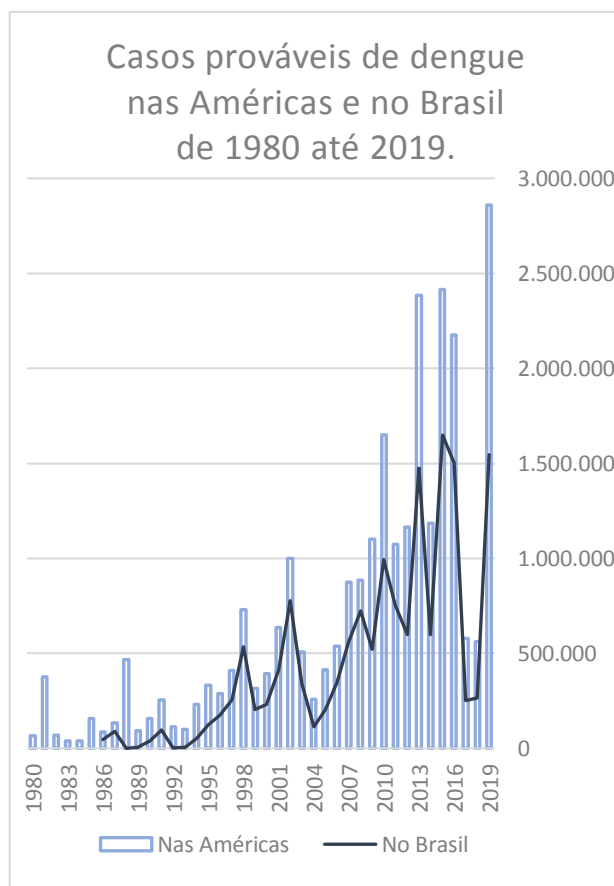


Gráfico 1 - Taxas de incidência do dengue nas Américas e no Brasil, desde 1980 até 2019. Adaptado de PAHO., 2017.

Na década de 90 ocorreram vários surtos associados aos quatro sorotipos do DENV. Em 1997, foi encontrado, pela primeira vez na América, um mosquito da espécie *Aedes albopictus* naturalmente infectado com o vírus do dengue, durante um surto da doença no México (Ibañez-Bernal et al., 1997).

A primeira grande epidemia registrada no Brasil foi entre 1981 e 1982, sendo isolados os DENV1 e DENV4. Em 1998, foram reportados mais de 500.000 casos afetando principalmente o estado do Rio de Janeiro, sendo o sorotipo DENV2 o mais predominante. No ano de 2002, vários países documentaram dengue e dengue grave, sendo o Brasil responsável por quase 800.000 casos, observando-se o sorotipo DENV3 como o mais predominante (Barreto e Teixeira, 2008).

Em 2008, ocorreu uma das mais graves epidemias, acometendo os estados de Roraima, Mato Grosso do Sul e Piauí, com a reincidência do DENV2, onde a maioria dos pacientes tinham uma idade inferior a 15 anos. Também em 2008, em uma epidemia no Rio de Janeiro, foram registradas 3.237 internações, sendo 53% dos pacientes menores de 14 anos. Nessa epidemia 45% dos óbitos registrados foram em crianças. Em 2010, os quatro sorotipos circulavam no Brasil, onde quase 1 milhão de casos foram reportados. Em 2013, quase 1,5 milhão e em 2015 mais de 1,6 milhão de casos foram reportados no Brasil (Wilson e Chen, 2002; Araújo et al., 2017; Salles et al. 2018).

Em 2016, mais de 2 milhões de casos foram relatados nas Américas, sendo 64,5% no Brasil (Araújo et al., 2017). Respeitando a sazonalidade, os anos de 2016 e 2017 tiveram baixas taxas de transmissão, sendo registrados 579.645 e 561.393 casos prováveis nas Américas, tendo o Brasil contribuído com 252.054 e 265.934 respectivamente. Porém, esse número voltou a subir, sendo registrados em 2019 cerca de 2.858.927 casos prováveis nas Américas, tendo o Brasil contribuído com 1.544.987 casos prováveis (Cavalcante et al., 2018; Oliveira et al., 2019; Ministério da Saúde, Brasil, 2019).

Sabe-se que esses números são ainda maiores na realidade, pois muitos casos não são diagnosticados corretamente e muitas vezes não são reportados. Principalmente os casos de dengue sem sinais de alerta, nos quais os indivíduos se auto medicam em casa, sem procurar assistência médica. Mas, mesmo assim, o Brasil é responsável por quase 60% dos casos reportados em todo o mundo (Werneck et al., 2018).

O Brasil passou por um processo de urbanização acelerada e não programada, causando a falta de infra-estrutura em muitas cidades o que resultou na falta de saneamento básico em grandes áreas. O alto consumo de produtos não degradáveis que servem de criadouros para o mosquito e o fato de possuir o clima e ambiente favoráveis para a reprodução do mosquito transmissor do dengue, são agravantes. Soma-se à esses fatos a co-circulação dos quatro sorotipos, o que gera um aumento na possibilidade de uma infecção por dengue grave, principalmente em crianças. Estudos recentes revelam que os adultos são os mais infectados com a dengue, porém os casos de dengue grave e óbitos estão se tornando mais comuns em crianças, sugerindo uma mudança, das formas mais graves, para as faixas etárias mais jovens (Siqueira et al., 2005).

1.3– Os vetores

As fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes aegypti* são os transmissores de maior importância epidemiológica nas Américas. Acredita-se que os primeiros exemplares vieram escondidos nos porões dos navios negreiros, que vinham da África. Aqui se domesticou e se adaptou muito bem ao ambiente urbano, sendo

considerado antropofílico. Depositam seus ovos em pequenos depósitos artificiais de água, o que facilitou a sua rápida difusão espacial. A espécie *Aedes aegypti* chegou a ser erradicada no Mediterrâneo (década de 50), e de grande parte das Américas (décadas de 50 e 60). No entanto, houve reinfestação na maioria das áreas de onde havia sido erradicado e, hoje, esse vetor é considerado uma espécie cosmopolita (Rodhain, 1997). Hoje pode ser encontrado em mais de 80% dos países (Almishri et al., 2016).

Possui a capacidade de fazer múltiplos repastos sanguíneos aumentando a sua infectividade (Scott et al., 1993). Além disso, a fêmea, durante a oviposição, deposita seus ovos em vários recipientes, garantindo maior sobrevivência e dispersão da prole (Reiter et al., 1991).

O *Aedes albopictus* também tem potencial para transmitir o vírus do dengue. Durante um surto no México, em 1997, foram encontrados espécimes deste mosquito infectados naturalmente (Ibañez-Bernal et al., 1997). Até então, essa espécie era restrita à Ásia e acredita-se que tenha chegado até as Américas devido ao comércio marítimo internacional de pneus, sendo identificado pela primeira vez nos EUA em 1985 e no Brasil em 1986. É um vetor menos domesticado, sendo seu habitat mais comum as florestas, deposita seus ovos no interior oco de árvores. Têm hábitos antropofílicos e zoofílicos, e pode ser o elo entre o ciclo do vírus do dengue em macacos e em humanos. Já foi considerado como o responsável por grandes surtos epidêmicos de dengue clássica e dengue hemorrágica na Ásia (Metselaar et al., 1980; Ibañez-Bernal et al., 1997).

Ambas espécies, devido às dificuldades na implementação de campanhas bem sucedidas como as do passado, representam grandes problemas sócio-político de saúde pública, com grande impacto na economia (Almishri et al., 2016).

Atualmente a única forma de prevenir a dengue é através do controle do vetor. Medidas como eliminar reservatórios de água que servem de criadouros, controle ambiental e o uso de larvicidas na água são necessárias, porém não tem sido eficazes. O uso de repelentes contra mosquitos adultos é uma medida que tem uma ação restrita em relação ao local da aplicação e precisam ser continuamente aprimoradas, uma vez que a taxa de resistência pelos mosquitos é muito alta. A utilização de controle biológico, como alguns crustáceos e peixes que se alimentam das larvas do mosquito, ainda não é uma solução viável devido ao alto custo. Estudos com mosquitos geneticamente modificados, que se tornam incapazes de reproduzir e de mosquitos infectados com a bactéria *Wolbachia*, que impedem o mosquito de se alimentar, têm sido, atualmente, as melhores opções para o controle do vetor. Porém, a participação da comunidade e a continuidade dos esforços, mesmo nos períodos entre as epidemias, são fundamentais para o sucesso do controle do vetor (Katzelnick et al., 2017).

1.4 – O vírus do dengue e o ciclo replicativo

O vírus dengue é um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) pertencente a família *Flaviviridae*, Gênero *Flavivirus*. Este gênero inclui os vírus causadores da Febre Amarela (YFV), Vírus

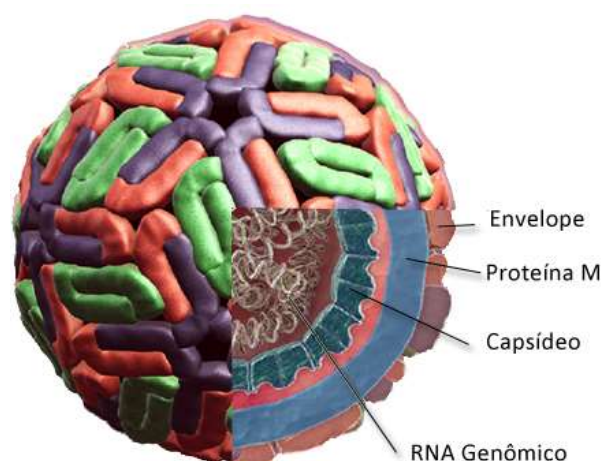


Figura 2 - Partícula viral do DENV

do Nilo Ocidental (WNV), o Virus da Zika (ZIKV) e da Encefalite Japonesa (JEV) (Lindenbach et al., 2006).

Existem quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV1 a 4, onde todos podem causar tanto a forma clássica da doença quanto formas mais graves. São vírus esféricos, com aproximadamente 50nm de diâmetro e envelopados. A partícula viral é icosaédrica contendo no seu interior uma fita simples de RNA (ssRNA) de polaridade positiva com aproximadamente 11kb (Stadler et al., 1997) (Fig. 2). O genoma é capaz de codificar uma única poliproteína, com uma fase de leitura aberta (ORF) flanqueada entre as extremidades 5' e 3' (Iglesias e Gamarnik, 2011). A poliproteína é clivada pelas proteases virais NS2b-NS3 gerando as três proteínas estruturais: envelope (E), pre-membrana (prM) e capsídeo (C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, and NS5) (Lobigs et al., 2010) (Fig.3).

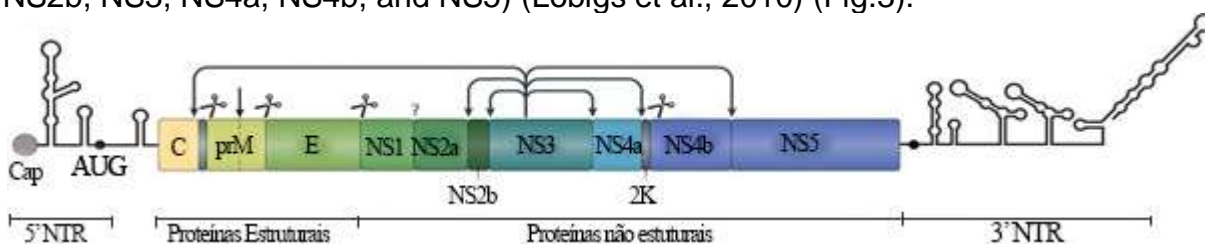


Figura 3 – Código genético do DENV. C – Capsídeo; prM – Pré-membrana; E – Envelope; NS – Não estrutural.

Um dos alvos do vírus do dengue são as células mononucleares (Aye et al., 2014), porém a replicação pode ocorrer, principalmente, dentro de macrófagos, monócitos e pode infectar vários tipos celulares, como as células dendríticas e as células endoteliais (King et al., 2000).

Após a picada do mosquito fêmea infectado, o vírus é inoculado no organismo do hospedeiro. A proteína E do vírus se adere a receptores celulares e o vírus sofre endocitose e fica isolado dentro de endossomo no interior da célula. Já dentro da célula, o endossomo se acidifica e o virion sofre uma série de conformações, se tornando maduro. A membrana viral se funde à membrana do endossoma e libera o nucleocapsídeo no interior do citoplasma (Green et al., 2014). Então, o nucleocapsídeo libera o RNA viral, que é direcionado ao retículo endoplasmático, onde será traduzido em uma poliproteína, que quando clivadas dará origem

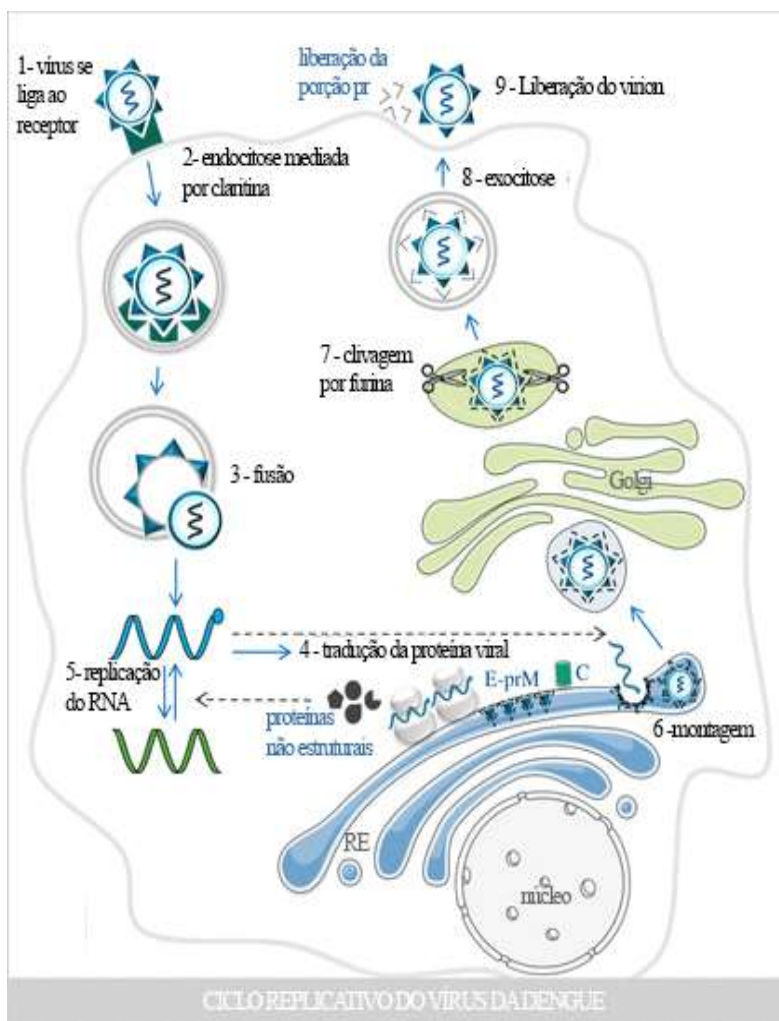


Figura 4 - Ciclo replicativo do DEN. Adaptado de Echavarría-Consuegra et al., 2019

as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. As proteínas estruturais formarão a partícula viral e as proteínas não estruturais desempenham a função de replicação viral, formando um complexo replicativo que sintetiza o RNA pela transcrição do RNA viral anti senso, seguido pela amplificação do RNA. O RNA é montado dentro de um capsídeo e recebe um envelope no momento que deixa o retículo endoplasmático, dando origem aos virions imaturos. Posteriormente são encaminhados para o complexo de Golgi, onde sofrerão a ação das proteases, que irão clivar as proteínas da membrana, gerando virions maduros ou parcialmente maduros, que são liberados pelas células infectadas e irão infectar as células vizinhas (Fig. 4).

1.5 -As proteínas Virais

A proteína E é uma glicoproteína que forma um escudo para todos os *Flavivírus*, sendo portanto a estrutura viral mais exposta. É fundamental para a ligação do vírus aos receptores celulares, permitindo assim a internalização da partícula viral por via da endocitose (Van der Schaar et al., 2007) e a liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira. Por ser a estrutura mais exposta, é também o principal alvo da resposta imune, sendo a maioria dos anticorpos neutralizantes direcionados contra esta proteína. Uma infecção natural por dengue induz uma produção de anticorpos de reação cruzada direcionados contra os peptídeos encontrados na proteína E do envelope. É considerada também o principal candidato a alvo para subunidades de vacinas (Cedillo-Barrón et al. 2018).

A proteína C ou capsídeo é a menor proteína estrutural dos *Flavivírus*. Esta proteína possui afinidade tanto pelo RNA viral quanto pelos lipídeos de membrana. Sua função é formar parte do nucleocapsídeo que será incorporado aos novos virions (Dokland et al., 2004) e atua na regulação da translocação nuclear (Cedillo-Barrón et al., 2018).

A proteína prM é formada por uma fração pr e outra fração M. É muito importante na biogênese da partícula viral, uma vez que impede a fusão prematura da proteína E com os compartimentos ácidos (Mukhopadhyay et al., 2005). Quando a partícula viral imatura (formada por ambas frações pr e M) é clivada por uma furina no complexo de Golgi, libera a fração pr e se torna madura. Tem a função de acompanhante da proteína viral, facilitando sua passagem em direção ao lúmen do retículo endoplasmático, direcionada pelo N-terminal (Mackenzie e Westaway 2001).

A proteína NS1 é uma glicoproteína multifuncional, clivada pela proteína NS2a e por uma proteína desconhecida, residente do retículo endoplasmático (Falgout, Chanock, & Lai, 1989). Após a clivagem, a NS1 é translocada para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) onde sofre várias transformações mediadas por peptidases do hospedeiro (Falgout & Markoff, 1995). Acredita-se que esteja relacionada com a replicação viral, uma vez que se localiza com a dupla fita de RNA (dsRNA) e interage com a proteína NS4a e NS4b (Wang et al., 2015). Outros estudos também ressaltam a importância do NS1, em modelos murinos, na indução da resposta imune, controlando a disseminação do vírus e lisando as células infectadas (Kyung e Diamond, 2008). Por outro lado, também pode contribuir para uma maior patogenicidade aumentando a permeabilidade capilar (Modhiran et al., 2015), estimulando a produção de anticorpos que reagem com plaquetas e proteínas da matriz extracelular (Sun et al., 2007).

A proteína NS2a é uma proteína transmembrana hidrofóbica (Xie et al., 2013) que desempenha papel importante no ciclo de vida do vírus. Está envolvida na síntese do RNA viral e na maturação do virion. Alguns estudos relacionam a proteína NS2a

ao transporte do RNA dos locais de replicação para os locais de montagem (Leung et al., 2008).

A proteína NS2b é uma pequena proteína integrada a membrana. Possui um centro hidrofílico conservado, entre os domínios hidrofóbicos localizados na porção N e C-terminal (Phoo et al., 2016). O NS2b pode alterar a permeabilidade da membrana (León-Juárez et al., 2016),

A proteína NS3 é a segunda maior proteína viral do gênero dos *Flavivirus*. Desenvolve papel fundamental no ciclo de vida viral. A NS3 associada a NS2b atua como co-fator para a atividade de protease. Além de possuir um subdomínio que sintetizará o sulco de ligação do ssRNA e também é responsável pela ligação NS3-NS5, muito importante durante a replicação viral (Kapoor et al., 1995).

A proteína NS4a é uma proteína pequena, hidrofóbica e multifuncional. É uma proteína de transmembrana onde o N-terminal se localiza no citoplasma da célula e o C-terminal no lúmen do RE. Se associa às membranas do RE através de quatro regiões hidrofóbicas internas e se colocaliza com a fita dupla de RNA (dsRNA), promovendo uma reorganização da membrana que irá permitir a formação de complexos para a replicação viral (Miller et al., 2007).

A proteína NS4b é hidrofóbica, sofre modificação após a ação da signalase da célula do hospedeiro, dando origem à forma madura da proteína. Essa clivagem de peptídeo é importante para a correta inserção na membrana e remodelagem da proteína NS4b (Miller et al., 2006). Participam antagonizando a atividade de IFN- α/β (Evans e Seeger, 2007) e na montagem do complexo de replicação viral. Além de interagirem com outras proteínas virais como NS1, NS3 e NS4a, que desempenham funções essenciais para a replicação viral (Youn et al., 2012; Zou et al., 2015).

A proteína NS5 é a maior e mais conservada, com 60% de similaridade dentre os *Flavivirus*. Atua na formação do Cap viral (Egloff et al., 2002) e na replicação do genoma viral (Tan et al., 1996). Forma um complexo com NS3 e essa interação é requerida para a replicação viral (Kapoor et al., 1995), além de estar envolvido na inibição do resposta imune inata do hospedeiro, antagonizando a ação do IFN1. Acredita-se que ainda existam funções ainda não identificadas (Cedillo-Barrón et al., 2018).

1.6– As manifestações clínicas

Na maioria das vezes a dengue é assintomática. Porém, quando se manifesta, pode apresentar uma ampla variedade de sintomas. A dengue clássica é caracterizada por uma febre aguda acompanhada por dois ou mais seguintes sintomas: náusea, vômito, rash cutâneo, dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, petéquias, teste de torniquete positivo ou leucopenia. Alguns sinais de alerta podem ser observados durante a evolução clínica da doença, tais como: intensa dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluido (ascite, efusão pleural ou pericárdica), sangramento de mucosa, letargia, irritabilidade, hipotensão postural, hepatomegalia e/ou aumento progressivo do hematócrito. A doença pode evoluir ainda para a forma mais grave, caracterizada por extravasamento plasmático, grave hemorragia ou falha grave em órgãos o que pode levar o indivíduo ao óbito (PAHO, 2017).

Para a triagem dos pacientes corretamente, especialmente durante surtos, estabeleceu-se a seguinte classificação:

| | |
|------------------------------------|--|
| Dengue sem sinais de alerta | <p>Pessoas que vivem ou viajaram para áreas com transmissão de dengue nos últimos 14 dias e que apresentaram febre aguda (2 a 7 dias de duração) e pelo menos dois dos seguintes sintomas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Náusea ou vômito; exantema; dor de cabeça, dor retro-orbital; mialgia/artralgia; petequias ou teste de torniquete positivo; leucopenia. <p>E também qualquer criança que reside ou esteve em área de transmissão de dengue apresentando febre aguda sem causa aparente.</p> |
| Dengue com sinais de alerta | <p>Todo caso de dengue, que além da febre, apresentem um ou mais dos seguintes sintomas de alerta:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sensibilidade ou intensa dor abdominal; vômito persistente; acúmulo de fluido cavitário (ascite ou efusão pleural/pericárdica); sangramento de mucosa; letargia /inquietação; hipotensão postural; hepatomegalia; aumento progressivo do hematócrito. |
| Dengue grave | <p>Todo caso de dengue que apresentar um ou mais dos seguintes sintomas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Choque ou angústia respiratória devido a intenso extravasamento plasmático; choque evidenciado por pulso fraco ou indetectável; taquicardia, extremidades geladas, perfusão capilar > 2 segundos; grave sangramento (hematêmese, melena, metrorragia, sangramento em sistema nervoso central; comprometimento grave de órgãos; insuficiência hepática (AST ou ALT >1000 UI); alteração neurológica; miocardite. |

Tabela 1 - Níveis de gravidade do dengue e seus sintomas. Classificação segundo a O.M.S., 2009

Em crianças, o quadro inicial febril, pode passar despercebido, e somente desperta atenção quando já está evoluindo para um quadro mais grave, caracterizado por efusões plasmáticas que culminam com fenômenos hemorrágicos, o que levará ao aparecimento de sinais de insuficiência circulatória, com mortalidade chegando a 40% e 50% dos casos. O correto diagnóstico realizado precocemente e o início do tratamento logo na fase inicial reduzem a mortalidade para 1%.

O surgimento de casos graves têm se intensificado nos últimos anos, acredita-se que tenham relação com:

- a) a cepa viral mais virulenta;
- b) a circulação de vários sorotipos concomitantemente; e
- c) a desregulação e exacerbação da resposta imune, principalmente durante uma segunda infecção.

Outra complicação é a falta de programas que estimulem o diagnóstico precoce do dengue, pois se baseia no aparecimento dos sinais agravantes e em uma fase já avançada da doença, o que dificulta tanto a recuperação do paciente quanto o controle das epidemias (Tauil, 2001).

A maior ameaça à saúde do indivíduo infectado com o vírus do dengue é a Síndrome do Choque do Dengue, caracterizada por:

- a) plaquetopenia;
- b) alteração da homeostase: elevado sangramento e/ou tempo de perfusão capilar;
- c) ativação do complemento, pela via clássica ou alternativa;
- d) elevação das transaminases hepáticas ALT e AST; e
- e) aumento da permeabilidade vascular (Halstead e Wilder-Smith 2019).

Essa síndrome é mais grave em crianças, idosos ou pessoas com condições pré-existentes (Guzman et al., 2019) .

A elevada concentração de citocinas e quimiocinas e o aumento de plaquetas permitem o escape de macromoléculas e fluidos da circulação (Guzman et al., 2013), culminando com a hemoconcentração em decorrência do choque hipovolêmico e, se não iniciada a fluidoterapia endovenosa, o paciente poderá vir a óbito (Tauil, 2001).

Outro fator de risco são as comorbidades. Pacientes internados por dengue e que possuem outras doenças infecciosas, distúrbios pulmonares, distúrbios urinários, doença ou insuficiência renal, diabetes, alteração cardíaca, obesidade, derrame cerebral ou doença isquêmica cardíaca têm cerca de 11 vezes mais chance de virem a óbito por dengue grave. Sendo as doenças renais, doenças infecciosas, doenças pulmonares e a diabetes as que apresentaram maiores taxas de mortalidade (Werneck et al., 2018).

1.7 – A patogênese

Alguns casos de dengue evoluem de uma dengue clássica, sem grandes complicações, para casos de dengue grave, que podem evoluir para óbito. Considera-se fatores de risco para casos graves de dengue:

- a) a cepa do sorotipo do vírus infectante,
- b) o estado imunitário e genético do paciente,
- c) a concomitância com outras doenças e
- d) a infecção prévia por outro sorotipo viral da doença (Tauil, 2001).

A principal alteração fisiopatológica que diferencia uma dengue clássica de uma dengue grave é o extravasamento plasmático. Este ocorre em consequência à uma alteração na permeabilidade vascular. Em alguns casos mais graves pode ocorrer choque hipovolêmico, devido à perda de grande volume plasmático.

Acredita-se que essas alterações sejam causadas mais pela ação de mediadores e citocinas do sistema imune do que pela ação direta do vírus sobre as células endoteliais. Dos possíveis mediadores, os componentes C3a e C5a do sistema complemento estão elevados em pacientes que apresentaram choque e doença grave. Dentre as citocinas e mediadores químicos o TNF- α , IL-2, IL-6, IFN- γ estavam elevadas nos casos graves (Srichaikul e Nimmannitya 2000).

Além disso, também pode ocorrer a apoptose das células endoteliais, o que provoca a ruptura na parede de capilares e culminando com o extravasamento plasmático generalizado (Lin et al. 2002). Os níveis diminuídos de albumina também se relacionam com a gravidade do dengue, indicando intensa fragilidade capilar (Bethell et al. 1998).

A resposta fisiopatológica do dengue varia de acordo com o sistema imune do hospedeiro, tornando-a uma doença altamente complexa uma vez que a progressão da doença parece ter causa multifatorial (Martina et al., 2009).

Algumas teorias são sugeridas para explicar a patogênese do dengue e a resposta imune do hospedeiro parece ser, em muitas circunstâncias, responsável pelos casos graves da doença. Um exemplo disso é o fato de que em uma segunda infecção por outro sorotipo, a fase crítica da doença ocorre quando há a diminuição da carga viral, sugerindo que mecanismos imunológicos como a resposta imune adaptativa, os mediadores inflamatórios e os fenômenos de auto-imunidade são importantes no desenvolvimento da patogênese do dengue, mesmo sem a presença de viremia (Wan et al., 2013).

Outra hipótese está relacionada com a variação genética e antigênica das diferentes cepas virais, em que o genótipo e o sorotipo da cepa parecem se relacionar com o nível de gravidade da doença durante a primeira infecção, sendo algumas cepas consideradas mais virulentas do que outras (Seneviratne *et al.*, 2006).

Fatores genéticos do hospedeiro também estão relacionados ao agravamento do dengue. Recentemente, foram descobertos, pelo estudo do genoma, dois loci que se relacionam com a síndrome do choque por dengue (Khor et al. 2011).

Observou-se um aumento de casos graves em crianças recém nascidas que adquiriram passivamente anticorpos via transplacentária ou pela lactação e em um segundo grupo de crianças na faixa etária dos 2 a 10 anos de idade. As crianças tem maior suscetibilidade a extravasamento plasmático, em comparação com os adultos (Nunes et al., 2016).

1.7.1 – A patogênese do dengue no fígado

O fígado é um dos principais alvos do DENV. O fígado em paciente infectado com dengue apresenta variados graus de lesão. O achado mais comum é a congestão dos sinusóides hepáticos variando de moderada a grave. A apoptose ocorre predominantemente nas áreas medionais e centrolobulares. Ao contrário da esteatose que apresenta-se disseminada por todo órgão. Alterações na morfologia dos hepatócitos são evidenciadas, tais como hipertrofia, vacuolização do citoplasma e desconexão dos cordões hepáticos. Além disso, alterações nucleares, como fragmentação da cromatina (cariorrexe), redução do tamanho (picnose) ou a perda do núcleo (cariólise) também são evidentes. Foi observado infiltrado inflamatório mononuclear, principalmente na área periportal, contendo linfócitos, monócitos e neutrófilos (Aye et al. 2014; Póvoa et al. 2016).

A detecção de CD68+ revela a presença de células de Kupffer e de macrófagos circulantes. Além da detecção de linfócitos T CD4+ e T CD8+ localizadas, preferencialmente, margeando os capilares sinusoidais. Células mononucleares expressando citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β e RANTES já foram observadas, principalmente, na região medionial. TNF- α foi encontrado em células de Kupffer e monócitos. IFN- γ foi encontrado, majoritariamente, em linfócitos, células de Kupffer e monócitos. As células endoteliais dos capilares sinusoidais, monócitos e linfócitos expressavam IL-10 e macrófagos e células de Kupffer expressavam TGF- β . Foi observada também a expressão da quimiocina RANTES, principalmente pelas células endoteliais e células de Kupffer (Póvoa et al. 2016).

A detecção do antígeno viral NS3 do DENV foi observada em hepatócitos e células de Kupffer, e em células endoteliais. As células de Kupffer se apresentaram hiperplásicas. Já as células endoteliais das áreas danificadas se apresentavam com os núcleos picnóticos (Aye et al., 2014).

Tais danos podem ser causados pela deposição de componentes do complemento, tanto pela via clássica quanto pela via alternativa, nos hepatócitos, nas células de Kupffer e nos macrófagos. Porém, uma lacuna na correlação entre a presença dos antígenos virais e os danos encontrados sugere que a replicação viral não é o único fator que provoca tais alterações, mas também outros fatores tais como hipóxia, mediadores de uma resposta imune exagerada e endotoxinas liberadas por macrófagos infectados podem contribuir para a lesão hepática e apoptose (Aye et al., 2014).

1.7.2 – A patogênese do dengue no pulmão

Variados graus de congestão foram observados em pacientes infectados com o vírus do dengue. O septo alveolar apresenta-se preenchido por células vermelhas do sangue e com infiltrado inflamatório contendo predominantemente linfócitos e monócitos (Aye et al., 2014).

Diferentes graus de edema podem ser observados, com ou sem a presença da membrana hialina. Pode ocorrer também a dilatação dos espaços subpleurais, com ou sem a presença de líquido (Aye et al., 2014).

Por meio da imunohistoquímica, foi possível detectar a presença de macrófagos (CD68+), no septo alveolar, e de células T CD4+ e T CD8+ principalmente nos capilares pulmonares. TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β foram detectados em macrófagos e linfócitos. Além da expressão de RANTES pelas células endoteliais e macrófagos alveolares no espaço perivascular (Póvoa et al., 2016). O antígeno viral pode ser encontrado no interior dos pneumócitos tipo II e nos macrófagos alveolares.

1.7.3 – A patogênese do dengue na traqueia

Poucos estudos tendo a traqueia como órgão analisado foram realizados até hoje. Porém, em alguns adultos já foram evidenciadas placas eritematosas no epitélio respiratório. Foram relatados também casos de hemorragia na luz traqueal devido a alterações vasculares. O vírus do dengue pode provocar um processo inflamatório local (traqueíte) e estimular a migração de células inflamatórias mononucleares, que em grande quantidade pode provocar obstrução do lúmen traqueal, dificultando a respiração.

1.7.4 – A patogênese do dengue na língua

Várias manifestações podem ser observadas na cavidade oral de pacientes diagnosticados com dengue. Os sinais variam desde alteração no sabor e sensação de boca seca até sangramento gengival e vesículas na língua. É comum observarmos também placas eritematosas. Já foi relatada osteonecrose de mandíbula em um paciente diagnosticado com dengue (Pedrosa et al., 2017).

A mucosa oral normalmente não é analisada em casos de dengue. Porém, alguns relatos foram feitos ao longo dos anos. Em 2011, um indiano teve complicações respiratórias devido a um sangramento anormal na língua, sendo posteriormente diagnosticado com dengue (Sarkar et al., 2011). Um outro paciente, diagnosticado com dengue, apresentou hemorragia espontânea e intensa na língua e no palato (Byatnal et al., 2013).

1.8 – A morfologia dos tecidos

1.8.1 – Morfologia do Fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, sendo também uma glândula endócrina e exócrina. Isto porque, além da função de processar e armazenar os nutrientes absorvidos durante a digestão e distribuí-los para os órgãos através do sangue, também produz secreções tais como albumina, fibrinogênio, lipoproteínas e a bile. É irrigado principalmente pela veia porta (80%) que carrega sangue contendo pouco oxigênio, porém rico em nutrientes absorvidos no trato gastro-intestinal e pela artéria hepática (20%) rico em oxigênio.

É um órgão parenquimatoso, constituído basicamente por hepatócitos (cerca de 80%). Essas células se organizam em cordões hepáticos e formam placas hexagonais interconectadas entre si, denominadas lóbulos hepáticos (Fig. 5). Cada hepatócito faz íntimo contato com os capilares sinusoidais e com outra célula hepática, formando entre eles um canalículo biliar. Os sinusóides convergem para o centro do lóbulo, onde formam a veia centrolobular e os canalículos biliares fluem em sentido contrário, para a periferia, onde se anastomosam e formam o ducto biliar. Nas extremidades dos lóbulos hepáticos se localizam os espaços porta, contendo um ramo

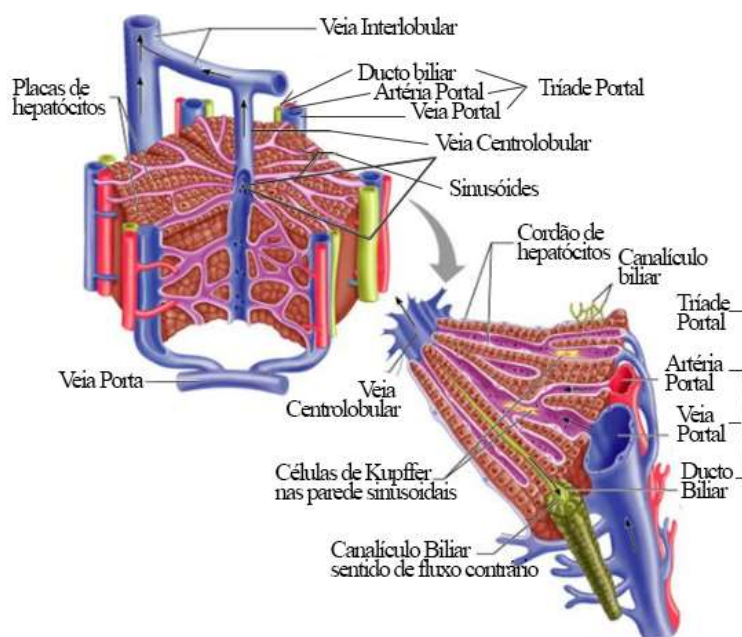


Figura 5 - Representação de um lóbulo hepático e suas estruturas.

da veia porta, um ramo da artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos. O fígado humano contém cerca de 3 a 6 espaços porta por lóbulo (Fig. 5).

Os sinusóides convergem para o centro do lóbulo, onde formam a veia centro lobular. É devido à esse íntimo contato entre vasos sanguíneos e os hepatócitos que ocorre a troca de substâncias entre eles. Os hepatócitos produzem albumina, fibrinogênio e lipoproteínas que são fundamentais para processos fisiológicos.

Além dos hepatócitos, o parênquima hepático também

é constituído pelas células de Kupffer (cerca de 15%), considerados os macrófagos do fígado, cuja funções são metabolizar hemácias velhas, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com processos imunológicos e destruir bactérias que eventualmente penetrem junto ao sangue portal, a partir do intestino grosso.

E em menor quantidade, é constituído também pelas células de Ito, que tem a função de armazenar lipídeos, ricos em vitamina A, além de captar, armazenar e liberar retinóides, sintetizar e secretar várias proteínas da matriz extracelular e proteoglicanos, secretar fatores de crescimento e citocinas além de regular o diâmetro do lúmen sinusoidal em resposta a diferentes fatores reguladores (prostaglandinas, tromboxano A2) (Junqueira, 2013 p.318-329).

1.8.2 – Morfologia do Pulmão

O pulmão é um órgão par. O pulmão direito é um pouco mais largo e mais curto, e divide-se em 3 lobos delimitados por duas fissuras. O pulmão esquerdo possui dois lobos delimitadas por uma fissura além de apresentar a línghula do pulmão, que é um resquício do desenvolvimento embrionário do lobo médio (Fig. 6).

Se dividem em duas porções. A porção condutora se inicia após o término dos bronquíolos extrapulmonares, na região do hilo. Estes, se dividem em brônquios secundários ou lobares (que se relacionam a cada lobo pulmonar) (Fig 6). Se ramificam novamente formando os brônquios terciários ou segmentares (que se relacionam a cada segmento pulmonar). Que se ramificam novamente formando os bronquíolos quartenários ou terminais. São revestidos internamente pelo epitélio respiratório circundados por anéis incompletos de cartilagem hialina, que vão diminuindo conforme se ramificam. A porção respiratório se inicia no bronquiolo respiratório que se ramificam de primeira, segunda e terceira ordem. Estes se ramificam em minúsculos túbulos denominados ductos alveolares que irão desembocar em sacos alveolares, que são constituídos por estruturas microscópicas

denominadas alvéolos. Cada alvéolo faz íntimo contato com capilares pulmonares. É nesse nível que ocorrem as trocas gasosas.

Nas paredes dos alvéolos encontram-se três tipos celulares: células endoteliais dos capilares, os pneumócitos de tipo I e de tipo II. Os de tipo I tem núcleo mais achatados, com citoplasma muito delgado, sua função é constituir uma barreira de

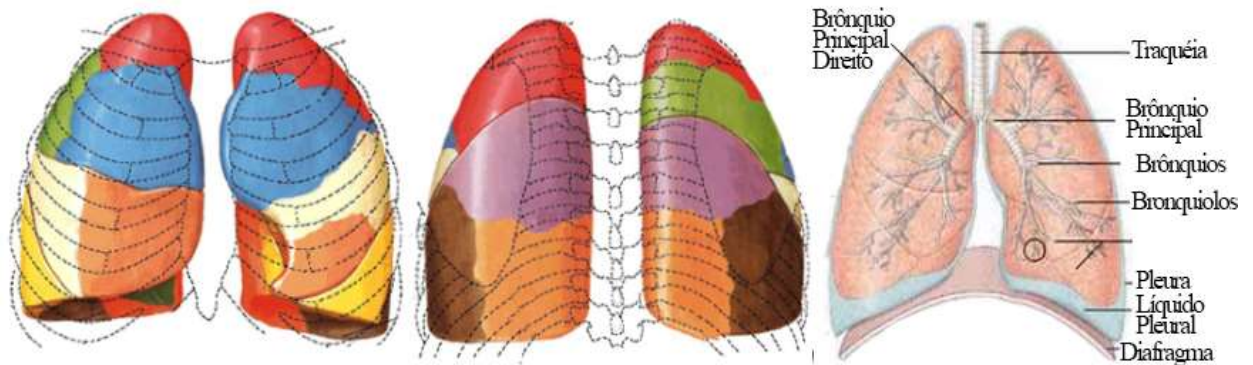


Figura 6 - Representação do pulmão e seus lobos. Adaptado de Netter et al., 2000

espessura mínima que impeça a passagem de fluidos intersticiais para o interior dos alvéolos, porém permita a troca de gases. Os pneumócitos de tipo II são mais arredondadas, com núcleo maior e mais vesicular, se localizam nos pontos onde as paredes alveolares se tocam e ficam sobre a membrana basal do epitélio alveolar, possuem corpos multilamelares que contém fosfolipídios, proteínas, glicosaminoglicanos e dão origem a uma camada extracelular surfactante, que se espalha pela superfície dos alvéolos e reduz a tensão superficial e, conseqüentemente, a força necessária para a inspiração e impedem que os alvéolos colabem durante a expiração (Fig. 7).

Possuem macrófagos alveolares no interior dos septos inter alveolares e na superfície dos alvéolos. Se localizam também na camada surfactante e ajudam na remoção de partículas e substâncias prejudiciais que por ventura entraram junto com o ar inalado (Junqueira, 2013 p. 339 - 350)(Fig. 7).

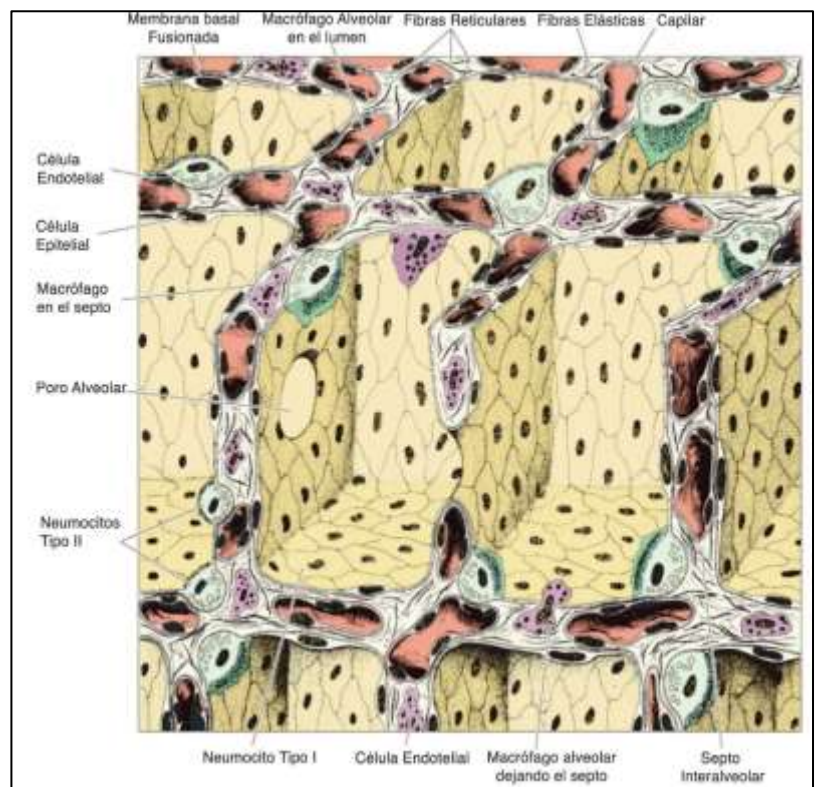


Figura 7 - Representação do parênquima pulmonar

1.8.3 – Morfologia da Traqueia

A traquéia é um órgão tubular, que se inicia no final da laringe e em sua terminação se divide em dois ramos denominados brônquios principal ou extrapulmonares direito e esquerdo.

É revestido internamente por epitélio respiratório (epitélio ciliado pseudoestratificado colunar com células caliciformes) glandular, com lamina própria de tecido conjuntivo frouxo rico em fibras elásticas.

Tanto as glândulas quanto as células caliciformes liberam na luz do órgão substância seromucosa, que, com o movimento dos cílios, ajudam a retirar partículas do ar inspirado. Para sua sustentação, possui cartilagens hialinas (de 16 a 20) em forma de C abertos na parte posterior (Fig. 8).

A traquéia é revestida externamente por uma camada adventícia, formada por tecido conjuntivo frouxo, que une a traquéia aos tecidos adjacentes.

Possui em toda sua extensão da porção condutora nódulos linfáticos e linfonodos (rico em plasmócitos), além de linfócitos isolados (Junqueira, 2013 p. 334 - 338).

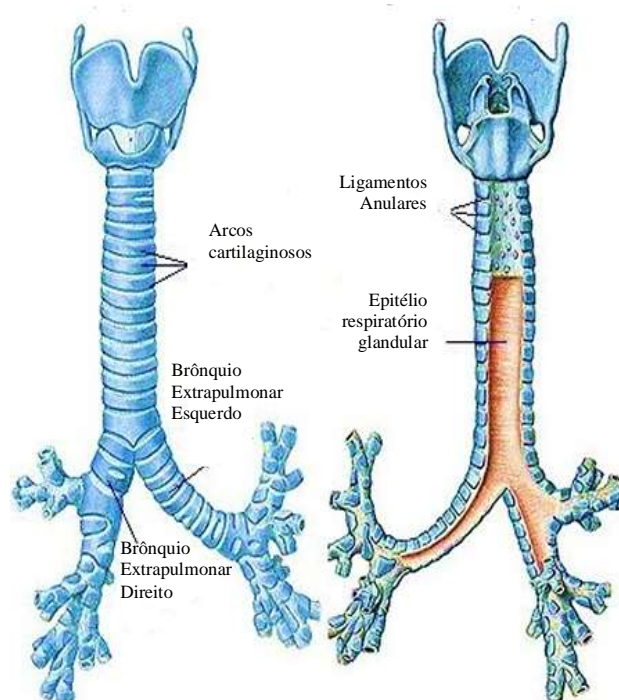


Figura 8 - Esquema da anatomia da traquéia.

1.8.4 – Morfologia da Língua

A língua é um órgão fundamental para a apreensão e deglutição dos alimentos. É uma massa de músculo estriado esquelético fortemente aderida a uma camada mucosa de tamanho variável de acordo com a região. As fibras estão organizadas em feixes, separados por tecido conjuntivo da lâmina própria.

Na porção ventral é lisa e a dorsal é recoberta por papilas. As papilas são elevações do epitélio oral e se dividem em: filiformes, fungiformes, foliadas e circunvaladas. As filiformes têm formato cônico alongado com epitélio de revestimento queratinizado, sem botões gustativos, estão sobre toda a superfície dorsal da língua e têm função fricção. As fungiformes tem formato de cogumelos, com base estreita e uma porção superior dilatada e lisa contendo alguns botões gustativos, distribuídas entre as papilas filiformes. As foliadas são pouco desenvolvidas em humanos, formadas por rugas paralelas na superfície dorsolateral da língua, com muitos botões gustativos (Fig.9). Já as circunvaladas são 7 a 12 estruturas circulares grandes, suas superfícies achatadas se estendem acima das outras papilas, localizadas sobre o V lingual, contém glândulas de von Ebner que secretam seu conteúdo em uma depressão que circunda cada papila, que possibilita um maior contato do alimento com os botões gustativos nas laterais dessas papilas.

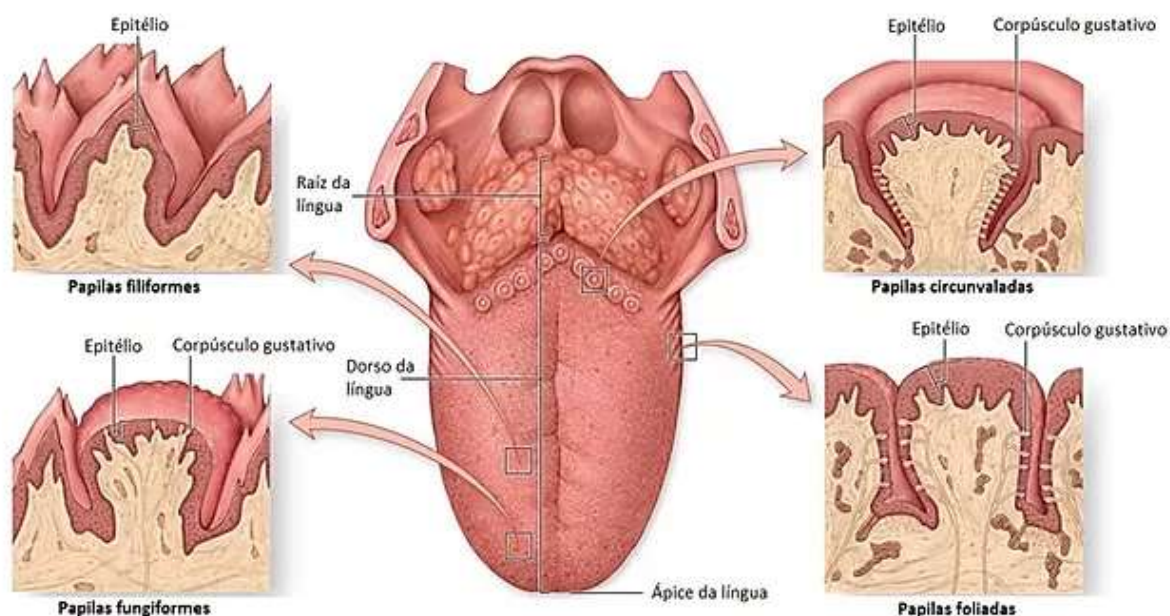


Figura 9 - Representação esquemática da língua e papilas linguais. Adaptado de Pinterest

O terço posterior, delimitado pelo sulco terminal da língua, em forma de V, apresenta saliências compostas por agregados linfóides de dois tipos: pequenos grupos de nódulos e tonsilas linguais (Junqueira, 2013 p. 281 -282).

1.9– A resposta imune na dengue

O vírus penetra na pele após a picada do mosquito infectado. É replicado na pele nos queratinócitos e células dendríticas. As células infectadas migram para os linfonodos regionais, onde o vírus se replica e dissemina para outros órgãos via vasos linfáticos.

O sistema de resposta imune inata corresponde a primeira linha de defesa contra o DENV, sendo fundamental para o controle da infecção logo no período inicial. Assim que penetra uma célula, o vírus é reconhecido por de uma série de receptores, denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes no citoplasma e endossomas de células dendríticas, macrófagos e monócitos (células do sistema imune inato). Esses receptores tem a capacidade de reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são estruturas microbianas preservadas dentre os patógenos. A interação entre o RNA viral (tipo de PAMPs) e os receptores Toll-Like (tipo de PRRs), principalmente os TLR3, TR7 e TLR8, irão ativar uma série de vias que irão estimular a produção de citocinas pro-inflamatórias e IFN tipo I (IFN- α , IFN- β e IFN- ω), além de NF- κ B.(Boxel-Dezaire et al., 2006; Ramirez e Urcuqui-Inchima, 2015;)

A produção de IFN-I inibe a disseminação do DENV para outras células não infectadas, pois se ligam aos receptores de IFN- α/β das células vizinhas induzindo um estado antiviral que afeta diferentes processos da replicação viral (Severa e Fitzgerald, 2007; Uno & Ross, 2018). A ativação de NF- κ B estimula a produção de algumas quimiocinas (MCP1 e RANTES), de interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-18 e IL-12) que irão ativar outras células da resposta imune inata, assim como as células NK, que passam a liberar IFN- γ . A ação do IL-12, IL-18 e do IFN- γ sobre as células CD4+ naive estimulam a sua diferenciação em CD4+ tipo Th1, caracterizando a transição para uma resposta imune adaptativa (Iwasaki e Medzhitov, 2004).

Os macrófagos, maciçamente infectados, estimulados pelo IFN- γ , expressam as moléculas HLA I e II facilitando o reconhecimento de epítomos virais pelos linfócitos T CD4+ e T CD8+, que irão atuar sobre os macrófagos infectados. Os macrófagos lisados ou atingidos pelas células citotóxicas liberam tromboplastina, que promove a coagulação e ativação do sistema complemento. Os macrófagos e os linfócitos estimulam a produção de TNF- α , que irá ativar as células endoteliais. A ativação das células endoteliais promove um aumento da permeabilidade vascular e a liberação de fatores da via de coagulação. Estudos demonstram que células endoteliais infectadas produzem grandes quantidades de IL-8 e RANTES que estimula a liberação de histamina pelos basófilos, promovendo o aumento a permeabilidade vascular. Esses eventos resultam em um extravazamento capilar, que causa hipotensão, hemorragia e plaquetopenia (Fonseca & Figueiredo, 2006).

Durante um infecção, leucócitos são recrutados de dentro da circulação sanguínea para o local da inflamação. Isso envolve rolamento, adesão, migração transendotelial e quimiotaxia (movimento estimulado por quimiocinas). Moléculas de adesão celular, principalmente as da família das selectinas e a superfamília da imunoglobulinas estão envolvidas nesse processo. As selectinas expressas por leucócitos (L-selectinas), células endoteliais (E-selectinas) e plaquetas (P-selectinas) são responsáveis pelo contato inicial entre leucócitos e o endotélio vascular e por uma fraca interação de adesão, que caracteriza o rolamento das células. Os leucócitos são então ativados e estimulam suas integrinas a se ligarem às moléculas de adesão, tanto as moléculas de adesão intracelular (I-CAM1 e 2) quanto as moléculas de adesão vascular (VCAM1) que promovem uma firme adesão do leucócito à parede vascular. O leucócito migra pelo meio vascular, movido por um gradiente de quimioatratores (Touyz, 2005).

A autofagia também pode ocorrer, caso a infecção se dê em monócitos. Nas células hepáticas, a autofagia tem um efeito próviral, pois o vírus consegue bloquear a autofagia, se ligando ao lisossomo e utilizando os vacúolos para a replicação, formação e maturação, se evadindo da ação dos anticorpos neutralizantes durante a transmissão (Uno e Ross, 2018).

A imunidade gerada por uma infecção por um sorotipo é duradoura através da produção de anticorpos neutralizantes homotípicos. Porém não existe imunidade cruzada entre os diversos sorotipos de DENV, exceto durante as primeiras semanas depois da infecção. Fatores relativos a imunidade do hospedeiro estão envolvidos na determinação da gravidade do dengue, uma vez que pacientes, durante uma segunda infecção, apresentam quadros mais graves quando infectados com um sorotipo diferente da primeira infecção. Crianças em fase de lactação, ou que foram geradas durante a infecção materna, podem desenvolver quadros de dengue grave já na primeira infecção, uma vez que os anticorpos maternos passados pelo leite ou por via transplacentária, fazem com que a primeira infecção se expresse como uma segunda infecção. Estas crianças terão carga viral consideravelmente mais alta e um clareamento viral mais lento (Wang et al., 2006). Outro fator relacionado a idade é que diferenças na permeabilidade microvascular tornam as crianças mais suscetíveis ao choque por dengue (Gamble et al., 2000).

A resposta imune do hospedeiro pode ser protetora, conduzindo à cura, ou patogênica. Muitas teorias tentam explicar o motivo do agravamento, as mais conhecidas são (Martínez Torres, 2008) :

1.9.1 – A teoria da Tempestade de citocinas

Tempestade de citocinas é o nome dado ao fenômeno causado por uma reação potencialmente fatal dentro do sistema imune. Ocorre quando o sistema imunológico, combatendo um agente infeccioso, produz citocinas que irão ativar e atrair linfócitos T e macrófagos para o local da infecção. Em resposta a essa ativação produz mais citocinas. Tal processo é controlado por uma sinalização *feedback* negativa. Porém em alguns casos, essa sinalização é ineficaz, resultando em uma produção descontrolada de citocinas, provocando a migração excessiva de células inflamatórias para o local da inflamação. O motivo exato para a ocorrência de tal fato ainda é desconhecida, mas acredita-se que seja provocado por um agente infeccioso inéduo e altamente patogênico ao organismo.

Os danos provocados pelo acúmulo excessivo de células variam desde um edema local sem importância até a obstrução de vias aéreas importantes ou grandes hemorragias (Fig. 10).

A grande preocupação é que a tempestade de citocinas ocorre em sistemas imunes saudáveis. As citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) e a anti-inflamatória (IL-10) se encontram elevadas em pacientes que apresentam dengue grave.

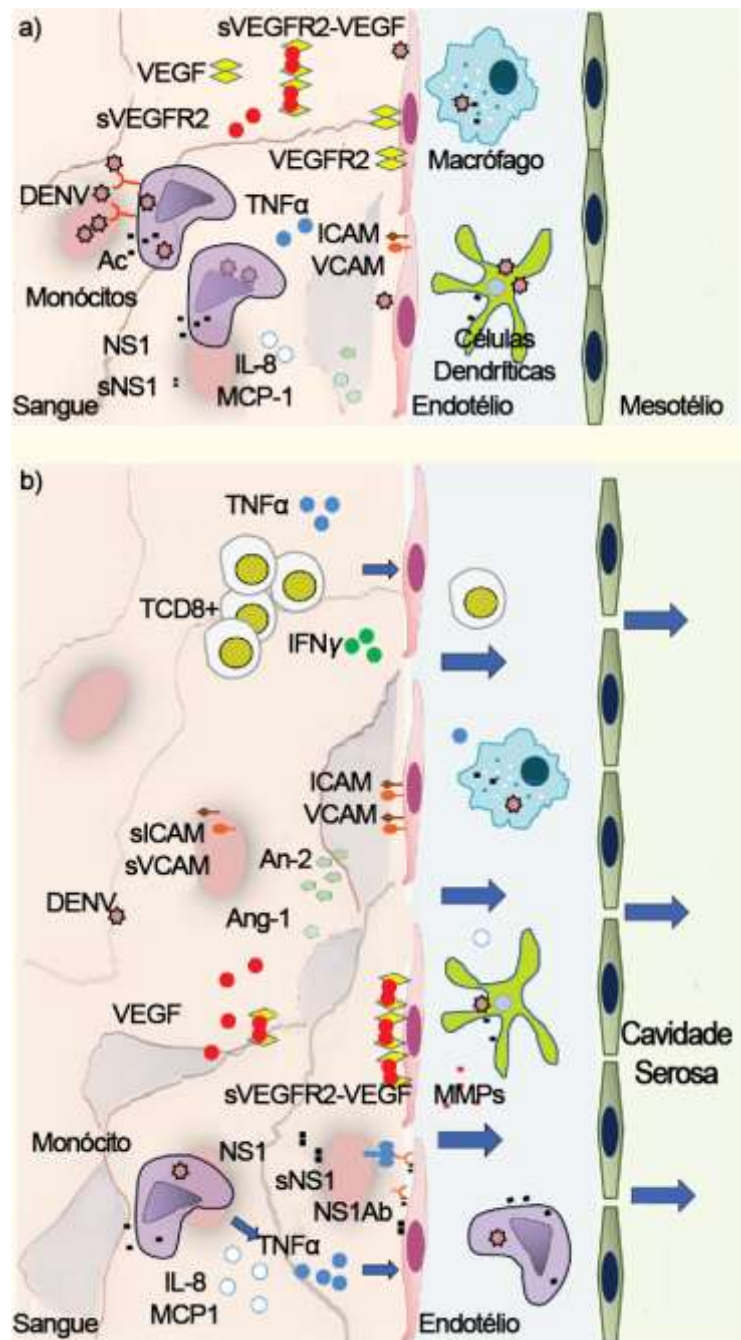


Figura 10 – Teoria da Tempestade de citocinas no dengue.

1.9.2 – A teoria do ADE ou Facilitação anticorpo dependente (antibody-dependent enhancement)

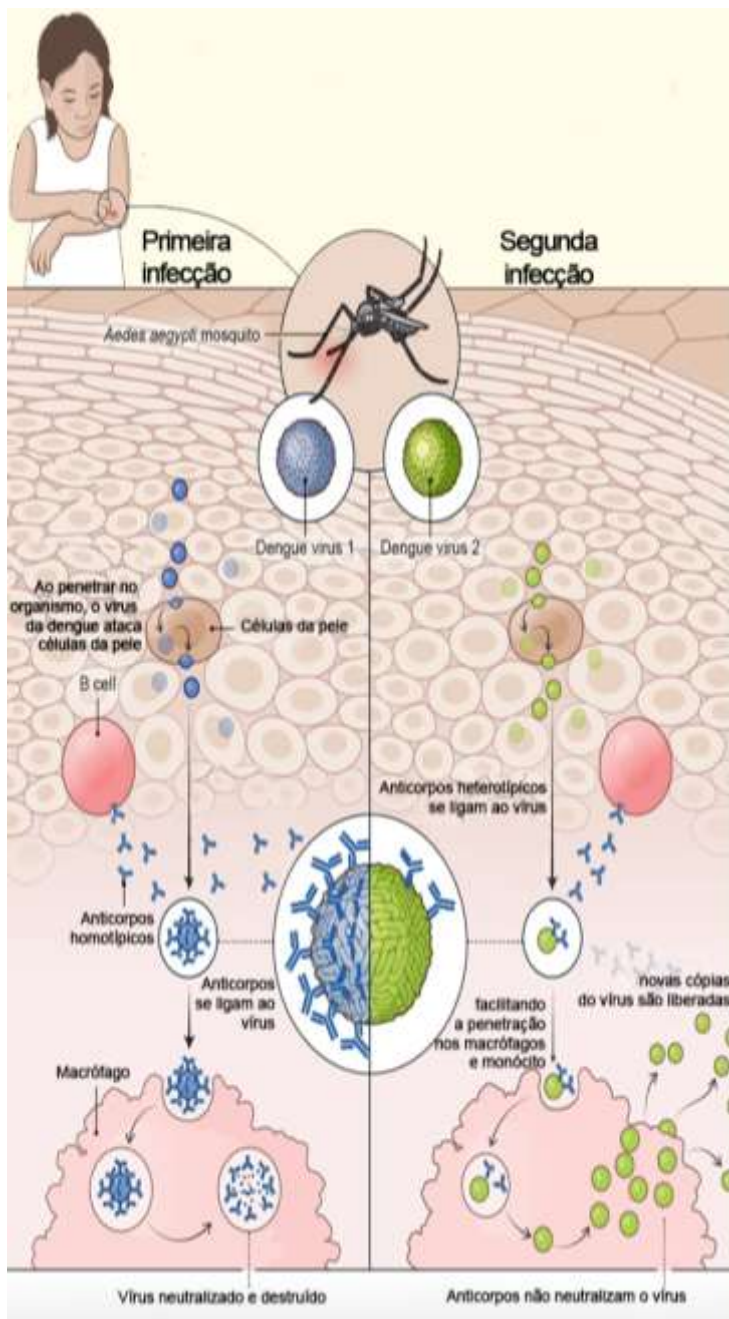


Figura 11 - Teoria da Facilitação Anticorpo Dependente

mas não em quantidade suficiente para neutralizar sua ação. O que acaba por facilitar a entrada do vírus na célula alvo, através do reconhecimento do receptor Fc das células de suporte, potencializando a infecção viral, estimulando a replicação viral e a produção de citocinas, especialmente TNF- α , IL-1 β IL-6 que irá atuar no endotélio promovendo uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Fig. 11) (King et al., 2000; Guzman et al., 2013).

Nessa teoria, os anticorpos adquiridos ativamente em uma primeira infecção ou passivamente pela mãe em uma infecção por um dos sorotipos do dengue, aumentam a gravidade de uma segunda infecção por um sorotipo diferente. Esse fenômeno é conhecido como Facilitação anticorpo dependente (do inglês antibody dependent enhancement – ADE). A teoria do ADE foi postulada na década de 70, baseada em estudos *in-vitro*, como o mecanismo desencadeador da síndrome da permeabilidade vascular do dengue (SPVD) (Halstead, 1979) nos casos de dengue grave.

Após uma infecção com o DENV, anticorpos contra as proteínas E e prM são produzidos. Esses anticorpos são homólogos, ou seja, se o indivíduo se infectar novamente com o mesmo sorotipo do DENV, várias cópias de anticorpos se ligam à superfície do vírus, impedindo que o vírus se ligue as células e se replique, dessa forma, neutralizando o vírus. Porém, se outro sorotipo do DENV infectar este indivíduo, após um curto período, os anticorpos se ligam a superfície do vírus,

1.9.3 – A teoria do pecado antigênico original

Durante uma infecção viral, o organismo reconhece o agente invasor e produz linfócitos T de memória específicos para aquele sorotipo viral. Isso permite que durante uma segunda infecção pelo mesmo sorotipo, a resposta imunológica seja mais rápida impedindo a evolução da doença. Essa memória é de longa duração e pode durar por toda a vida do indivíduo. Porém, quando o organismo é infectado por outro sorotipo, o organismo reconhece que está sendo invadido novamente pelo DENV e o sistema imune inicia a produção de linfócitos T que não são específicos para este sorotipo. Logo, esses linfócitos serão ineficazes na promoção da lise celular. Os linfócitos serão estimulados a produzirem menos citocinas antivirais e mais citocinas inflamatórias. (Fig. 12) (Mongkolsapaya et al., 2003).

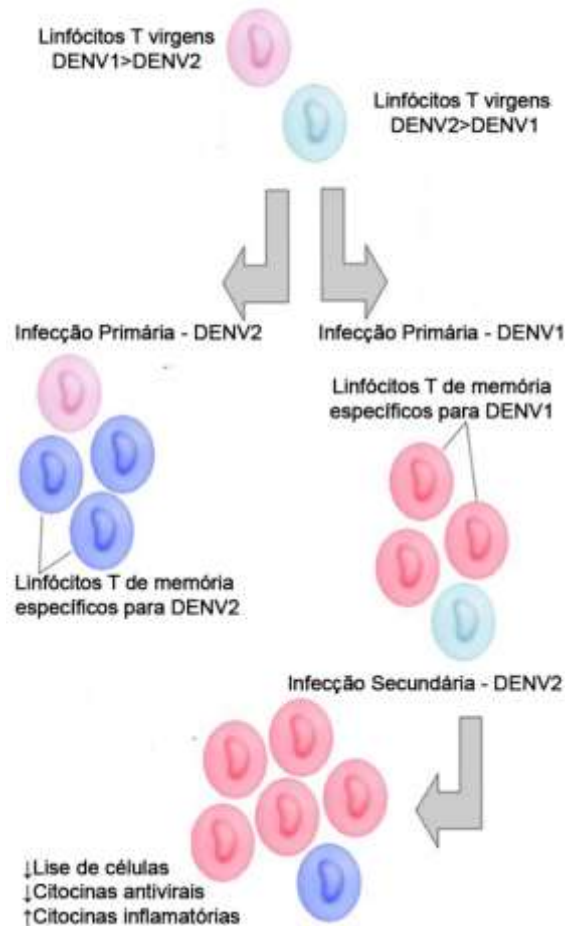


Figura 12 - Teoria do Pecado Antigênico Original.

2 – Justificativa

A incidência do dengue vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, e cada vez a manifestação clínica da doença se apresenta de uma forma mais grave. Por ano, cerca de 70 mil casos de óbitos são confirmados, configurando um sério problema de saúde pública pela alta morbidade e mortalidade. Uma mudança no perfil da doença tem ocorrido recentemente, onde as crianças têm apresentado quadros mais graves. Na última década, 25% dos casos confirmados, notificados e hospitalizados por dengue foram de indivíduos com menos de 15 anos, de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil. Segundo estudos recentes, quadros mais graves, com presença de choque hipovolêmico, extravasamento plasmático e acentuada plaquetopenia são mais prevalentes conforme a idade diminui.

Porém ainda não esta completamente estabelecida a imunopatogenicidade, principalmente nos casos que acometem crianças de até 15 anos de idade.

Este estudo visa avaliar as alterações histopatológicas provocadas pelo DENV em tecidos de fígado, pulmão, traquéia e língua; caracterizar e quantificar, através da imunonistoquímica, a resposta imune celular através da detecção de células do infiltrado inflamatório (CD68+, T CD4+, T CD8+), detectar a presença de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , RANTES), da metaloproteínase MMP9, dos mediadores envolvidos na alteração vascular (VCAM1 e VEGFR-2) e detectar a presença do vírus e sua atividade através do antígeno de replicação (NS3).

Desta forma podemos contribuir significativamente para a identificação dos alvos celulares envolvidos na patogênese do dengue em crianças, correlacionando com os conhecimentos anteriores da patogênese do dengue em adultos. O conhecimento dessas alterações é relevante pois permite um avanço no tratamento dos pacientes internados, além de identificar previamente componentes do sistema imune que possam atuar como biomarcadores antes dos pacientes evoluírem para dengue grave, apresentarem choque e conseqüentemente óbito. Porém esse conhecimento é dificultado pelo baixo índice de necrópsias e pelos escassos estudos histológicos nos pacientes que vêm a óbito.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- ✓ O estudo tem como objetivo a detecção viral e a investigação de células, citocinas e mediadores inflamatórios que possam atuar como marcadores de prognóstico em casos fatais de crianças, no tecido hepático, pulmonar, da traqueia e da língua.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Descrever os aspectos clínicos e laboratoriais dos casos fatais de dengue em crianças;
- ✓ Identificar as alterações histopatológicas nos tecidos estudados e quantificar os danos (no tecido hepático e pulmonar);
- ✓ Identificar a replicação viral, através da detecção da proteína do antígeno viral de dengue (NS3), nos tecidos estudados dos casos fatais;
- ✓ Caracterizar e quantificar a expressão das células do infiltrado inflamatório (TCD4+, TCD8+, e CD68+) nos tecidos hepáticos e pulmonares;
- ✓ Detectar a presença das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , RANTES) nos tecidos estudados;
- ✓ Detectar a presença da metaloproteinase MMP9 nos tecidos estudados;
- ✓ Detectar a presença de mediadores inflamatórios envolvidos na alteração vascular VCAM1 e VEGF-R2 nos tecidos estudados.

4 – Materiais e Métodos

4.1 – O Paciente 1

Um paciente do sexo masculino, com 8 anos de idade, que em 2008 se apresentava com febre, náusea, hematêmese, desnutrido, hipocorado, hipoidratado, com gengivorragia e plaquetopenia de 17,9mil plaquetas/mm³ (limites de 150,0mil a 450,0mil/mm³). Apresentou sorologia positiva (IgM) para dengue. Durante a ausculta, apresentou estertores pulmonar, abdômen doloroso com hepatomegalia e derrame pleural bilateral. Foi realizada toracocentese para drenagem de 247 mL de líquido amarelo. Em poucos dias evoluiu para estado gravíssimo com anemia, hepatoesplenomegalia, ascite, pulmão com infiltrado bilateral difuso e novo derrame pleural. Em uma semana evoluiu para choque, com SARA (Síndrome da Angústia Respiratória Aguda), hemocultura positiva para *Pseudomonas aeruginosa* que em 10 dias evoluiu para sepse, estado de choque refratário. Ao décimo terceiro dia apresentou sangramento nasal ativo, hipotermia, bradicardia, sem pulsos arteriais, parada cardiopulmonar sem resposta a medicamentos de ressuscitação (adrenalina, bicarbonato e glicose) culminando com o óbito.

4.2 – O Paciente 2

Uma paciente do sexo feminino, com 9 anos de idade, que em 2011, com febre alta e mal estar geral, com leucopenia de 2.700/mm³ (limites de 5,0 a 14,5/mm³) e plaquetopenia de 22 mil/mm³, apresentou-se prostrada, desidratada, hipocorada, taquicárdica, com abdômen globoso, hepatomegalia dolorosa e com petéquias em face e membros inferiores. Foi reativo para o teste imunocromatográfico para a detecção do antígeno NS1 do vírus do Dengue. No dia seguinte apresentou bradicardia e pulso periférico não palpável, feita massagem cardíaca externa, recuperando batimentos cardíacos e pulso. Apesar dos esforços de manutenção das funções cardiovascular e respiratória, paciente entrou em nova parada cardiopulmonar sem resposta a medicamentos de ressuscitação (adrenalina, bicarbonato e glicose) culminando com o óbito.

4.3 – O Paciente 3

Um paciente do sexo masculino, com 10 anos de idade, que em 2012, se apresentava com febre, cefaléia, prostração, vômito, com leucopenia de 2,36 mil/mm³ e plaquetopenia de 14,8 mil/mm³. Apresentou sorologia positiva (IgM) para dengue. Possuía abdômen globoso, hepatomegalia dolorosa, taquidispneico, hipocorado, edemaciado e com exantema. Em poucas horas evoluiu para estado gravíssimo, em choque, sem pulsos sendo necessária a intubação. Através dos exames de imagens detectou-se hidrotórax e ascite. Via toracocentese, foram drenados 970 ml de líquido pleural. Apresentou sangramento ativo e hematúria, anasarca, culminando com parada cardiopulmonar sem resposta a medicamentos de ressuscitação (adrenalina, bicarbonato e glicose) culminando com óbito.

4.4 – Os pacientes controles

Para podermos comparar os achados encontrados e determinar quais as alterações nos tecidos infectados seriam causadas exclusivamente pelo vírus do dengue, buscamos órgãos de três crianças que tinham aproximadamente a mesma, idade (8 a 13 anos), que vieram a óbito por causa natural ou trauma e que não tinham nenhum histórico de dengue e de outras doenças infecciosas. Além disso, os controles

também não poderiam ter vindo a óbito por nenhuma patologia direta ou indiretamente relacionada a qualquer um dos órgãos analisados nesse estudo.

4.5 – O processamento das Amostras

Fragmentos de órgãos foram coletados por meio de necropsia, foram fixados em formaldeído 10% e pH=7,2, clivados em fragmentos menores (3 a 5mm) e lavados em água corrente. Foram desidratados com banhos de concentração crescente de etanol (70% a 100%), durante meia hora. E clarificados em banho de xilol a temperatura ambiente, e posteriormente infiltrados em parafina. Os blocos de parafina, com os referidos órgãos analisados no estudo, foram cedidos pelo patologista do Hospital Municipal Jesus do Rio de Janeiro, o doutor Fernando Rosman. Foram realizados cortes de 4µm de espessura em micrótomo (Leica RM-2235). Os cortes obtidos dos órgãos incluídos em parafina foram transferidos para as lâminas e corados para visualização em microscopia óptica utilizando Microscópio de Epifluorescência NIKON ECLIPSE E600, para observação em microscopia óptica de campo claro. As imagens foram capturadas com auxílio da câmara fotográfica Cool SNAP- Procf COLOR acoplada.

4.6 – As colorações Especiais

4.6.1 – A coloração Hematoxilina e Eosina (H.E.)

As lâminas com os cortes foram levadas à estufa (60°C por 24 horas) para desparafinização e submetidos a banhos de xilol e hidratação em concentrações decrescentes de etanol (100 a 70%), sendo lavados em seguida em água corrente, corados com hematoxilina durante 50 segundos, lavadas em água por 5 minutos, imersos em solução fraca amoniaca até os cortes ficarem azul-brilhante, novamente lavados por 10 minutos, imersos em álcool etílico 80% por 2 minutos, contracorados em solução de eosina por 40 segundos, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificados em concentração crescentes de xilol e por fim seladas com Entelan (Merk) e lamínula.

4.6.2 – A coloração Tricrômio de Masson

As lâminas foram desparafinizadas em três banhos com concentrações crescentes de xilol (70 a 100%) e em três banhos com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%). Em seguida, foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Foram imersos em solução mordente de Bouin e encubamos por 1 hora na estufa a 60°C e lavadas, em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução. Em seguida, foram lavadas em água destilada e coradas pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert e lavadas em água corrente por 10 minutos. Foram coradas pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos e lavadas em água destilada. Imersas em Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico por 10 a 15 minutos e lavadas com água destilada. Foram coradas com Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos e lavadas em água destilada. Foi adicionada solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos, e lavadas por água destilada e as lâminas e então montadas em Entelan (Merk).

4.6.3 – A coloração Ácido Periódico + Reativo de Schiff (P.A.S.)

As lâminas foram desparafinizadas em três banhos com concentrações crescentes de xilol (70 a 100%) e em três banhos com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%). Foram imersas em solução de ácido periódico 1% por 15 minutos, lavadas em água destilada por 5 minutos, coradas com reativo de Schiff por 15 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos e contra coradas pela Hematoxilina

de Harris por 10 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Desidratadas, clarificadas e por fim seladas com Entelan (Merk) e lamínula.

4.6.4 – Coloração Picrosírius

As lâminas foram desparafinizadas em três banhos com concentrações crescentes de xilol (70 a 100%) e em três banhos com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%). Em seguida, foram coradas com uma solução corante aquosa saturada de ácido pícrico e 0,1% Sirius Red F3BA durante 1 hora. Em seguida passaram por uma solução 0,01N HCl por 2 minutos. Então lavadas em água destilada e em seguida por água corrente. Passaram pela sequência de álcool 4,5,6 e depois no xilol 4, 5, 6

4.7 – A Imunohistoquímica

Foram realizados cortes (4 µm) das secções em parafina e transferidos para lâminas silanizadas. No primeiro dia, as lâminas com os cortes permaneceram na estufa a 60°C por uma hora, Foram desparafinizadas em três banhos com concentrações crescentes de xilol (70 a 100%) e em três banhos com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%). Posteriormente, foram lavadas em água corrente e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em solução tampão citrato (Diagnostic Biosystem, pH 6,0), imerso em banho maria (3 minutos a 100° C) com, e resfriadas em temperatura ambiente neste mesmo tampão. Foram lavadas em água destilada (1x) e em tampão Tris-HCl (ph 7,6) (3x), aplicamos solução bloqueadora de proteínas (Spring – Cód DPB-125) por 10 minutos. Por fim, foram lavadas em Tris-HCl (3x), e incubadas com o anticorpo primário por 24h em câmara escura úmida na geladeira.

No segundo dia, após permanecerem por 20 minutos em temperatura ambiente, foram lavadas com tampão Tris-HCl (3x) e o anticorpo secundário (Spring Bioscience) foi aplicado por 10 minutos, seguido do conjugado HRP (Spring Bioscience) por 15 minutos. Foram lavadas com tampão Tris-HCl (3x) e água destilada (1x), e o substrato para peroxidase (Kit DAB – DiagnosticBiosystems) foi aplicado por 5 minutos. Após as lâminas serem lavadas em água destilada, aplicamos a hematoxilina de Harris (Sigma) aos cortes, e lavamos em água corrente. As lâminas, por fim, foram submetida a três banhos em concentrações decrescentes de etanol (100 a 70%) e posteriormente a três banhos com concentrações decrescetens de xilol (100 a 70%). E por fim foram montadas em Entelan (MERK).

| Anticorpos | Marcas | Diluição |
|----------------------|-------------------------------------|---|
| Anti - NS3 | Insitituto de Biofísica UFRJ (RJ) | 1:100 ^a 1:300 ^{b,c,d} |
| Anti – T CD4+ | Abcam (Cambridge, UK) | 1;100 ^{a,b} |
| Anti – T CD8+ | Abcam (Cambridge, UK) | 1:200 ^{a,b} |
| Anti – CD68+ | Abcam (Cambridge UK) | 1:200 ^{a,b} |
| Anti –TNFα | Abcam (Cambridge, UK) | 1:200 ^a |
| RANTES | Abcam (Cambridge, UK) | 1:200 ^a |
| VEGF-R2 | Spring BioScience (California, USA) | 1:100 ^a |
| VCAM-1 | Abcam (Cambridge, UK) | 1:100 ^a |
| MMP9 | Abcam (Cambridge, UK) | 1:100 ^{a,b} |
| Anti DENV2 clone 3H5 | MERK (Darmstad, Germany) | 1:100 ^{a*} |

Tabela 2 - Lista dos Anticorpos utilizados para a realização da imunohistoquímica. Onde a = fígado; b = pulmão; c = língua e d = traqueia

4.8 – Gráfico da quantificação dos linfócitos T CD8+ e macrófagos CD68+ no fígado e no pulmão

Para a quantificação dos linfócitos T CD8+ e macrófagos CD68+, as lâminas foram observadas em Microscópio de Epifluorescência Olympus, onde foram selecionadas ao acaso 20 campos de cada lâmina (controle e casos) com uma área de 20 μm^2 e cada campo foi fotografada por câmara fotográfica Cool SNAP- Procf COLOR acoplada ao microscópio. As fotos foram analisadas visualmente e o total da contagem das células de cada campo foi plotado em tabela do Excel e posteriormente um gráfico foi gerado usando o aplicativo PrismaGraph versão 8.0.

4.9 – Gráfico da avaliação semiquantitativa dos danos no fígado e no pulmão

Para a análise semiquantitativa dos danos no fígado e no pulmão, observamos as lâminas em Microscópio de Epifluorescência Olympus, onde foram selecionadas ao acaso 20 campos de cada lâmina (controle e casos) com uma área de 10 μm^2 e cada campo foi fotografada por câmara fotográfica Cool SNAP- Procf COLOR acoplada ao microscópio. As fotos foram analisadas visualmente e cada campo foi classificado por uma graduação que variava de 0 a 4 de acordo com a intensidade do dano, onde 0 = sem alteração, 1 = alteração leve, 2 = alteração moderada, 3 = alteração elevada e 4 = alteração alta. Os dados obtidos de cada campo foram plotados em tabela do Excel e posteriormente foi gerado um gráfico usando o aplicativo PrismaGraph.

4.10 – Considerações Éticas

Os tecidos dos casos fatais analisados neste estudo foram provenientes de três casos fatais de dengue em crianças de até 12 anos, obtidos durante surtos epidêmicos de 2008 a 2012 no município do Rio de Janeiro, onde faz parte de um projeto maior que estuda a patogênese em casos fatais de dengue em humanos, esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FIOCRUZ, sob o número CAAE: 47525115.3.0000.5248.

5 – Resultados

5.1. Parâmetros hematológicos

A leucopenia e a plaquetopenia são alterações comuns durante a dengue. A leucopenia apresenta-se mais precocemente nos casos mais graves, caracterizados por hemorragias, observadas já no 2º dia e tendendo a se recuperar no 8º dia. A plaquetopenia está presente desde o 1º dia da infecção. A leucocitose pode ser considerada um indicativo de agravamento do quadro clínico.

O paciente do caso 1 apresentou níveis normais de leucócitos do primeiro ao quarto dia, passando depois a apresentar uma leucocitose. Os pacientes 2 e 3 apresentaram leucopenia já no primeiro dia. Essa diferença observada no quadro do paciente 1 pode se dever ao fato de que este paciente foi diagnosticado com bacteremia por *Pseudomonas* positiva em hemocultura, realizada exatamente no quinto dia, mesmo dia em que os níveis de leucócitos começam a subir.

Todos os pacientes do estudo apresentaram plaquetopenia, sendo que o caso 1 apresentou uma discreta recuperação nos níveis de plaqueta por volta do 8º dia, que não se sustentou e voltou a declinar.

As plaquetas continuam decaindo, mesmo após a fase aguda da doença. Os níveis mais baixos foram observados na fase da defeverscência. Este momento coincide com o extravasamento plasmático. Dessa forma, a contagem de plaquetas atua como uma ferramenta para monitoramento da progressão da doença (Srikiatkachorn e Green 2010).

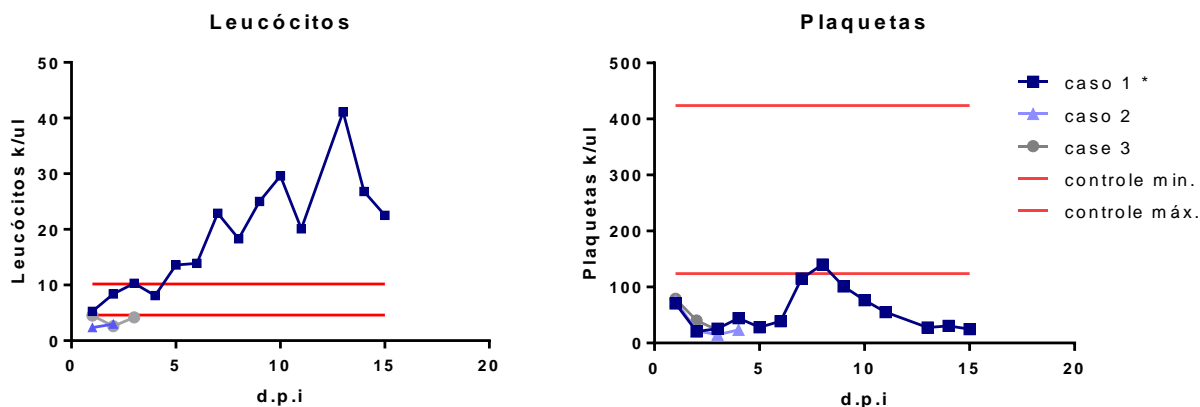


Gráfico 2 - Contagem de leucócitos e de plaquetas dos três casos de dengue fatal em crianças.

5.2 Parâmetros bioquímicos

A lesão provocada pelo DENV sobre o parênquima hepático provoca a liberação das enzimas ALT e AST na circulação sanguínea, com maior intensidade na fase aguda, portanto são bons parâmetros para avaliação do dano hepático causado pela infecção por DENV. Todos os pacientes do estudo apresentavam ambas enzimas elevadas. A enzima ALT do caso 2 atingiu um p3co de 1377 U/L no 2º dia, correspondendo a um aumento de 36x com relação ao limite máximo e a enzima AST do paciente 1 onde atingiu pico de 2.117 U/L, correspondendo a um aumento de mais de 68 vezes com relação ao limite máximo.

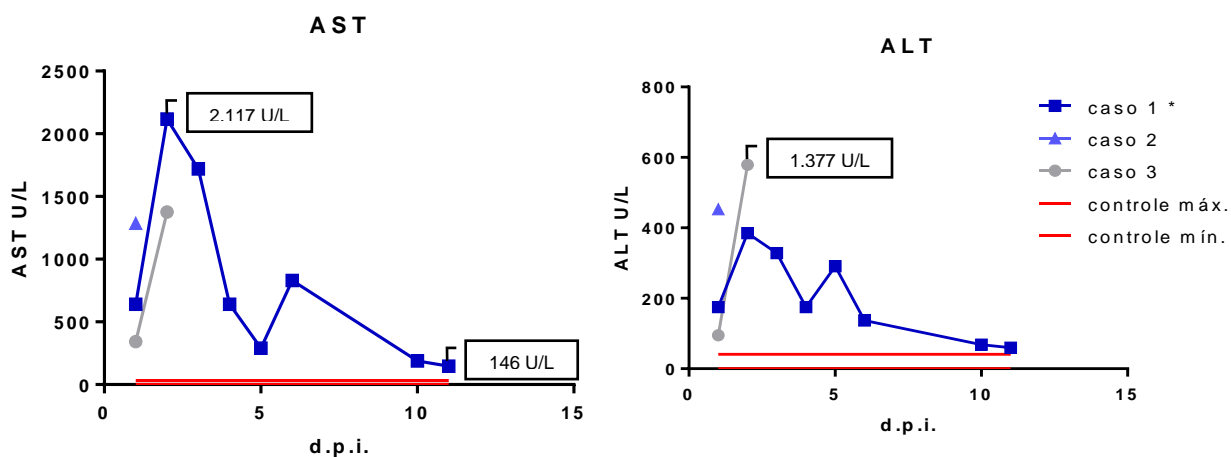


Gráfico 3 - Avaliação dos níveis séricos de AST e ALT em três casos fatais de dengue em crianças.

5.3 – Histopatologia hepática

5.3.1 – Coloração Hematoxilina e eosina (H.E.)

O parênquima hepático é constituído por hepatócitos justapostos que juntos formam os lóbulos hepáticos e tecido conjuntivo contendo ductos biliares, vasos linfáticos, vasos sanguíneos. O ducto biliar, o ramo da artéria hepática e o ramo da veia porta juntam e recebem o nome de espaço porta e se localizam nos cantos dos lóbulos (Fig. 13a).

No caso 1, foram observadas áreas focais de hemorragia (Fig. 1b) e degeneração gordurosa na forma de macroesteatose (Fig. 1c e c1).

Já no caso 2, foram observadas áreas de necrose hepatocitária em região medizional, hemorragia e congestão vascular (Fig. 1d e Fig. 1e), além de degeneração nuclear dos hepatócitos (Fig. 1f).

Enquanto que no caso 3, foram observadas áreas focais de necrose (Fig. 1g, Fig. 1h) e a presença de infiltrado mononuclear disseminado por todo parênquima hepático (Fig. 1i).

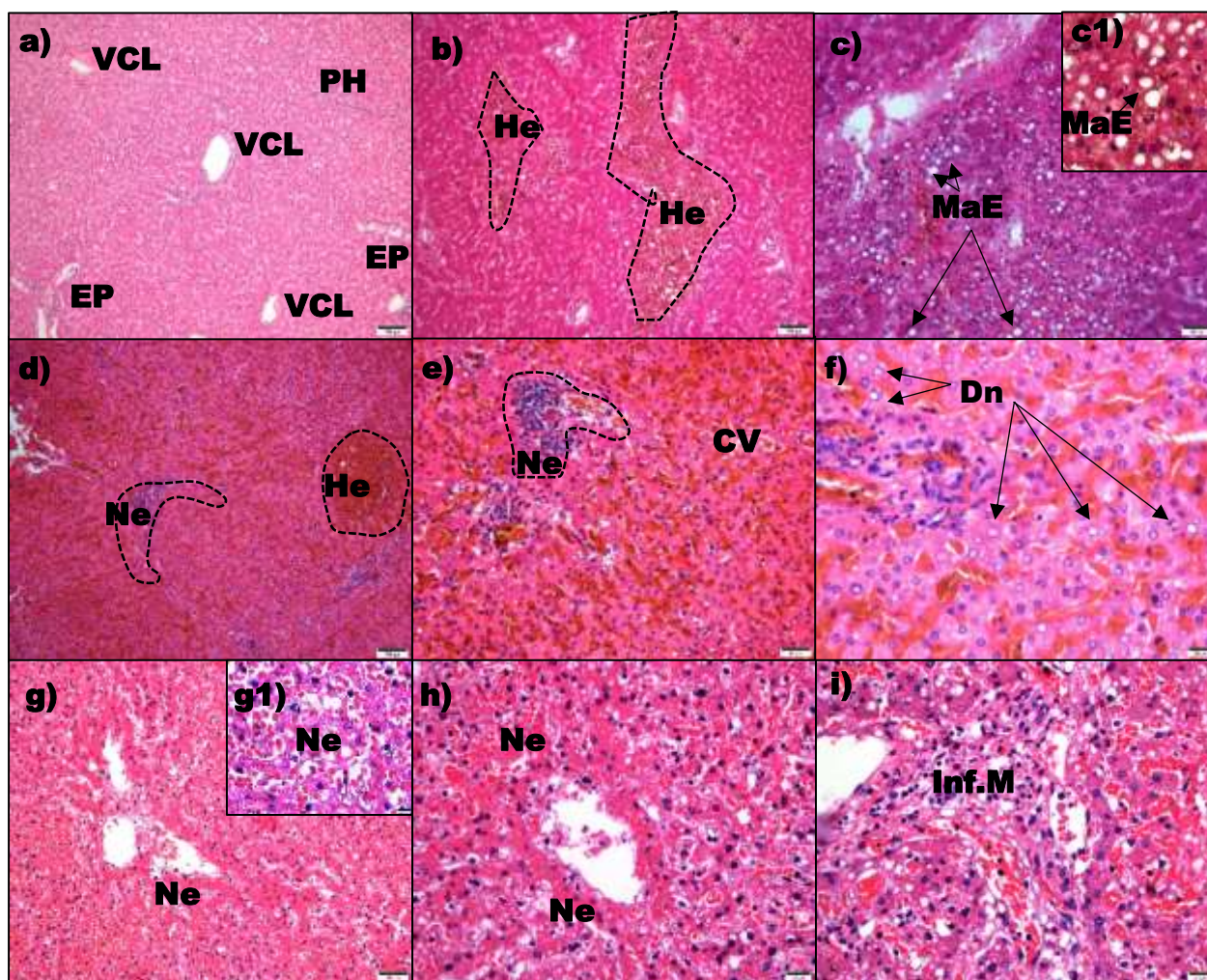


Figura 13- Corte histológico de tecido hepático controle e de tecido infectado com DENV corado com H.E. - a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c) Caso 2; d) Caso 3; PH - Parênquima hepático; VCL – Veia centrolobular; EP - Espaço porta; Ne – Necrose; MaE – Macroesteatose; He – Hemorragia; CV – Congestão vascular; Dn – Degeneração nuclear; Inf.M – Infiltrado mononuclear

5.3.2 – Coloração Tricrômio de Masson

Para evidenciar o acúmulo grosseiro de colágeno nas paredes vasculares foi utilizado a coloração de Tricrômio de Masson (TM). Com isso foi possível observar que o tecido controle de fígado de criança possui uma distribuição regular das fibras colágenas, com reação TM discretas (Fig. 14.a.).

No caso 1 foi observado, no tecido hepático, um aumento na distribuição das fibras colágenas ao redor do espaço porta e em áreas focais de necrose e hemorragia (Fig. 14.b).

No caso 2, foi visto um aumento da distribuição das fibras colágenas ao redor do espaço porta (Fig. 14c) e em áreas focais ao redor da veia centro lobular (Fig. 14.c1).

Já no caso 3, foi mostrado um aumento das fibras ao redor do espaço porta e uma distribuição das fibras em áreas difusas do parênquima associado à áreas de necrose na região mediozonal (Fig. 14d) Além de uma alteração endotelial da veia centrobular (Fig. 14.d1).

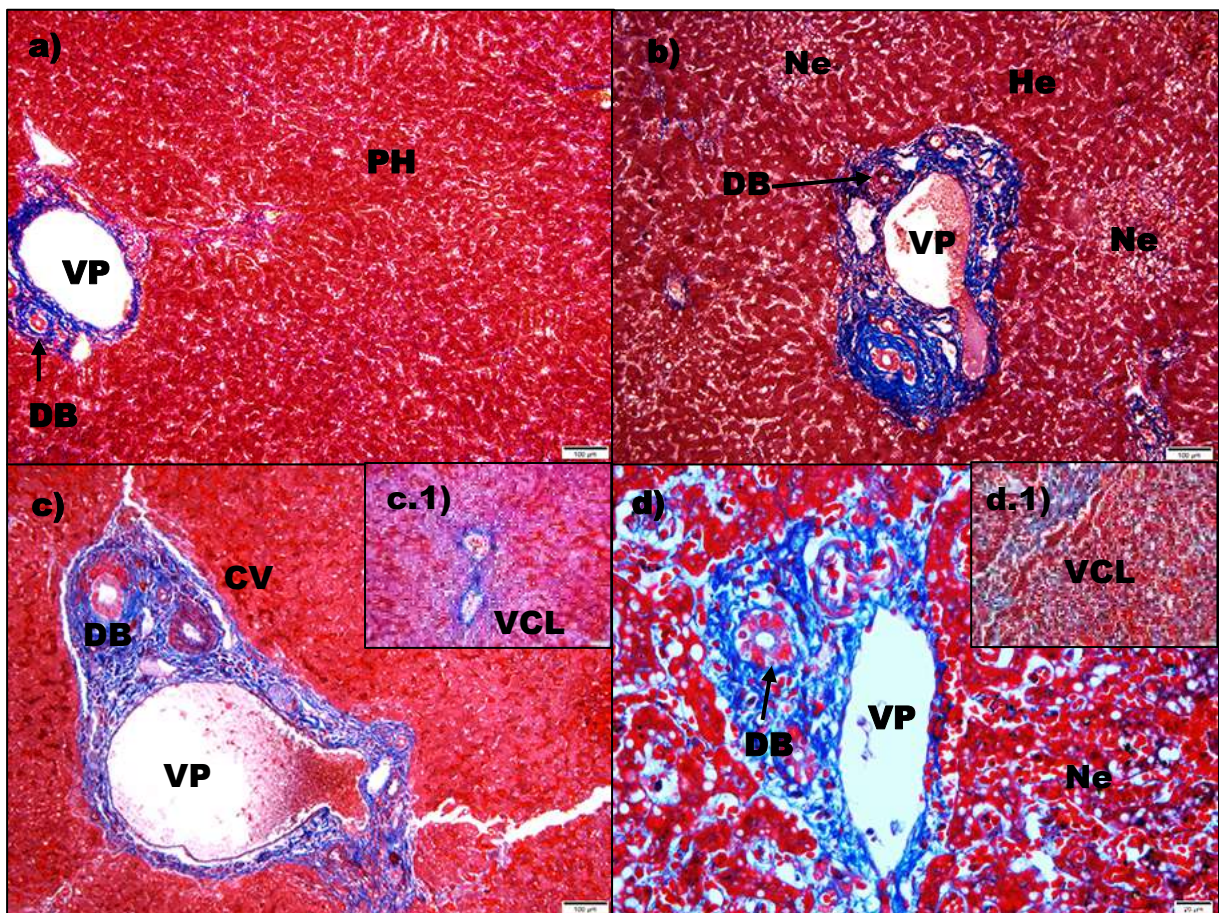


Figura 14 - Tecido hepático infectado com o DENV e corado com Tricrômio de Masson. a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c/c.1) Caso 2; d) Caso 3. PH – Parênquima hepático; VP – Veia porta; DB – Ducto biliar; Ne – Necrose; He – Hemorragia; CV – Congestão vascular.

5.3.2 - Coloração Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.)

A coloração de P.A.S. (do inglês Periodic Acid Schiff) é um método de coloração usado, principalmente, para detecção de alta concentração de moléculas de carboidratos nos tecidos, como por exemplo glicogênio e glicoproteínas, produzindo uma cor púrpura quando positivo.

Altos níveis de glicogênio são necessários em células que se encontram em intensa atividade metabólica, como por exemplo durante o processo de fagocitose.

No caso controle podemos observar o parênquima hepático com uma marcação negativa para P.A.S. no citoplasma dos hepatócitos, indicando baixa atividade metabólica (Fig. 15a).

Porém, no caso 1, observamos uma marcação positiva para P.A.S., caracterizado pela coloração púrpura, indicando maior atividade metabólica, como por exemplo fagocitose (Fig.15b).

No caso 2 observamos áreas de maior concentração de infiltrado inflamatório principalmente ao redor do espaço porta e uma área de degeneração nuclear grosseira, coincidindo com as áreas de marcação positiva para P.A.S.(Fig. 15c).

Já no caso 3 é possível observar extensa área de necrose hepatocitária (Fig. 15d) com algumas pequenas áreas positivas para P.A.S. ao redor do espaço porta.

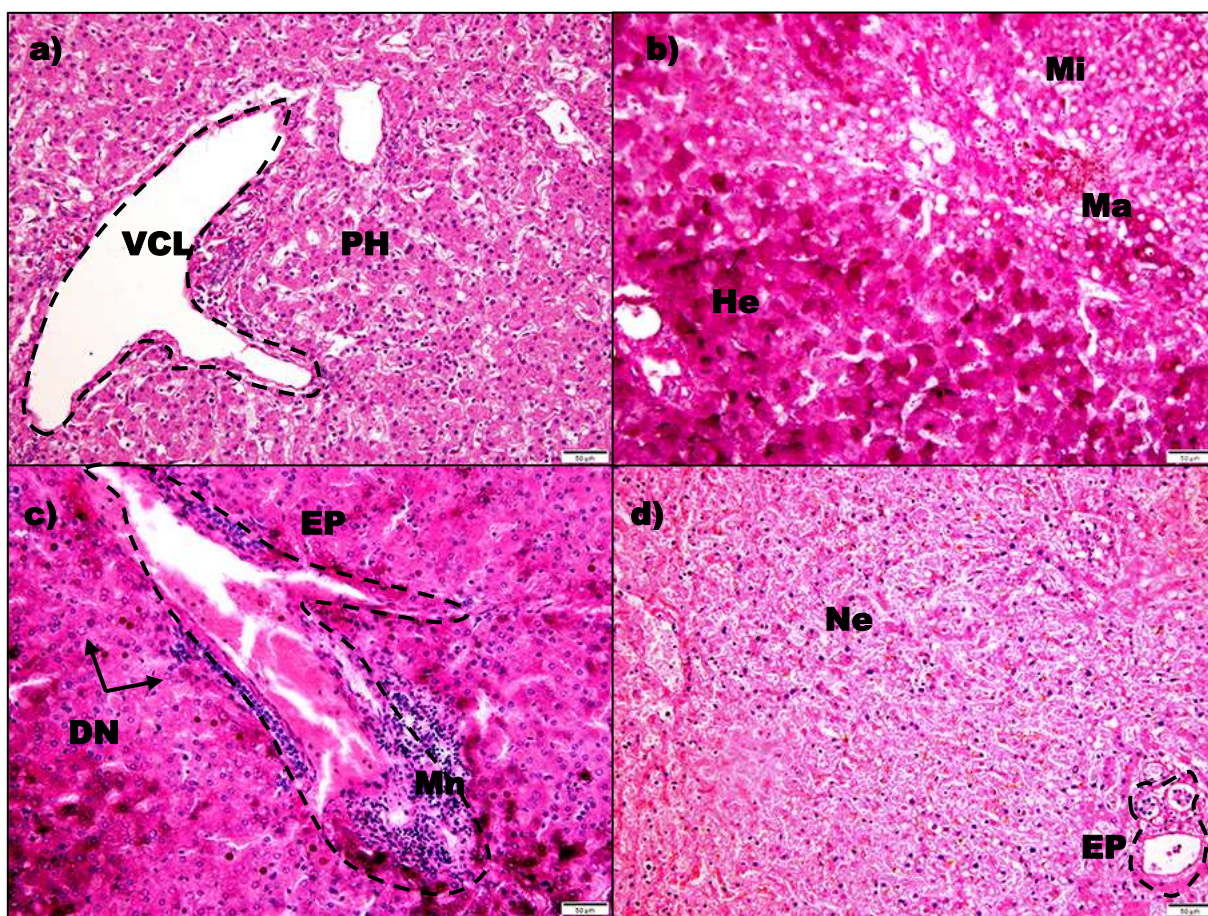


Figura 15 - Tecido hepático infectado com o DENV e corado com P.A.S.. a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c) Caso 2; d) Caso 3. PH – Parênquima hepático; VCL – Veia Centro lobular; Ma – Macrosteatose; Mi – Microsteatose; EP – Espaço porta ; DN – Degeneração nuclear; Mn – Infiltrado mononuclear; Ne – Necrose; He – Hemorragia.

5.3.4 – Coloração Picosírius

Picosírius é uma coloração seletiva de tecido conjuntivo que permite uma análise quantitativa das fibras colágeno.

Foi observado uma concentração normal de fibras colágenas ao redor do espaço porta no tecido hepático do grupo controle (Fig. 16a).

Enquanto que, no caso 1, foi observado uma intensa concentração das fibras ao redor do espaço porta e em áreas difusas na região mediozonal do parênquima hepático (Fig. 16b).

Já no caso 2, foi detectada uma moderada concentração de fibras colágenas ao redor do espaço porta e em algumas áreas da região mediozonal do parênquima hepático (Fig. 16c).

E no caso 3, ficou demonstrada uma menor concentração de fibras colágenas ao redor do espaço porta, porém uma maior concentração de fibras distribuídas na região mediozonal do parênquima hepático, provavelmente devido a necrose tecidual (Fig. 16d).

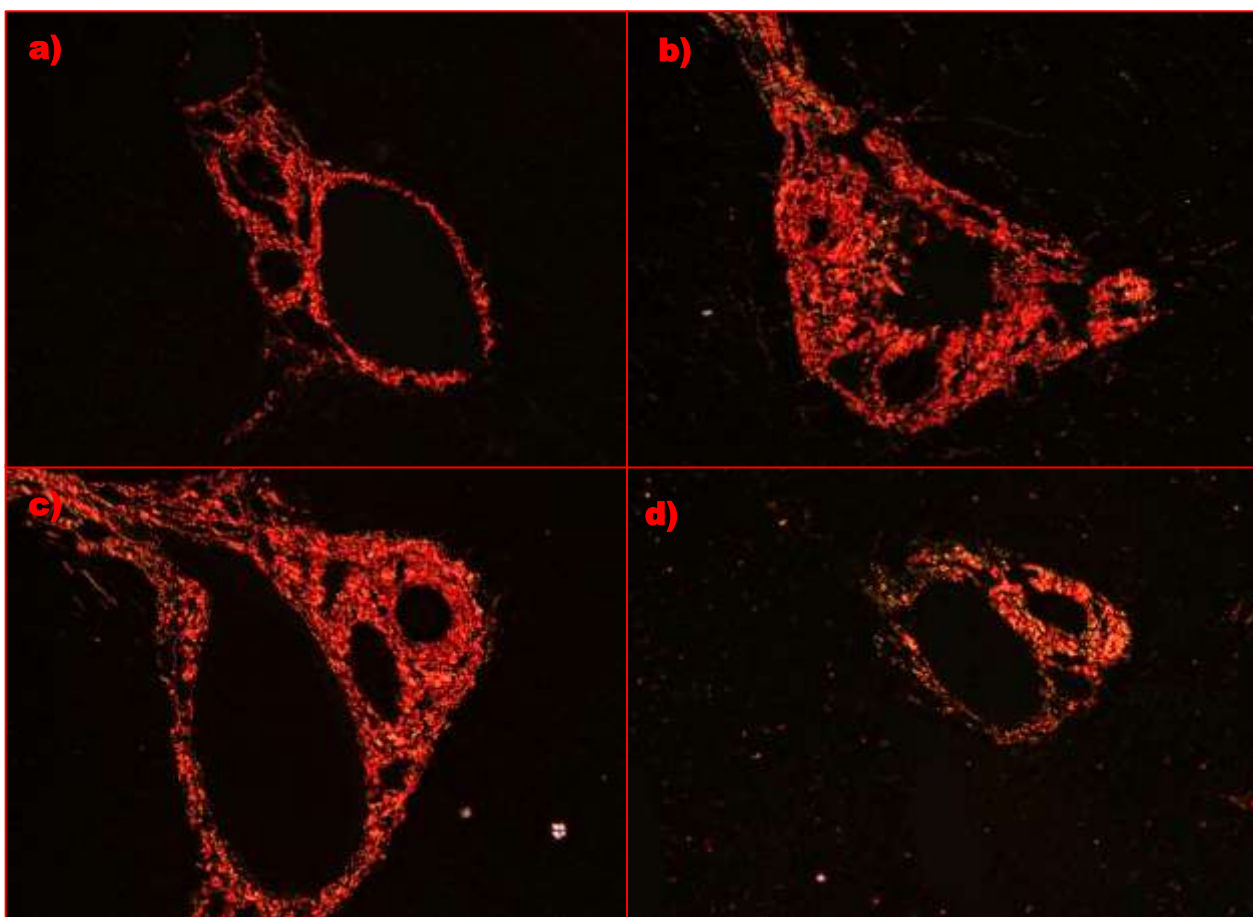


Figura 16 - Tecido hepático de crianças infectado com DENV e corado com Picosírius - a) Controle; b) Caso 1; c) Caso 2 e d) Caso 3.

5.4 – Avaliação semiquantitativa de danos no fígado

5.4.1 – Avaliação semiquantitativa do grau de fibras colágenas

Podemos observar através da quantificação das fibras de colágenas que o grupo controle apresentava baixo grau de fibras colágenas na região centrolobular e na região medizional, e um grau baixo a moderado na região periportal.

O caso 1 apresentava um concentração moderada de fibras colágenas na região centrolobular e na região medizional, e uma moderada a elevada concentração na região periportal.

O caso 2 apresentava uma moderada concentração de fibras colágenas na região centrolobular e na região medizional, e uma moderada a elevada concentração na região periportal.

Assim como no caso 3, onde foi observado uma moderada concentração de fibras colágenas na região centrolobular e medizional, e uma moderada a elevada concentração na região periportal. (Gráf. 4).

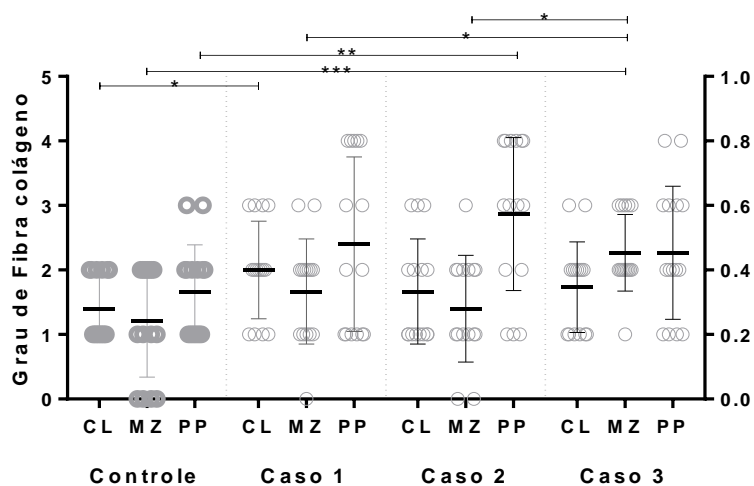


Gráfico 4 - Avaliação semiquantitativa de fibras colágenas no fígado de três casos fatais de DENV em crianças. CL - Centrolobular; MZ - medizional e PP - Periportal

5.4.2 – Avaliação semiquantitativa do grau de macro e microesteatose.

Macro e microesteatose são alterações que ocorrem no citoplasma das células, caracterizada pelo acúmulo de lipídeo em vacúolos, decorrentes de algum desequilíbrio do metabolismo celular.

O grupo controle apresentou um grau baixo a moderado de macro e microesteatose nas três regiões do fígado analisadas.

No caso 1, foi observado um grau elevado de macroesteatose principalmente na região centrolobular e medizional, e um grau baixo na região periportal (Gráf. 5a). Em relação a microesteatose, foi notado um grau elevado na região centrolobular, um grau moderado a elevado na região medizional e grau baixo na região periportal (Gráf. 5b).

No caso 2, foi mostrado um grau baixo a moderado de macroesteatose (Gráf. 5a) e de microesteatose (Gráf. 5b) nas três regiões do fígado.

Enquanto que no caso 3, foi visto elevados graus de macroesteatose (Gráf. 5a) e de microesteatose (Gráf. 5b) nas regiões centrolobular e medizional e grau moderado a elevado de macroesteatose e microesteatose na região periportal.

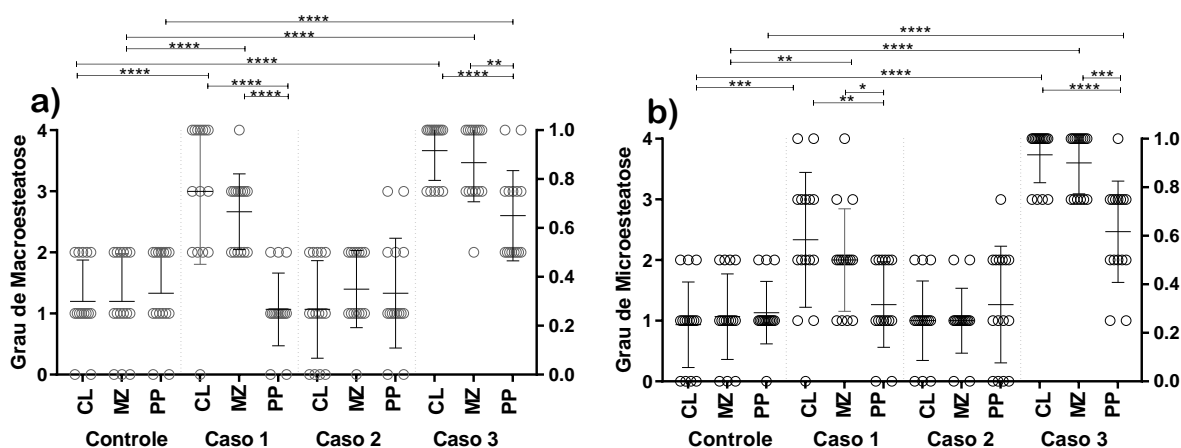


Gráfico 5 - Avaliação semiquantitativa do grau de degeneração gordurosa no fígado de crianças infectadas com DENV. a) macroesteatose b) microesteatose. CoM – Média dos controles; Ca1 – Caso 1; Ca2 - Caso 2; Ca3 – Caso3; CL - Centrolobular; MZ - mediozonal e PP - Periportal

5.4.3 – Avaliação semiquantitativa do grau de degeneração nuclear e necrose no tecido hepático.

Foi observado no controle grau baixo de degeneração nuclear e de necrose nas três regiões analisadas do fígado.

No caso 1 foram notados graus baixos a moderados de degeneração nuclear (Gráf. 6a) e alto grau de necrose (Gráf. 6b) nas três regiões analisadas do fígado.

No caso 2 foi visto moderado a elevado graus de degeneração nuclear tanto na região centro lobular quanto na região periportal e elevado grau de degeneração nuclear no região medizional (Gráf. 6a). Com relação ao grau de necrose, observamos baixo a moderado grau nas três regiões analisadas do fígado (Gráf. 6b).

Já no caso 3 foi mostrado graus baixos de degeneração nuclear na região centro lobular e na região medizional, enquanto a região periportal apresenta grau moderado (Gráf. 6a). Com relação ao grau de necrose, podemos observar grau máximo na região centrolobular e graus bem elevados nas regiões medizional e periportal (Gráf. 6b).

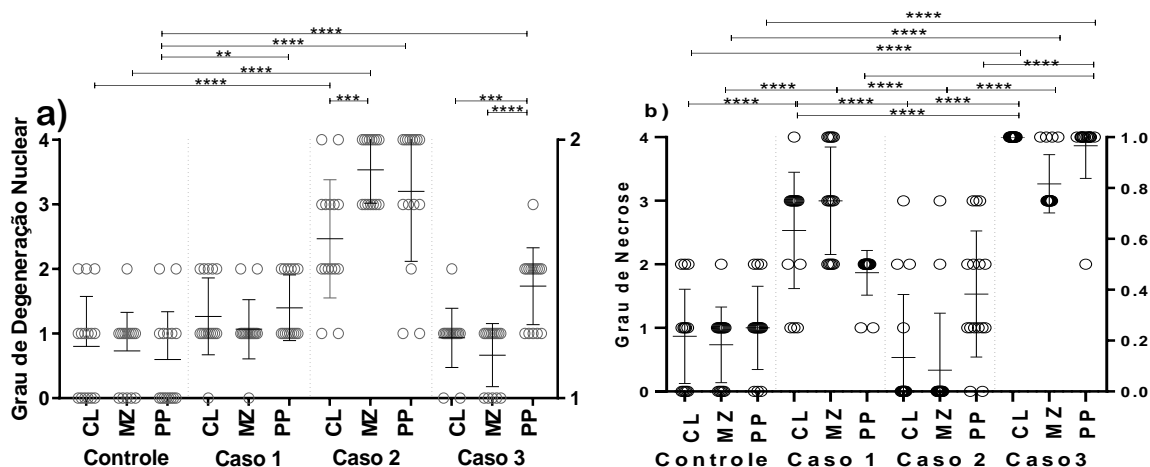


Gráfico 6 - Avaliação semiquantitativa do grau dano celular no fígado de crianças infectadas com DENV. a) degeneração nuclear; b) necrose. CoM – Média dos controles; Ca1 – Caso 1; Ca2 - Caso 2; Ca3 – Caso3; CL - Centrolobular; MZ - medizional e PP - Periportal

5.4.4 – Avaliação semiquantitativa do grau de hemorragia, edema e congestão vascular no fígado.

A hemorragia, o edema e a congestão vascular são alterações observadas em tecidos dos casos fatais de dengue. Através das comparações entre a média dos controles e os casos com dengue grave em criança podemos observar que as crianças que vieram a óbito por diferentes motivos e não tiveram dengue (controle) apresentavam baixos graus de hemorragia, edema e congestão vascular.

No caso 1 foi observado um elevado grau de hemorragia, principalmente na região medizional, porém um baixo grau de hemorragia na região periportal. A região centro lobular apresentava um grau médio de hemorragia (Gráf. 7a). Enquanto que no edema foi notado um grau moderado, principalmente na região centro lobular e moderado grau de congestão vascular nas regiões centro lobular e periportal (Gráf 7c). A região medizional apresentava grau baixo de congestão vascular (Gráf. 7b).

O caso 2 foi visto um grau moderado a elevado de hemorragia na região periportal, grau moderado na região medizional e grau baixo na região centrolobular (Gráf. 7a). Em relação ao edema, foram mostradas áreas de grau moderado a elevado na região periportal, moderado grau na região centrolobular e baixo na região medizional (Gráf. 7c). E em relação a congestão vascular, foram observadas elevados graus nas três regiões do fígado (Gráf. 7b).

Porém no caso 3, foram notados graus baixos a moderados de hemorragia nas três áreas analisadas do fígado (Gráf. 7a). Um baixo a moderado grau de edema foi visto em áreas das regiões centrolobular e medizional, porém um grau moderado a elevado na região periportal (Gráf. 7c). Já em relação a congestão vascular, foram notados graus elevados nas três áreas do fígado (Gráf. 7b).

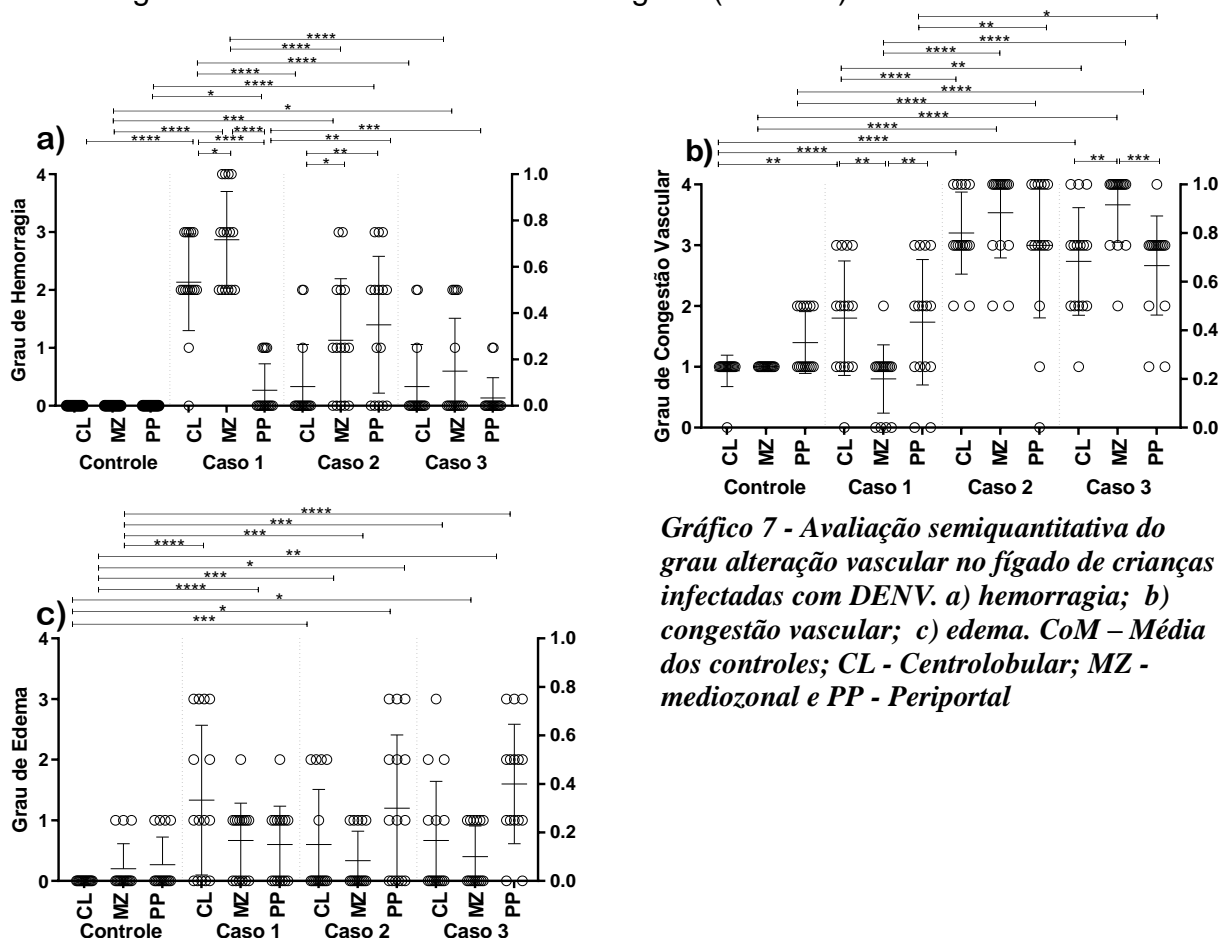


Gráfico 7 - Avaliação semiquantitativa do grau alteração vascular no fígado de crianças infectadas com DENV. a) hemorragia; b) congestão vascular; c) edema. CoM – Média dos controles; CL - Centrolobular; MZ - mediozonal e PP - Periportal

5.4.5 – Análise semiquantitativa do grau de infiltrado inflamatório

Uma das características do dengue grave é a resposta inflamatória exacerbada, que promove a migração excessiva de células T e macrófagos, além de uma produção exagerada de citocinas e mediadores inflamatórios levando a disfunção endotelial. Sabendo disso, decidimos analisar e quantificar a presença de células mononucleares nas diferentes áreas do tecido hepático.

Como resultado, foi observado que o controle apresentava um baixo grau de infiltrado mononuclear nas regiões medizional e centrolobular e um grau baixo a moderado na região periportal.

No caso 1 foi notada um grau moderado a elevado de células inflamatórias nas três regiões analisadas, principalmente nas áreas centrolobular e periportal (Gráf. 8).

No caso 2 foi mostrado um grau baixo a moderado de células inflamatórias na região centrolobular, um grau moderado na região medizional e um grau elevado na região periportal (Gráf. 8).

E no caso 3, foi visto um grau baixo a moderado de células mononucleares na região centrolobular, um grau moderado na região medizional e um grau moderado a elevado na região periportal (Gráf. 8).

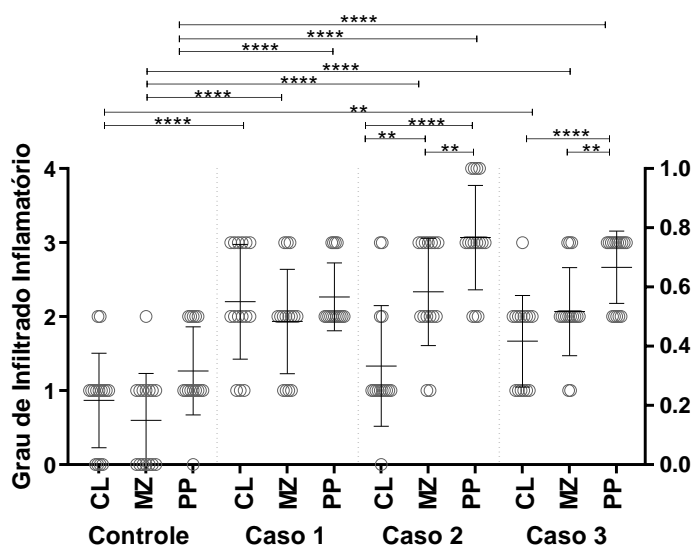


Gráfico 8- Avaliação semiquantitativa de infiltrado inflamatório no fígado de crianças infectadas com DENV. CoM – média dos controles; CL - Centrolobular; MZ - mediozonal e PP - Periportal

5.5 - Imunohistoquímica Hepática

5.5.1 – Detecção de células T CD4+ em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças

No caso controle podemos observar nenhuma marcação para células T CD4+ ao redor da veia porta. (Fig 17a)

No caso 1, foi observado a presença de algumas células T CD4+ distribuídas pelo parênquima intersticial (Fig. 17b). No caso 2, foi visto a expressão de T CD4+ no interior da veia porta (Fig. 17c) e em área de hemorrhagia no parênquima hepático (Fig. 17d).

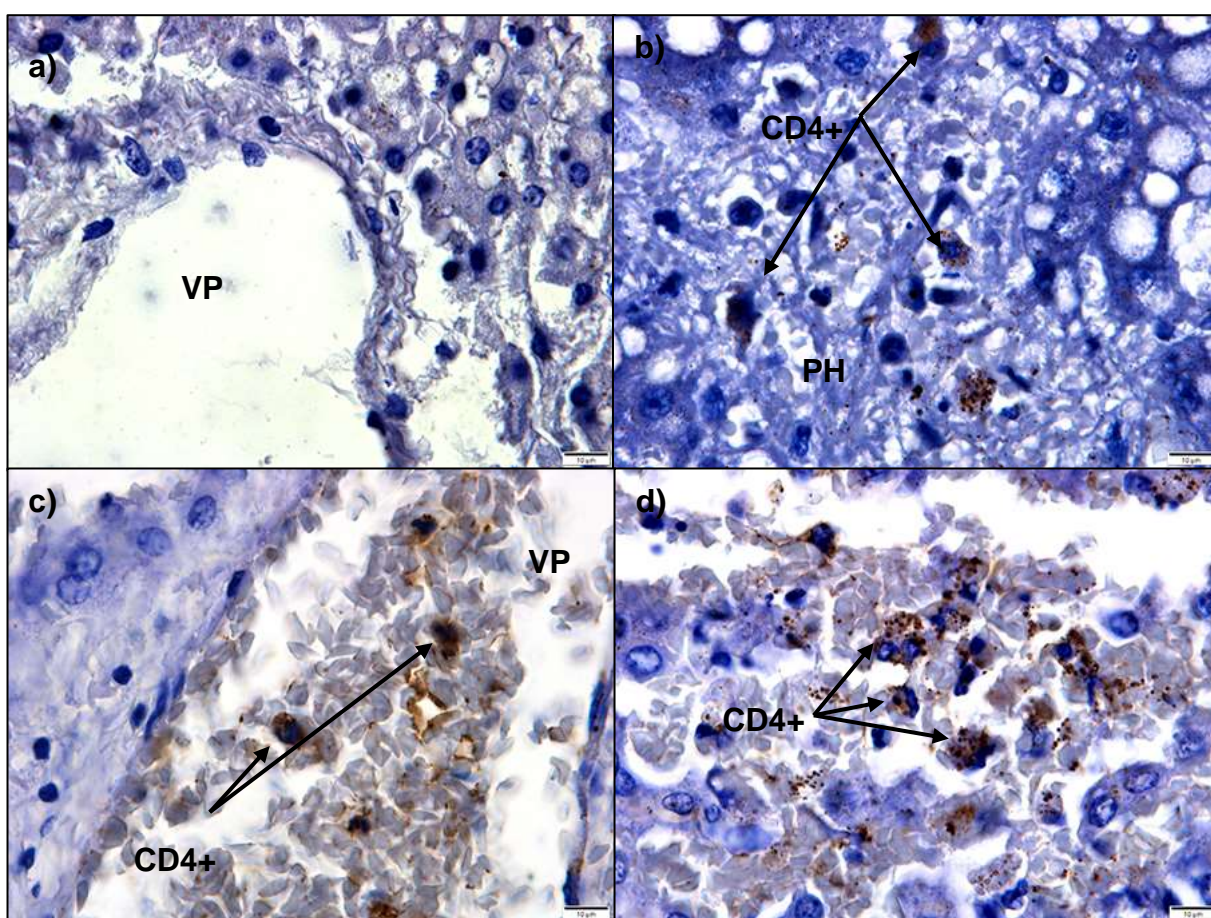


Figura 17 - Detecção de células TCD4+ em parênquima hepático de casos fatais de DENV em crianças. a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c e d) Caso 2; VP – Veia Porta. PH- Parenquima hepático

5.5.2 - Detecção de células T CD8+ em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

A investigação para a presença de células T CD8+ no parênquima hepático evidenciou níveis menores nos tecidos controle (Fig. 18a) se comparado aos casos de DENV.

Foi possível observar um aumento na concentração de células T CD8+ em capilares sinusoidais do caso 1 (Fig. 18b), ao redor do espaço porta do caso 2 (Fig. 18c) e no parênquima hepático do caso 3 (Fig. 18d).

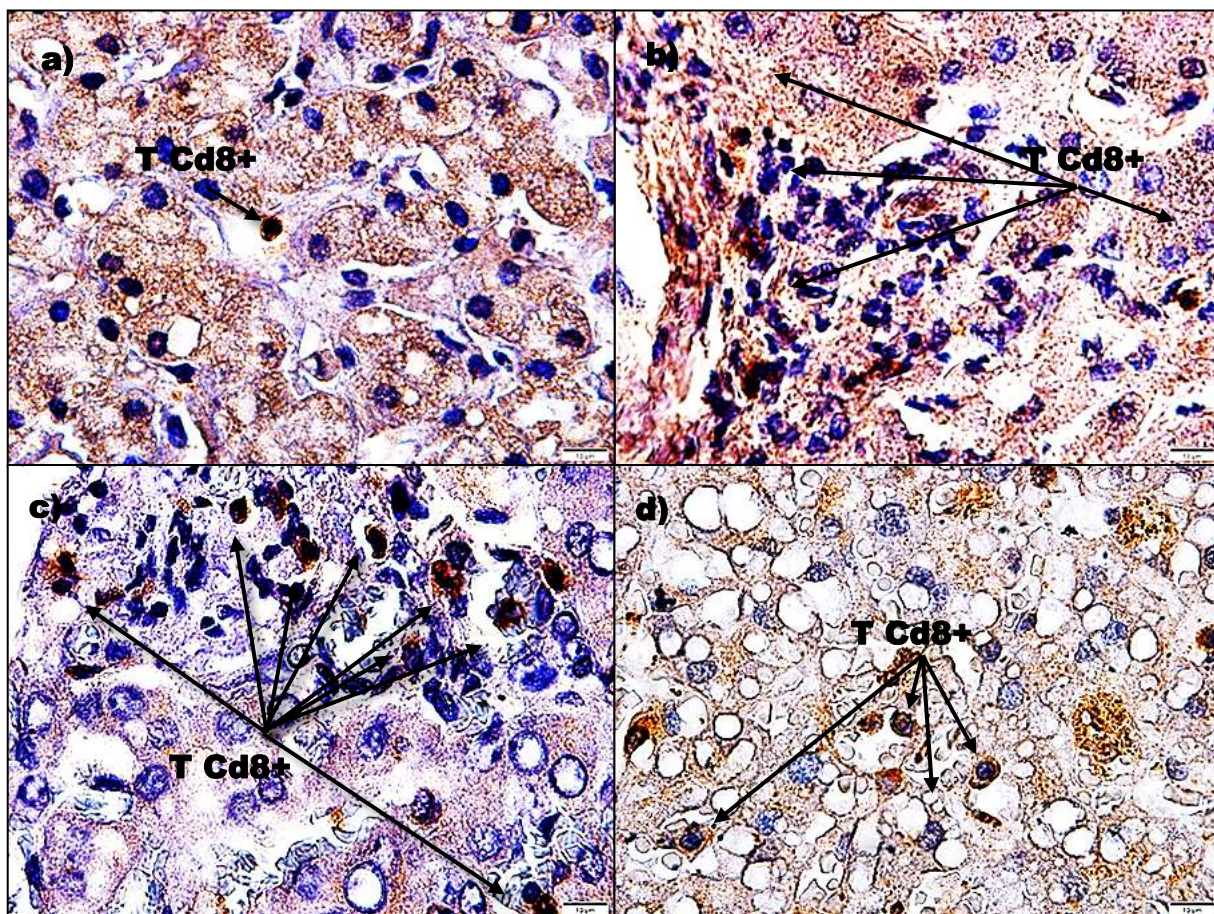


Figura 18 - Detecção de L TCD8+ em parênquima hepático infectado com DENV. a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c) Caso 2; d) Caso 3.

5.5.3 – Quantificação do número de linfócitos T CD8+ no tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

Foi observado uma maior concentração de TCD8+ no tecido hepático do caso 1 que teve em média de aproximadamente 22 linfócitos por campo, sendo encontrados até 38 linfócitos por campo. Seguido pelo caso 2, com uma média de aproximadamente 18 linfócitos por campo. E, por fim, o caso 3, com uma média de aproximadamente 15 linfócitos por campo (Gráf 9).

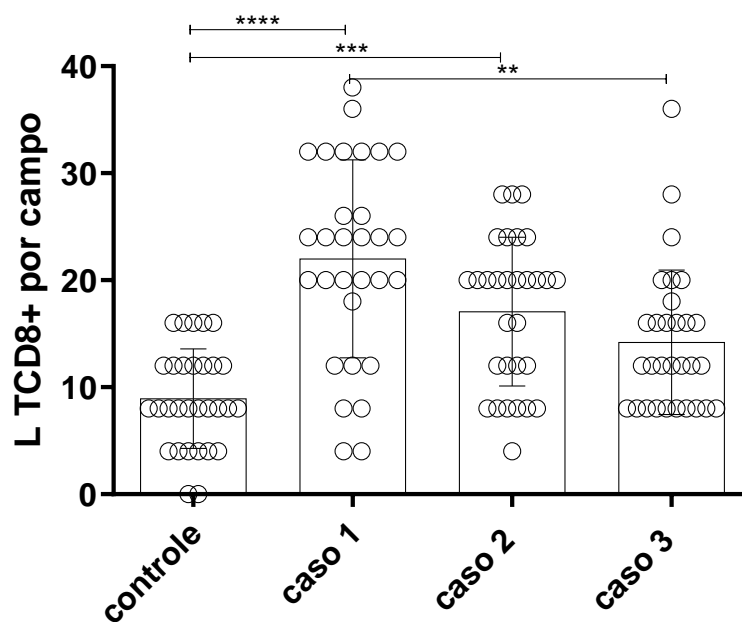


Gráfico 9 - Quantificação do número de linfócitos TCD8+ por campo de tecido hepático.

5.5.4 – Detecção de macrófagos (CD68+) em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

A investigação para a presença de macrófagos (CD68+) no parênquima hepático evidenciou níveis normais quando analisado o tecido controle (Fig. 19a). Porém foi possível observar um aumento na concentração de CD68+ no parênquima hepático do caso 1 (Fig. 19b). Foi expressado no parênquima e nos capilares sinusoidais do caso 2 (Fig. 19c), assim como no caso 3 (Fig. 19d).

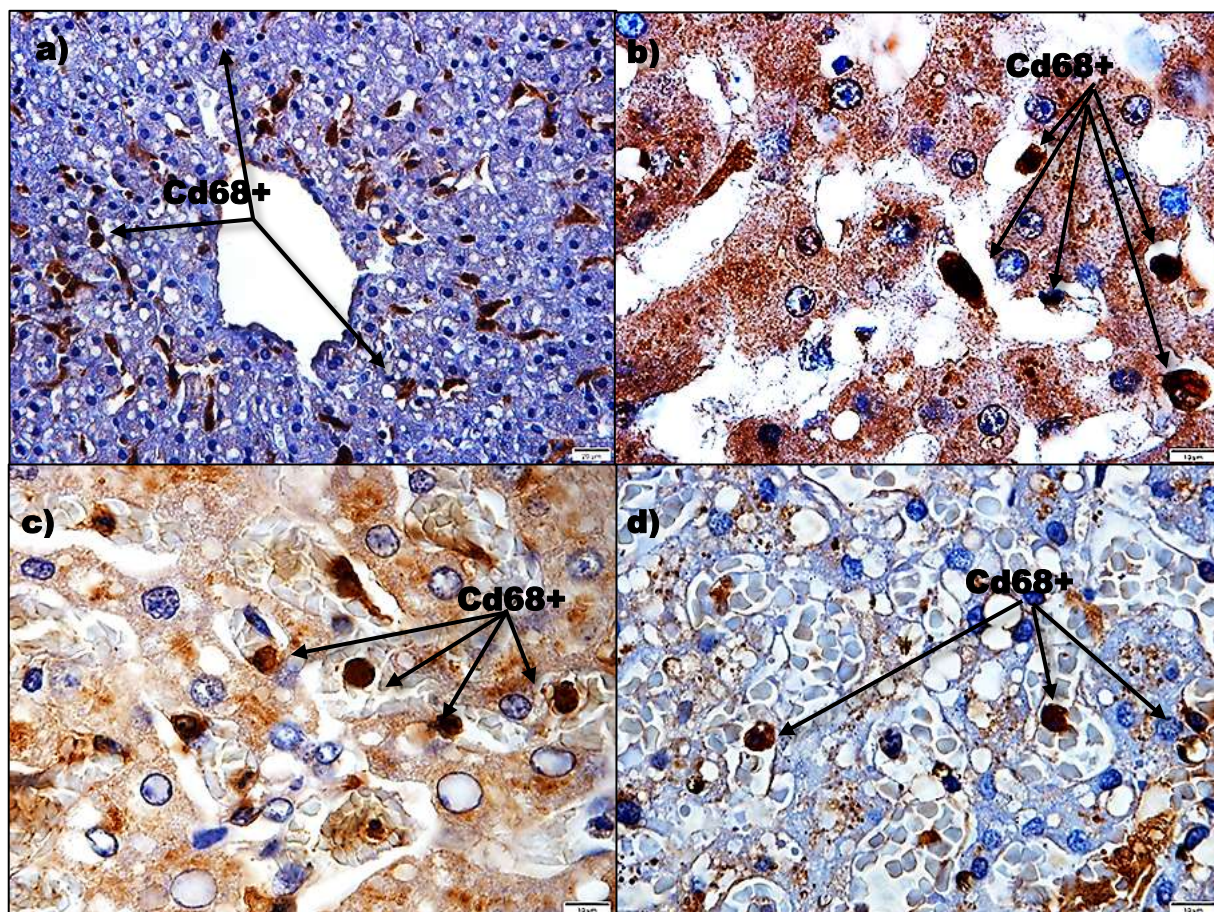


Figura 19 - Detecção de L TCD68+ em parênquima hepático infectado com DENV. a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c) Caso 2; d) Caso 3.

5.5.5 – Quantificação do número de macrófagos (CD68+) em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

Foi observado uma concentração similar de CD68+ no tecido hepático dos três casos infectados, apresentando uma média de 25 a 30 macrófagos por campo. As regiões medizonais dos caso 1 e do caso 3 possuíam maiores concentrações do que as outras regiões. Enquanto que, o caso 2 apresentou uma maior concentração ao redor do espaço porta (Gráf. 10). Foi observado diferença estatisticamente significativa entre o controle e o caso 1 e entre o controle e o caso 3 na região centrolobular, entre controle e o caso 3 na região medizonal e entre o controle e o caso 1 e o caso 3 na região periportal. Também houve diferença estatisticamente significativa entre o caso 2 e o caso 3 na região medizonal (Tab.4).

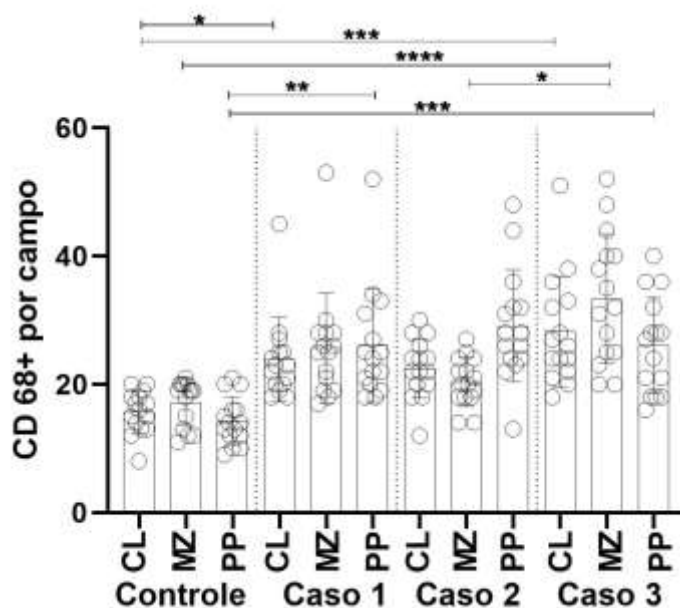


Gráfico 10 - Quantificação do número de macrófagos CD68+ por campo de tecido hepático.

5.5.6 - Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

Como já foi dito anteriormente, o NS3 é uma proteína não estrutural do DENV que esta relacionada com a replicação viral. Uma marcação positiva no tecido indica que o vírus foi capaz de invadir aquele tecido e de se replicar em seu interior.

No tecido de fígado controle não há a detecção da proteína NS3 ao redor da veia centrolobular e nem nos capilares sinusoidais (Fig 20a).

O tecido hepático do caso 1 podemos observar a expressão do antígeno NS3 em hepatócitos com macroesteatose e em macrófagos nas áreas de necrose intersticial (Fig. 20b).

Já no caso 2, foi detectado o antígeno da proteína NS3 nas células de Kupffer (Fig. 19c) e em macrófagos na área portal (Fig. 20c1).

Assim como no caso 3, onde obseramos a detecção da proteína NS3 em macrófagos circulantes (Fig. 20d), em células de Kupffer e no interior de hepatócitos (Fig. 20d1).

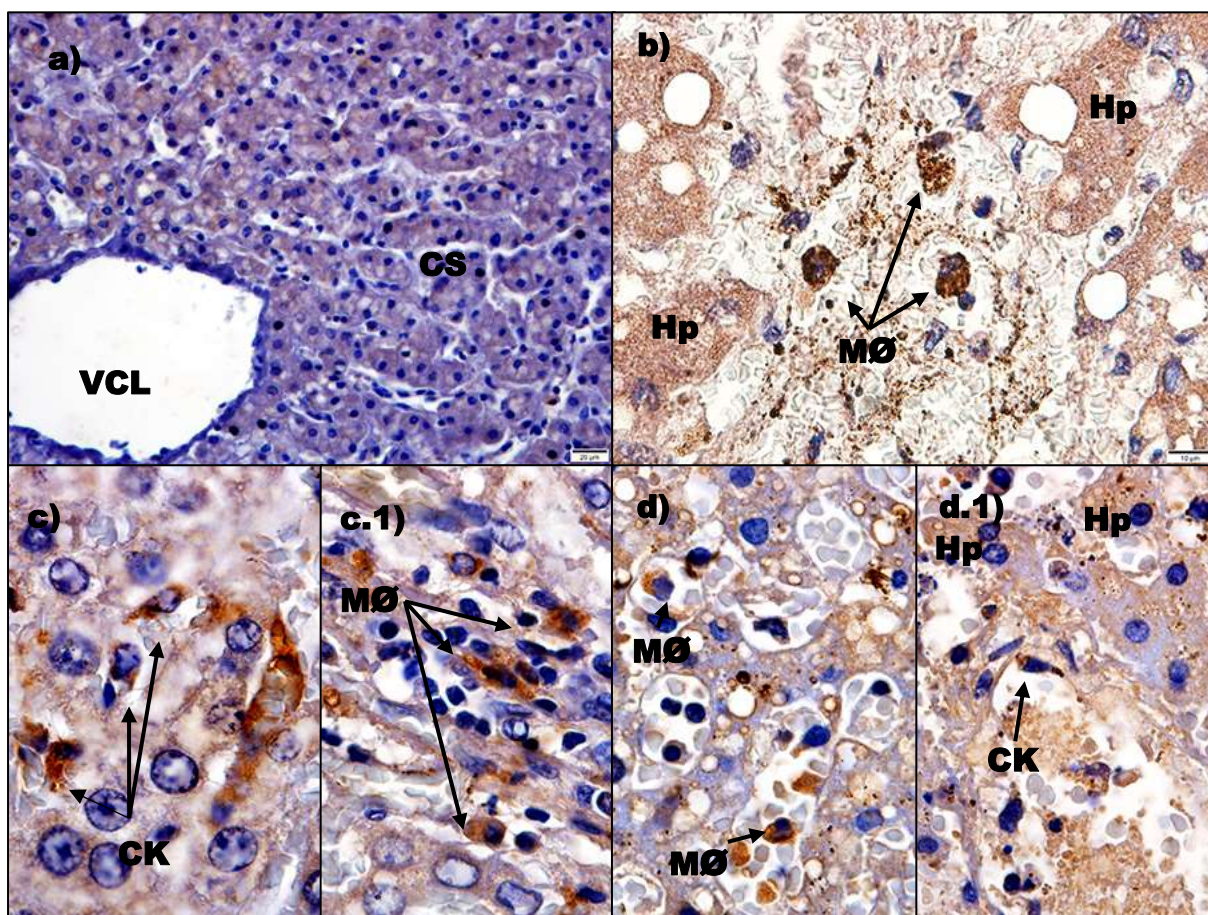


Figura 20 – Detecção da proteína NS3 em tecido hepático infectado pelo DENV – a/b.1) Tecido hepático controle de um caso de criança; c) Caso 1 d/d1) Caso 2; e/f) Caso 3; EP – Espaço portal; CS – Capilares sinusoidais; Ck – Células de Kupffer; Mø – Macrófago; Hp – Hepatócitos; Ne – Necrose..

5.5.7 – Detecção de TNF- α em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

A expressão de TNF- α foi detectada em baixa concentração ao redor da veia porta no tecido controle de fígado de criança (Fig.21a).

Porém, no caso 1 houve a detecção de TNF- α em macrófagos ao redor do espaço porta (Fig.21b).

Já o caso 2 apresentava uma maior concentração de TNF- α ao redor do espaço porta (Fig. 21c) e também em macrófagos (Fig. 21c1).

Enquanto que o caso 3 apresentava uma alta concentração de TNF- α nos capilares sinusoidais (Fig.21d).

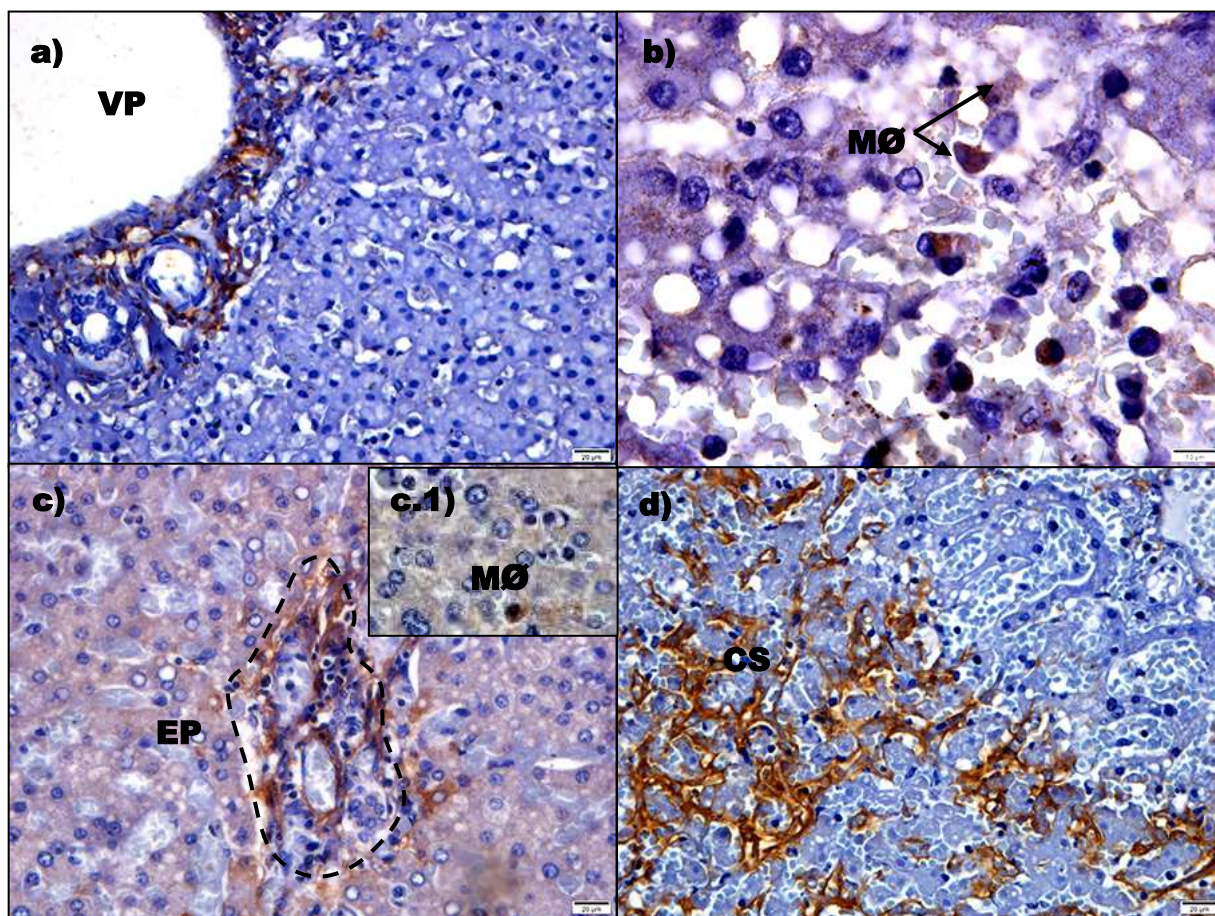


Figura 21 – Detecção de TNF- α no parênquima hepático de um caso fatal de DENV em criança. – a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c/c1) Caso 2; d) Caso 3. ; VP. – Veia porta; MØ – Macrófago; EP – Espaço porta e CS – Capilar sinusoidal.

5.5.8 – Detecção de RANTES em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

No parênquima do tecido controle, foram observados uma discreta expressão de RANTES, tanto ao redor do espaço porta (Fig. 22a) quanto nos capilares sinusoidais (Fig. 22a1).

No caso 1, houve marcação positiva para RANTES em macrófagos circulantes e em células endoteliais dos capilares sinusoidais (Fig. 22b).

No caso 2, houve a detecção de RANTES em célula endoteliais da veia porta, em macrófagos circulantes e em linfócitos do infiltrado mononuclear (Fig. 22c).

Já no caso 3, foram detectadas marcações para RANTES em células endoteliais dos capilares sinusoidais e em células de Kupffer (Fig. 22d)

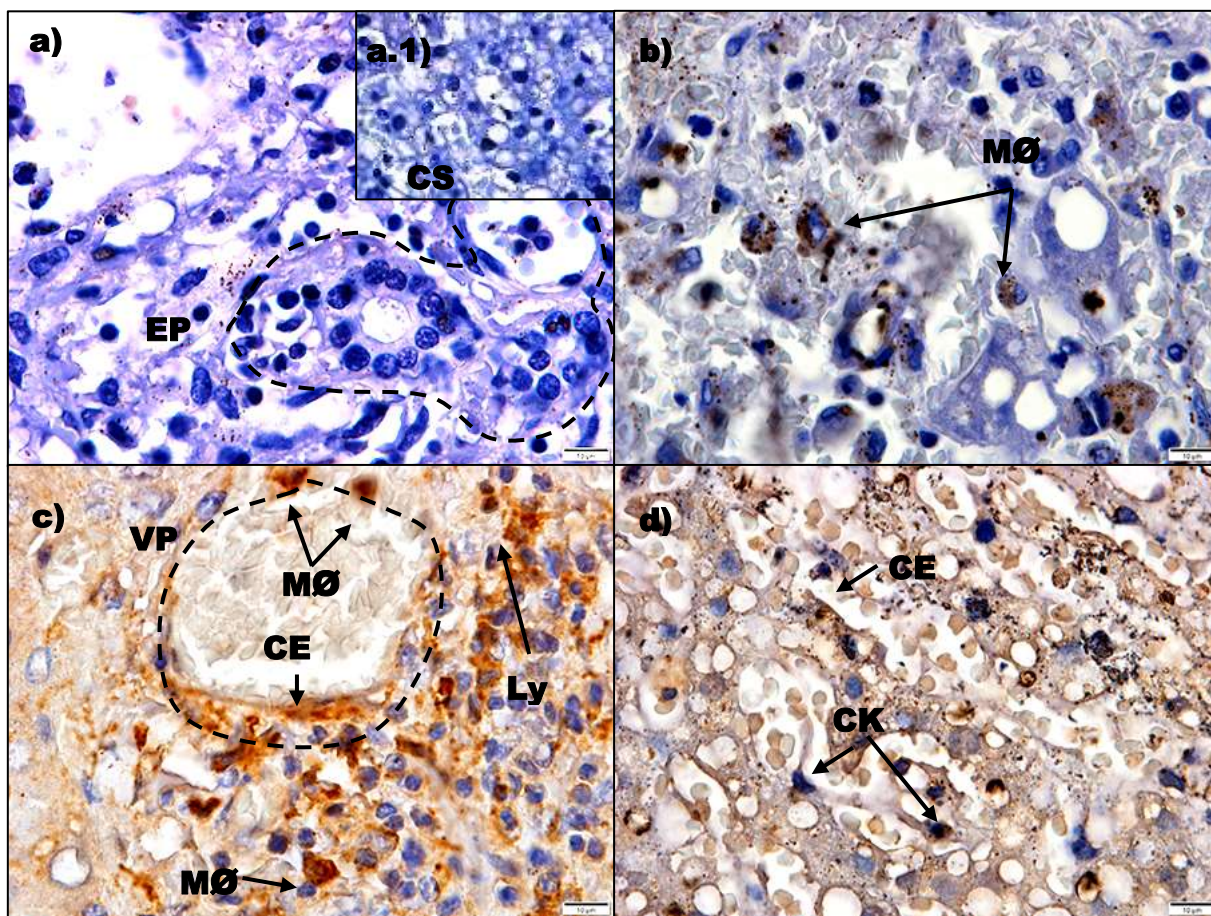


Figura 22 - Detecção de RANTES em parênquima hepático de um caso fatal de DENV em criança. – a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) caso 1; c) Caso2; d) Caso 3. EP – Espaço porta; CS. – Capilares sinusoidais; CE. – Células endoteliais; MØ – Macrófago; VP – Veia porta; Ly – Linfócito; CK – Célula de Kupffer.

5.5.9 – Detecção de VEGF-R2 em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

Não foi detectado VEGF-R2 no parênquima hepático do controle (Fig. 23a). Porém foi detectado em macrófagos circulantes no caso 1 (Fig. 23b).

Também foi detectado o VEGF-R2 em células endoteliais de capilares sinusoidais e em macrófagos circulantes do parênquima hepático do caso 2 (Fig. 23c). E em macrófagos circulantes do caso 3 (Fig. 23d).

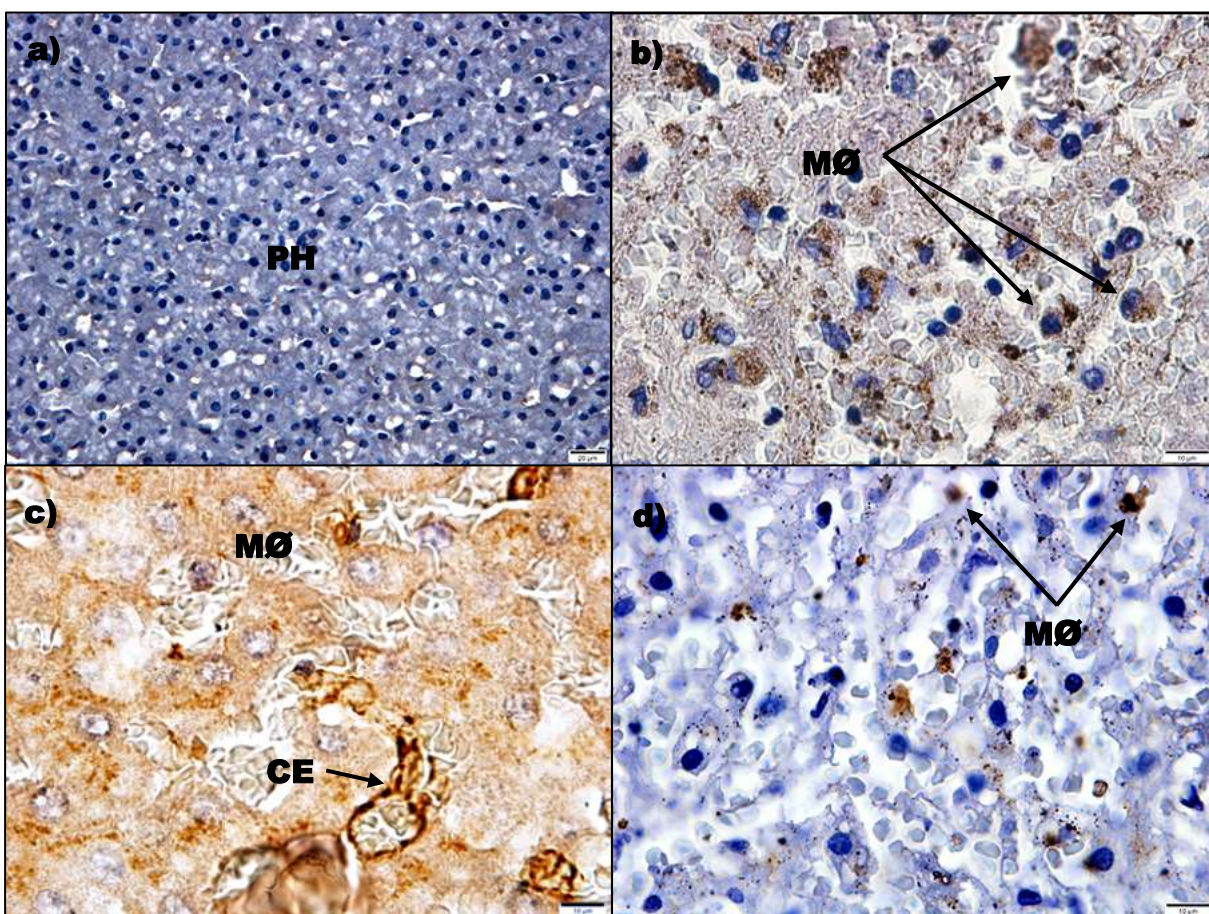


Figura 23 - Detecção de VEGF-R2 em parênquima hepático de um caso fatal de DENV em criança. – a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) caso 1; c) Caso 2; d) Caso 3. PH – Parênquima hepático; MØ – Macrófago; CE. – Células endoteliais;

5.5.10 – Detecção de VCAM-1 em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

O tecido controle não apresentou marcação positiva para VCAM-1 em seu parênquima hepático (Fig. 24a)

Já no caso 1 foi observado a detecção de VCAM-1 positivo no interior das células endoteliais da veia porta (Fig. 24b) e nos capilares sinusoidais (Fig. 24b1).

E no caso 2 foi visto uma marcação positiva para VCAM-1 nas células endoteliais dos capilares sinusoidais e no interior dos hepatócitos ao redor do vaso (Fig. 24c).

Enquanto que no caso 3 também observada uma marcação positiva para VCAM-1 nas células endoteliais dos capilares sinusoidais (Fig. 24d).

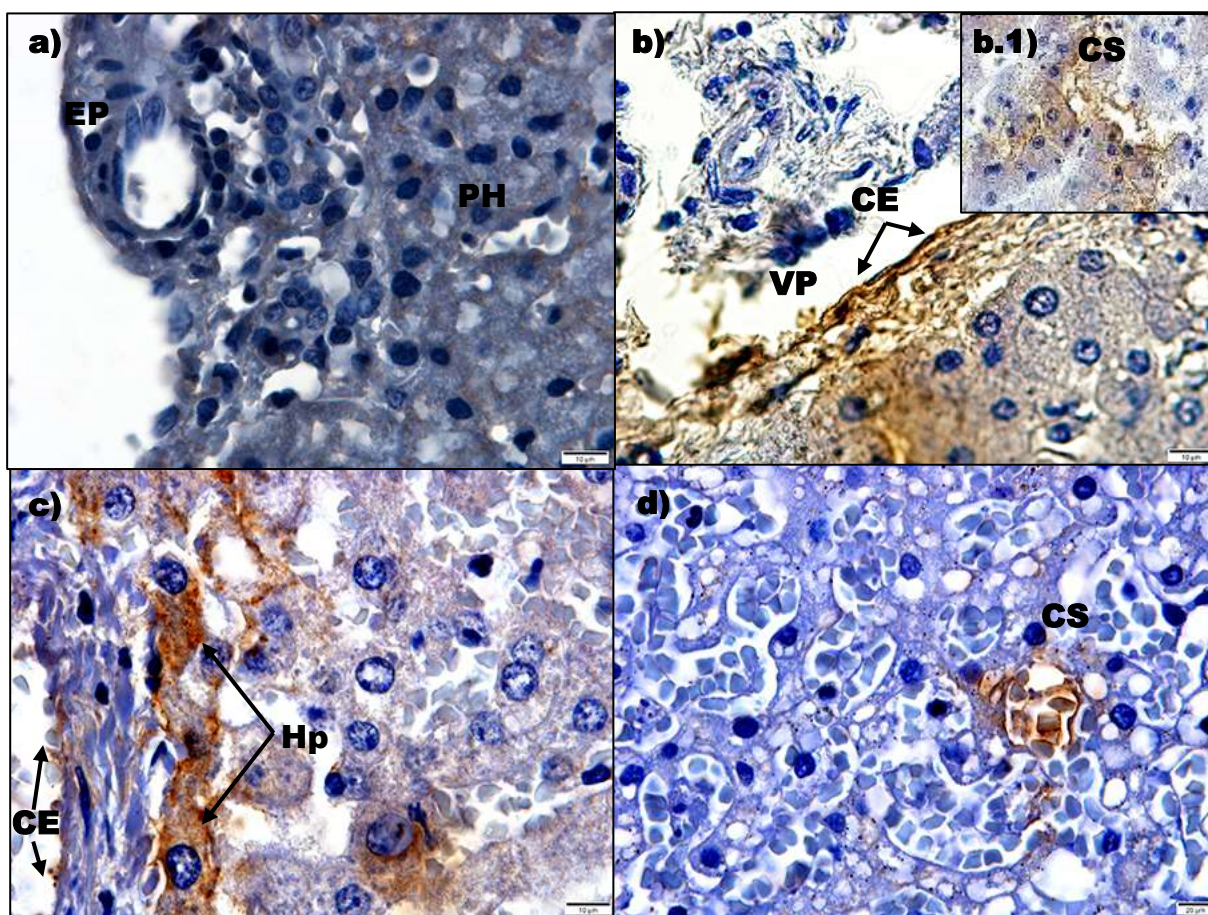


Figura 24 - Detecção de VCAM-1 em parênquima hepático de um caso fatal de DENV em criança.
– a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b/b.1) Caso 1 c) Caso 2 d) Caso 3 ; EP – Espaço Porta; PH – Parênquima hepático; CE. – Células endoteliais; VP. – Veia porta; CS. – Capilares sinusoidais

5.5.11 - Detecção da metaloproteinase MMP9 em tecido hepático de casos fatais de dengue em crianças.

No caso controle não houve marcação positiva para MMP9 (Fig. 25a).

No caso 1 foi visto a detecção de MMP9 no interior de macrófagos e em hepatócitos com a presença de inúmeras vesículas de macroesteatose (Fig. 25b).

Já no caso 2, foi observado a detecção para MMP9 no interior de hepatócitos necróticos com degeneração nuclear evidente e em monócitos no interior dos capilares sinusoidais (Fig. 25c).

Enquanto que no caso 3 foi detectada a expressão de MMP9 em macrófagos e em células endoteliais (Fig. 25d).

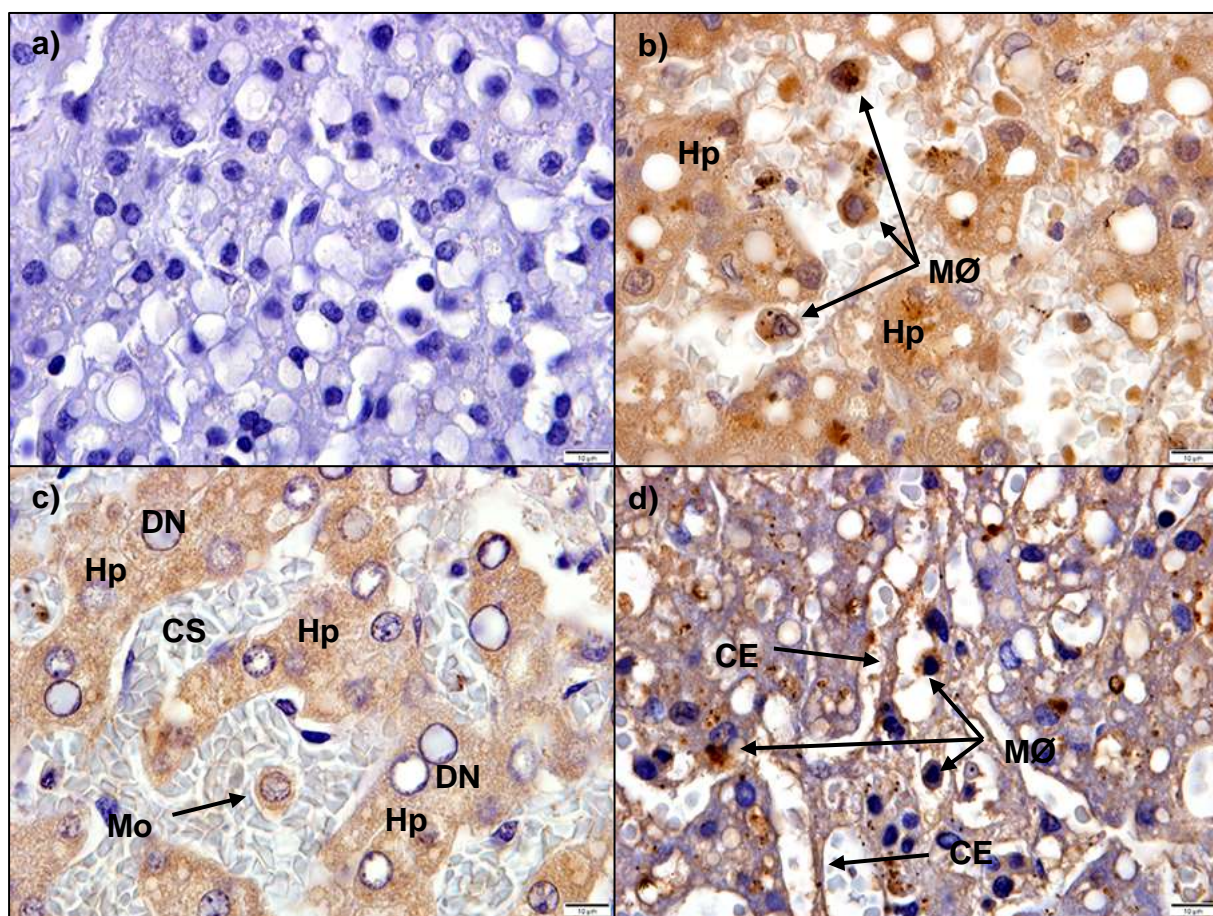


Figura 25 - Detecção de MMP9 em parênquima hepático de casos fatais de DENV em crianças. a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c) caso 2 e d) Caso 3; MØ – Macrófago; Hp – Hepatócito; DN- Degeneração nuclear; Mo – Monócito; CE – célula endotelial. CS Capilares Sinusoidais

5.5.12 – Detecção do antígeno de DENV2, pelo anticorpo 3H5, em tecido hepático de caso fatal de dengue em criança.

Para detecção de DENV2 no caso 1 foi utilizado a marcação do anticorpo 3H5, específico da proteína E do sorotipo DENV2. Foi possível observar a detecção desse antígeno no interior dos macrófagos circulantes em áreas de necrose intersticial no tecido hepático do caso 1 (Fig. 26).

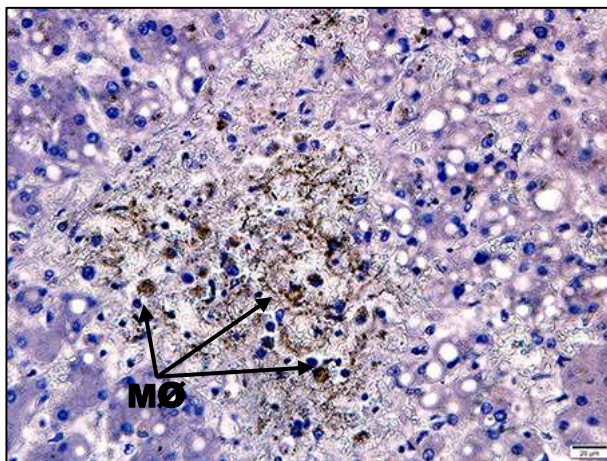


Figura 26 - Detecção do antígeno da proteína E (DENV2) no fígado de um caso fatal de DENV em criança.– a/a.1) Fígado do caso 1; MØ – macrófago circulantes.

5.6 – Histopatologia Pulmonar

5.6.1 – Coloração Hematoxilina e Eosina (H.E.)

O parênquima pulmonar é constituído pelos alvéolos, que são separados pelos septos alveolares. Nesses septos são encontradas células denominadas pneumócitos tipo II, que tem a função de produzir substância surfactante para impedir que o pulmão colabe (Fig. 27a).

No caso 1, foi observado um significativo espessamento do septo, além de áreas de edema intersticial associado a um infiltrado inflamatório mononuclear, hemorragia e hiperplasia de macrófagos alveolares no espaço intra-alveolar (Fig. 27b).

Já no caso 2, foi evidenciado um espessamento de septo moderado, porém ainda com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e hiperplasia de macrófagos alveolares (Fig. 27c).

Enquanto que, no caso 3, quase não foi observado espessamento de septo. A presença do infiltrado inflamatório mononuclear estava limitada ao interior dos capilares alveolares (Fig. 27d).

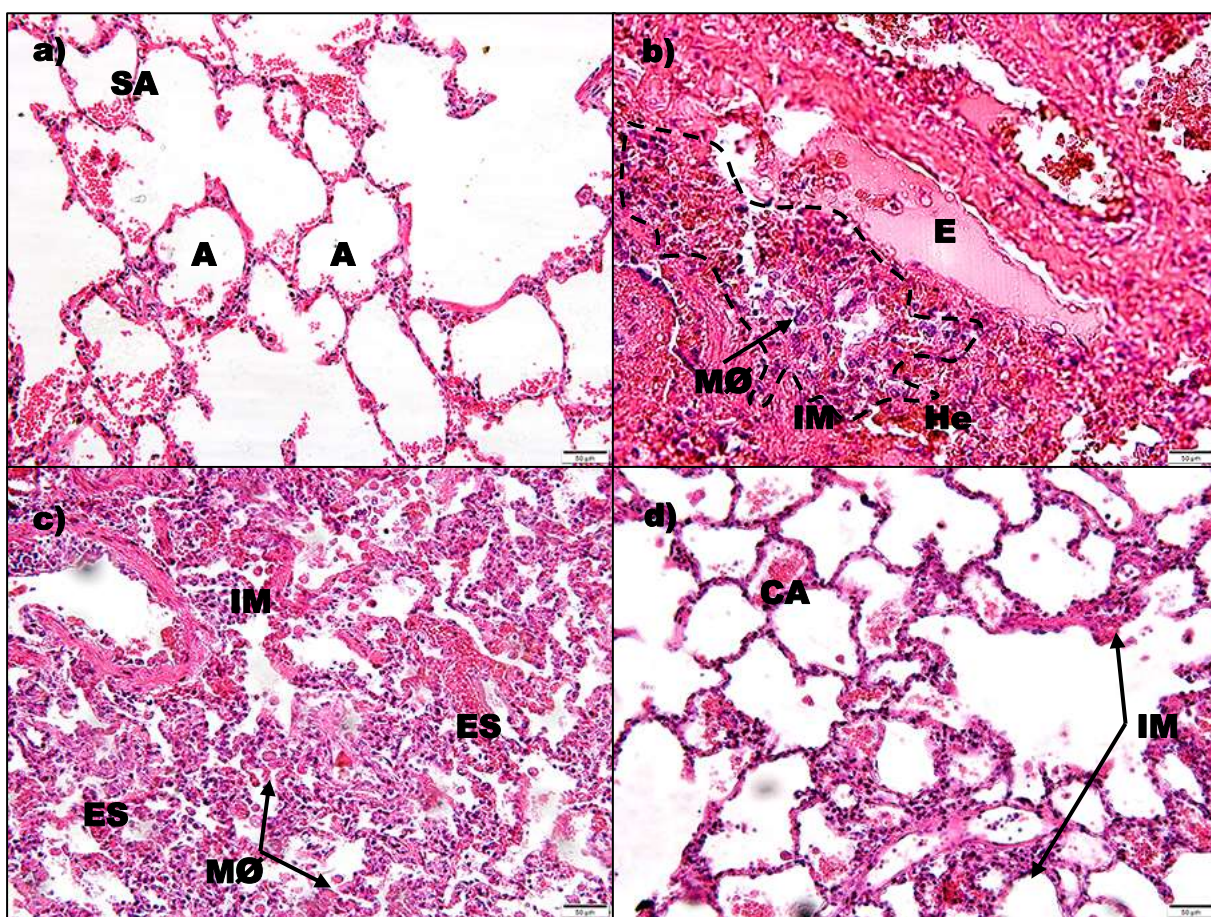


Figura 27 - Corte histológico de tecido pulmonar de casos fatais de DENV em criança corado com Hematoxilina e eosina. – a) Tecido pulmonar controle; b) Caso 1 c) Caso 2; d) Caso 3 ; A – alvéolos; SA – Septo Alveolar; E – Edema; He – Hemorragia; IM – infiltrado mononuclear; MØ – Macrófago; ES – Espessamento de Septo; CA – capilar alveolar.

5.6.2– Coloração Tricrômio de Masson (T.M.)

A coloração Tricrômio de Masson evidencia as fibras colágenas (coradas em azul). O tecido controle apresenta uma discreta marcação de fibras colágenas (Fig. 28a).

Já no caso 1, foram observadas áreas difusas de fibra colágenas ao redor da veia pulmonar e nos septos alveolares (Fig. 28b).

No caso 2, foi visto uma alta concentração de fibras colágenas ao redor do brônquio e disseminadas pelos septos alveolares (Fig. 28c).

E no caso 3, foi mostrado áreas discretas de fibras colágenas ao redor da veia pulmonar e pouca concentração de fibras nos septos alveolares (Fig 28d).

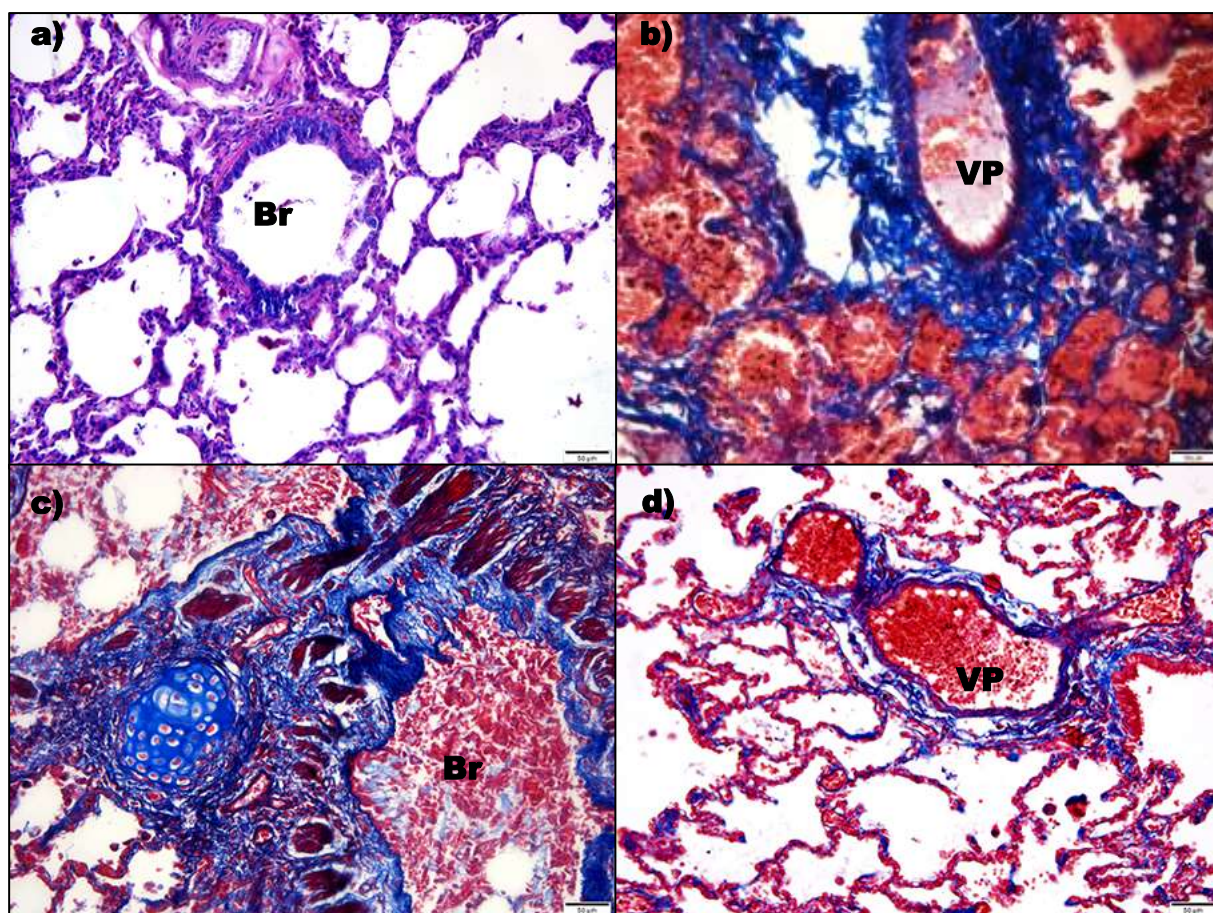


Figura 28 - Corte histológico de tecido pulmonar de casos controle e de casos fatais de DENV em criança corado com Tricrômio de Masson – a) Tecido pulmonar controle; b) Caso 1 c) Caso 2; d) Caso 3 VP Veia pulmonar, Br-Brônquio

5.6.3 – Coloração Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.).

Essa coloração é utilizada na histologia para identificar a presença de glicogênio, indicando assim intensa atividade metabólica. A marcação para P.A.S positiva também marca áreas com maior concentração de tecido conjuntivo.

No controle, foi observado a coloração por P.A.S. em áreas discretas do septo alveolar (Fig. 29a)

No caso 1, uma intensa coloração na região dos septos alveolares foi observada, sugerindo um espessamento de septo e a formação de membrana hialina. Além de uma intensa marcação positiva em macrófagos alveolares (Fig. 29b).

No caso 2, também foi possível observar a coloração nos septos alveolares, porém em uma intensidade moderada com formação de membrana hialina e em macrófagos alveolares (Fig. 29c).

E no caso 3, a marcação P.A.S positiva foi vista em áreas discretas e focais de coloração em região de formação de membrana hialina e em macrófagos alveolares (Fig. 29d).

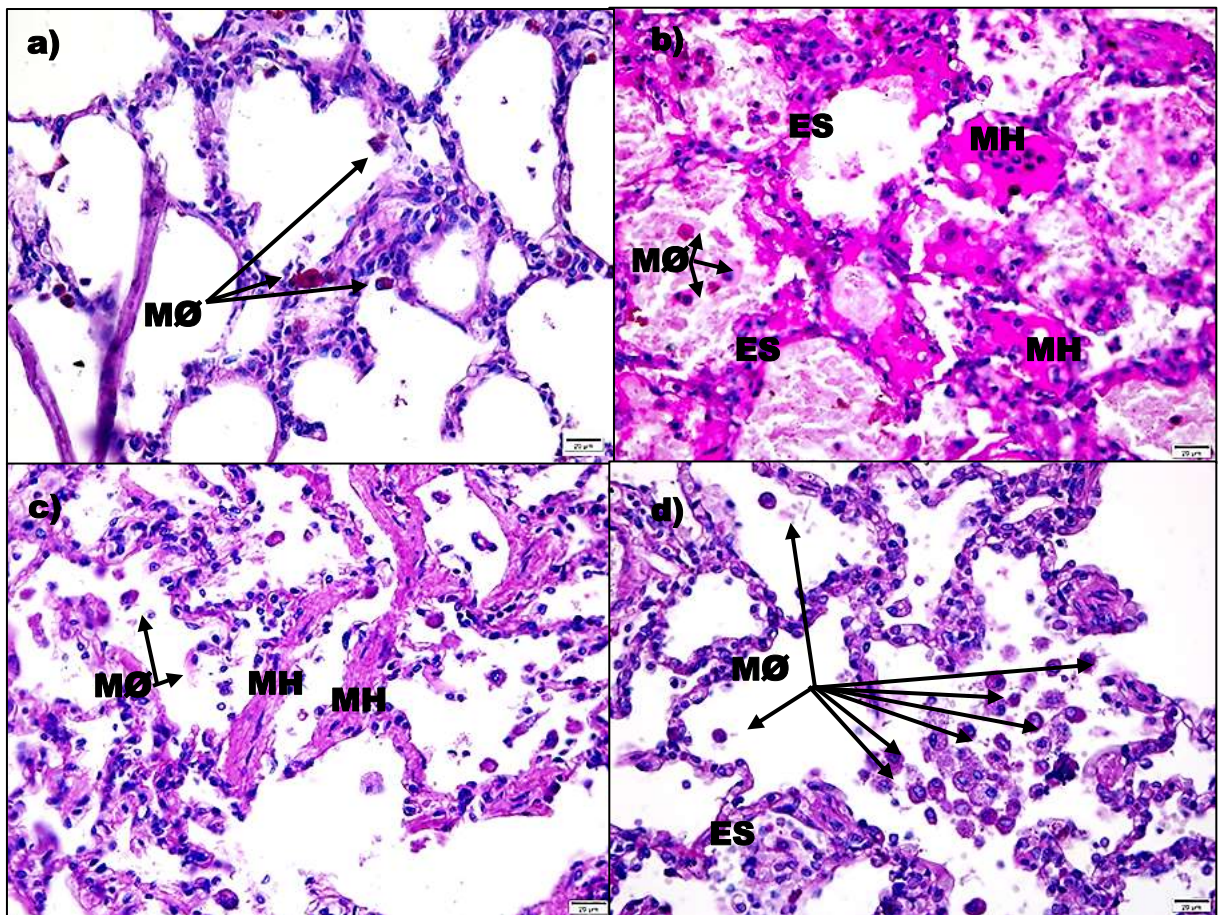


Figura 29 – Corte histológico de tecido pulmonar de casos fatais de DENV em criança corado com P.A.S– a) Tecido pulmonar controle; b) Caso 1 c) Caso 2; d) Caso 3 ; A – alvéolos; MØ – Macrófago; ES – Espessamento de Septo; MH – Membrana hialina. .

5.6.4 – Coloração Picrosírius no pulmão.

A técnica de coloração Picro-sírius é utilizada para visualizar a coloração das fibras colágenas no tecido, facilitando a quantificação. Neste caso, no tecido pulmonar.

No grupo controle, foi observado uma discreta marcação positiva para picrosírius ao redor da veia pulmonar e em todo o parênquima pulmonar (Fig 30a).

No caso 1, foram observadas áreas difusas com elevadas concentrações de colágeno ao redor da veia pulmonar e disseminada por todo o parênquima (Fig. 30b).

No caso 2, foi observado uma coloração mais intensa, tanto ao redor da veia pulmonar, quanto na região septal (Fig. 30c).

Já caso 3 foi mostrado uma elevada presença das fibras ao redor das veias pulmonares assim como na região dos septos (Fig.30d).

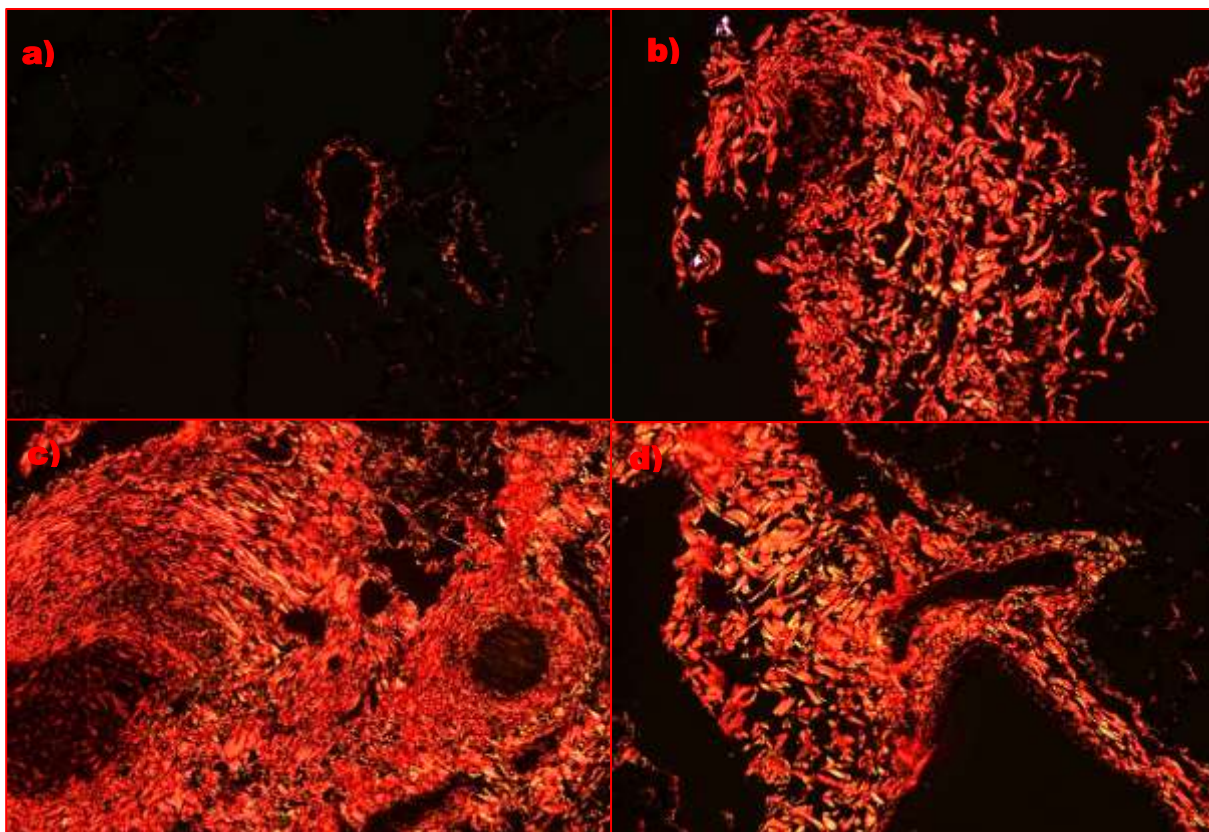


Figura 30 - Corte histológico de tecido pulmonar de casos fatais de DENV corado com Picrosírius. a) Tecido pulmonar controle de criança; b) Caso 1; c) Caso 2; d)Caso 3.VP veia pulmonar; S Septo.

5.7 – Análise semiquantitativa de danos no pulmão

5.7.1 – Análise semiquantitativa do grau de espessamento de septo e membrana hialina no pulmão.

Foram observados, nos tecidos controles, um grau de espessamento de septo e de membrana hialina bem menores que os casos infectados com o DENV,

No caso 1, foi notado um grau de espessamento de septo muito alto (grau 4), seguido pelo caso 2 que apresentou um espessamento de moderado a alto. Já o caso 3 foi mostrado um espessamento de septo considerado de leve a moderado (Gráf 11a).

Já em relação a formação da membrana hialina podemos observar que o caso 1 apresentou um grau moderado a alto, o caso 2 um grau moderado enquanto que o caso 3 apresentou um grau de leve a moderado (Graf. 11b)

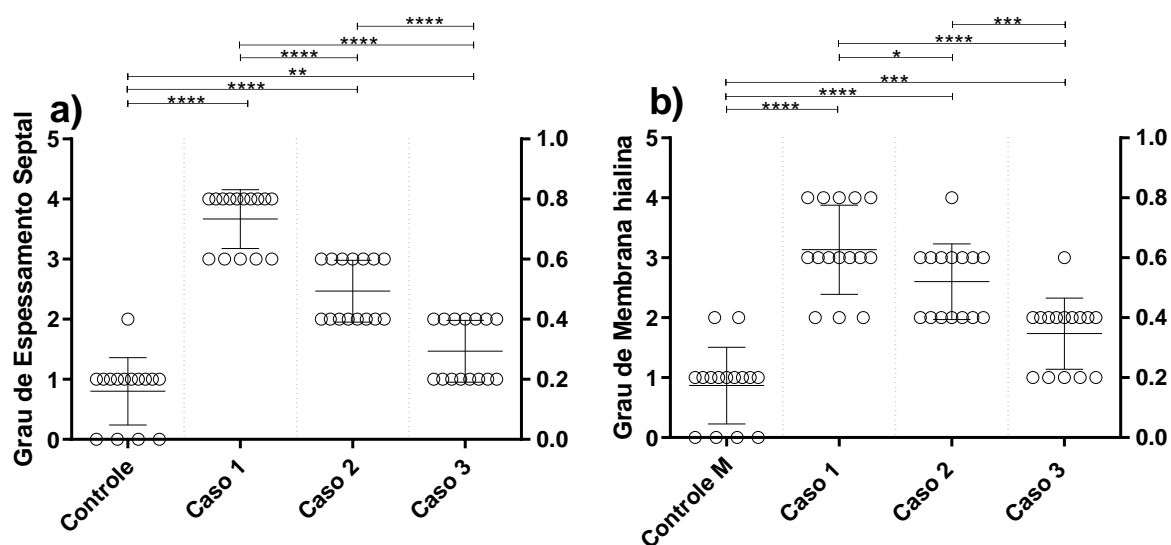


Gráfico 11.a) Análise semiquantitativa do grau de espessamento de septo e 1.b) Análise semiquantitativa do grau membrana hialina no pulmão de crianças infectadas com DENV.

5.7.3 – Análise semiquantitativa do grau de infiltrado inflamatório no pulmão.

A semiquantificação do grau de infiltrado inflamatório revelou que o grupo controle apresentou um grau leve de células mononucleares.

O caso 1 foi observado um grau alto de infiltrado. Enquanto no caso 2 e no caso 3 foi visto um grau leve a moderado e leve, respectivamente (Gráf. 13).

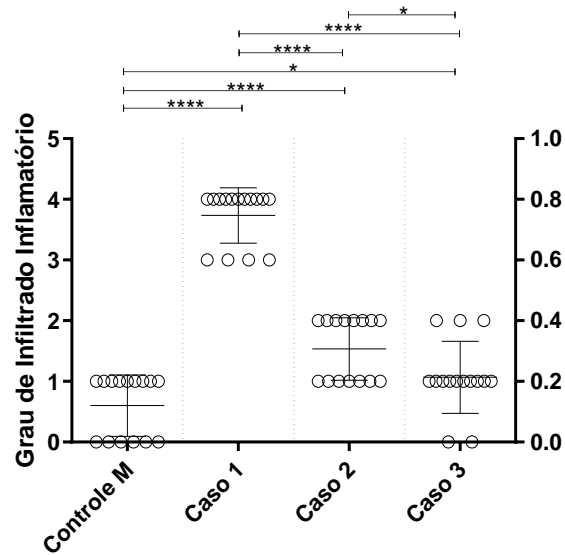


Gráfico 13 – Análise semiquantitativa do grau de de infiltrado no pulmão de crianças infectadas com DENV.

5.8 – Imunohistoquímica Pulmonar

5.8.1 – Detecção de célula T CD4 + em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças

No caso controle houve uma discreta marcação para células T CD4+ no parênquima pulmonar (Fig. 31a).

No caso 1, foi observado a presença de células T CD4+ no interior da veia pulmonar (Fig. 31b). Já no caso 3, foi notado uma expressão positiva das células T CD4+ associadas áreas de hemorragia nos alvéolos (Fig. 31c) e próximas a veia pulmonar (Fig. 31d).

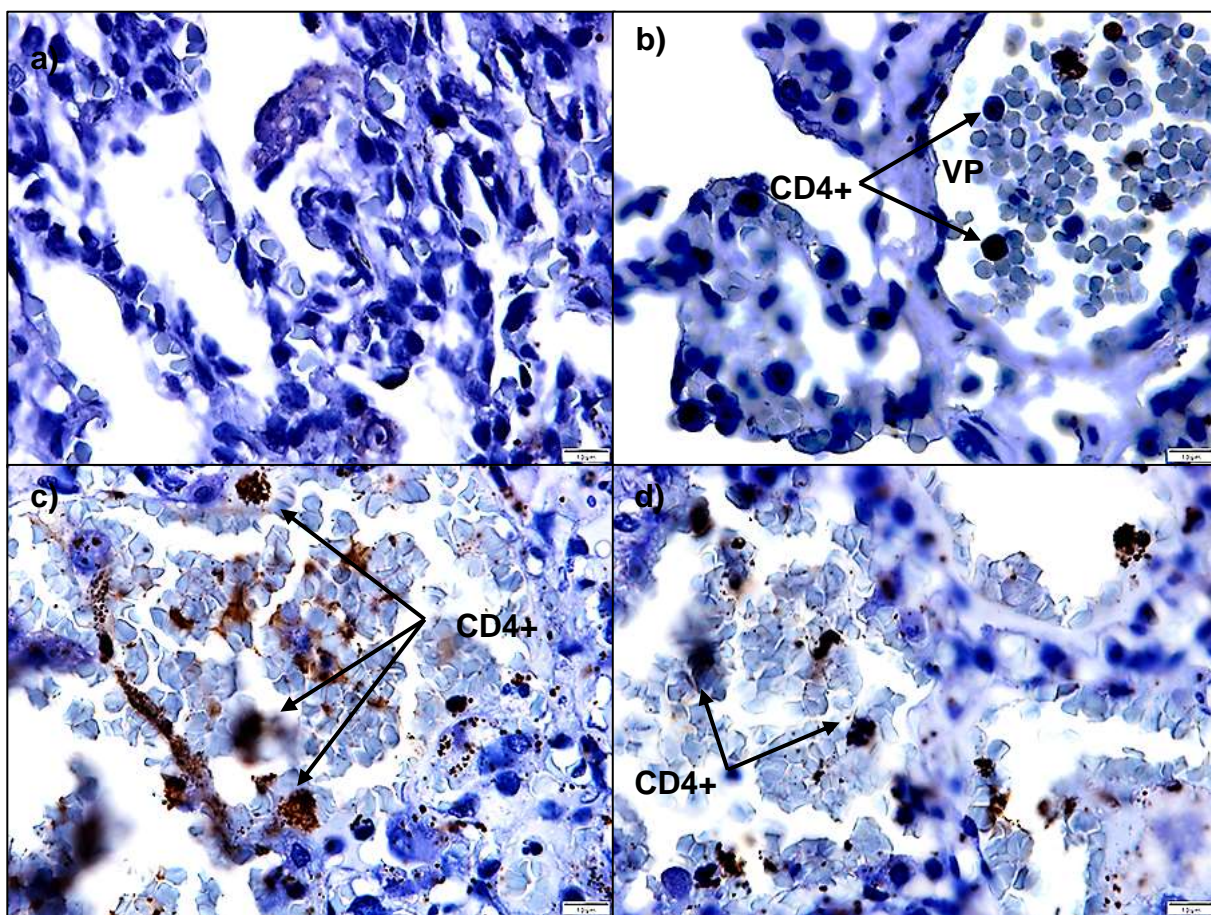


Figura 31 - Detecção de L TCD4+ em parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em crianças.. a) Tecido hepático controle de um caso de criança; b) Caso 1; c e d) Caso 3; VP – Veia Pulmonar.

5.8.2 – Detecção de célula T CD8+ em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

No controle tivemos uma marcação esperada de células T CD8+ dispersas de forma homogênea pelo parênquima pulmonar (Fig 32a).

No caso 1 foi detectada a presença de células T CD8+ no espaço intersticial e ao redor de áreas difusas de espessamento de septo (Fig. 32b).

Já no caso 2 foi detectada células T CD8+ no interior dos capilares pulmonares com espessamento moderado (Fig. 32c).

Enquanto que, no caso 3, as mesmas células foram detectadas no interior dos septos alveolares com discreto espessamento. (Fig. 32d).

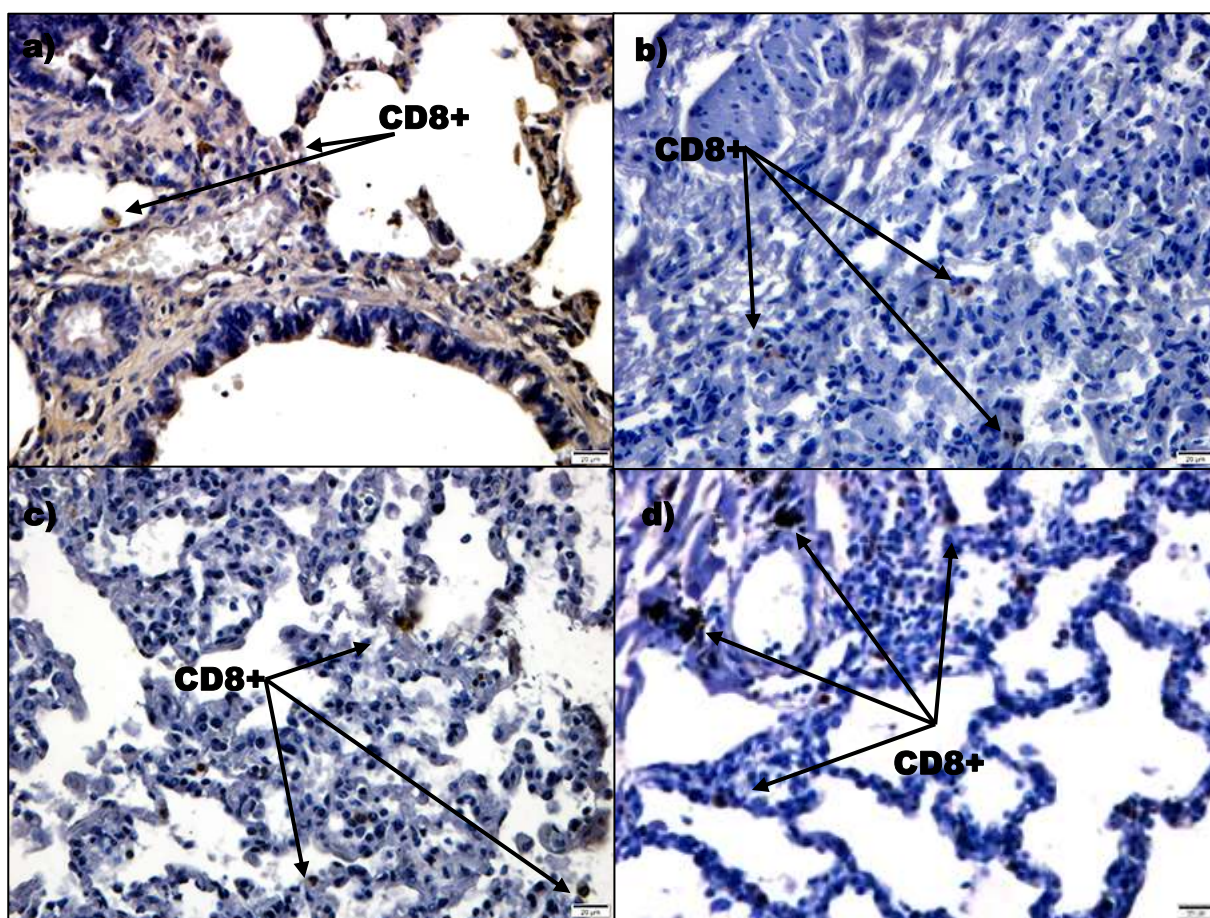


Figura 32 - Detecção de linfócitos T CD8+ no parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em criança. – a) Tecido pulmonar controle de criança; b) Caso 1; c) Caso 2; d) Caso 3. Es df- Espessamento difuso EsM- Espessamento moderado, Esd- Espessamento discreto.

5.8.3 – Quantificação do número de células T CD8+ no tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

Foi observado uma maior concentração de células T CD8+ no tecido pulmonar do caso 1 que teve em média de aproximadamente 22 linfócitos por campo. Seguido pelo caso 2, com média de aproximadamente 15 linfócitos por campo. E, por fim, o caso 3, com média de aproximadamente 9 linfócitos por campo (Gráf. 14). Houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e o caso 1, entre o controle e caso 2, entre o controle e o caso 3, entre o caso 1 e o caso 3 e entre o caso 2 e o caso 3 (Tab. 5).

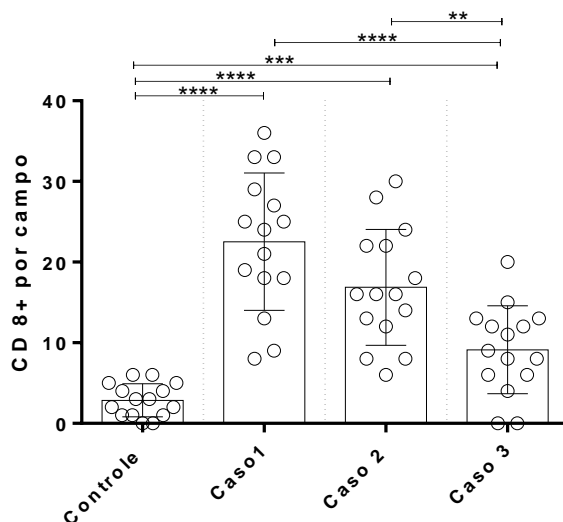


Gráfico 14 - Quantificação do número de linfócitos TCD8+ por campo de tecido pulmonar de casos fatais de crianças infectadas com o DENV.

5.8.4 – Detecção de macrófagos (CD68+) no tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

A marcação para as células CD68+ no tecido pulmonar controle foi observada em áreas discretas dos alvéolos pulmonares (Fig. 33a).

Porém, no caso 1, foi notado a detecção de células CD68+ em áreas difusas de espessamento de septo e ao redor da veia pulmonar (Fig. 33b).

Já no caso 2, foi notado a detecção de células CD68+ circulantes por todo o parênquima pulmonar (Fig. 33c).

E no caso 3, foi mostrado a marcação de células CD68+ em áreas focais dos alvéolos (Fig. 33d).

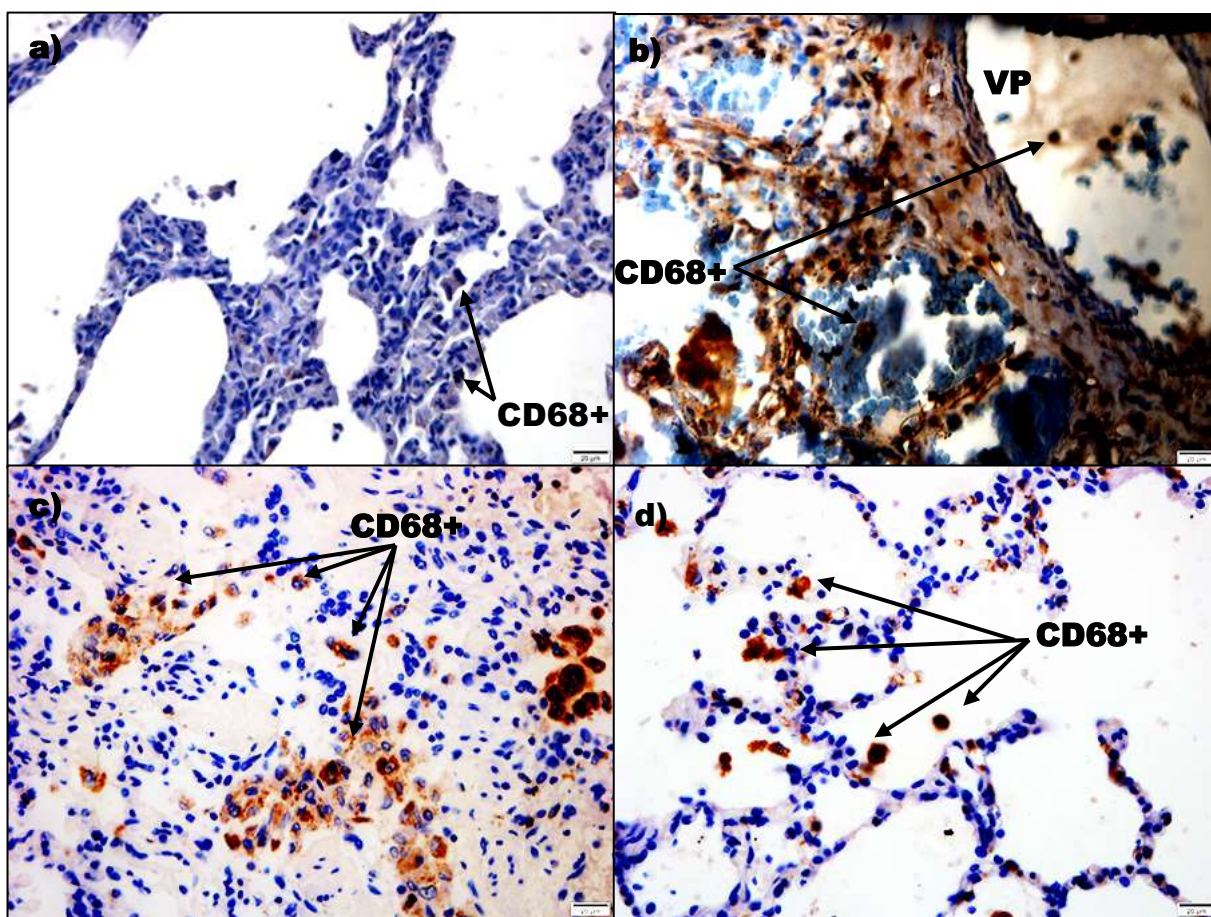


Figura 33 - Detecção de macrófagos CD68+ no parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em criança. – a) Tecido controle de criança; b) Caso 1; Caso2 ; d) Caso 3; VP – Veia pulmonar..

5.8.5 – Quantificação do número de macrófagos CD68+ no tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

Foi observado uma maior concentração de CD68+ no tecido pulmonar do caso 1, que teve em média aproximadamente 42 macrófagos por campo. Seguido pelo caso 2, com média de aproximadamente 8 macrófagos por campo. E, por fim, o caso 3, com uma média aproximada de 4 macrófagos por campo (Gráf. 15). Houve diferença significativa entre o controle e o caso 1, entre controle e o caso 2, entre controle e o caso 3, entre o caso 1 e o caso 2, entre o caso 1 e o caso 3 e entre o caso 2 e o caso 3 (Tab.6).

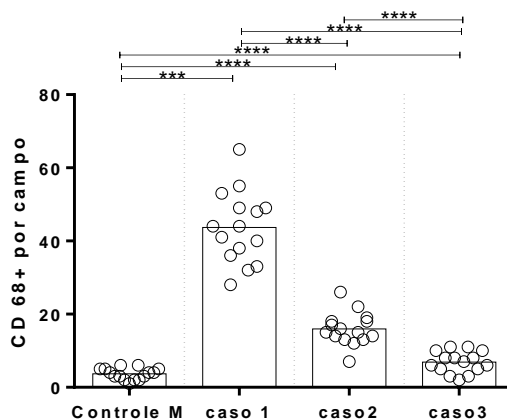


Gráfico 15 - Quantificação do número de macrófagos CD68+ por campo de tecido pulmonar de casos fatais de crianças infectadas com DENV.

| Teste Kruskal-Wallis | Significante | Resumo |
|----------------------|--------------|--------|
| controle vs. caso 1 | Sim | *** |
| controle vs. caso 2 | Sim | **** |
| controle vs. caso 3 | Sim | **** |
| caso 1 vs. caso 2 | Sim | **** |
| Caso 1 x Caso 3 | Sim | **** |
| Caso 2 x Caso 3 | Sim | **** |

Tabela 6 - Tabela de dados da análise estatística da contagem de macrófagos CD68+ em tecido pulmonar de casos fatais de crianças infectadas com DENV. Realizada no software Graph Prism 8

5.8.6 – Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

No caso controle não foi detectada marcação positiva para a proteína NS3 (Fig. 34a).

No caso 1, foi detectada marcação para o antígeno NS3 no interior dos pneumócitos tipo II associado à área de espessamento de septo e em macrófagos alveolares (Fig. 34b).

Assim como no caso 2, onde a antígeno da proteína NS3 estava presente no interior dos pneumócitos tipo II (Fig.34c) e nos macrófagos no interior dos capilares alveolares. (Fig. 34c1)

E no caso 3, o antígeno NS3 foi detectado em macrófagos e monócitos no interior da veia pulmonar, bem como no interior do endotélio da veia pulmonar (Fig. 34d).

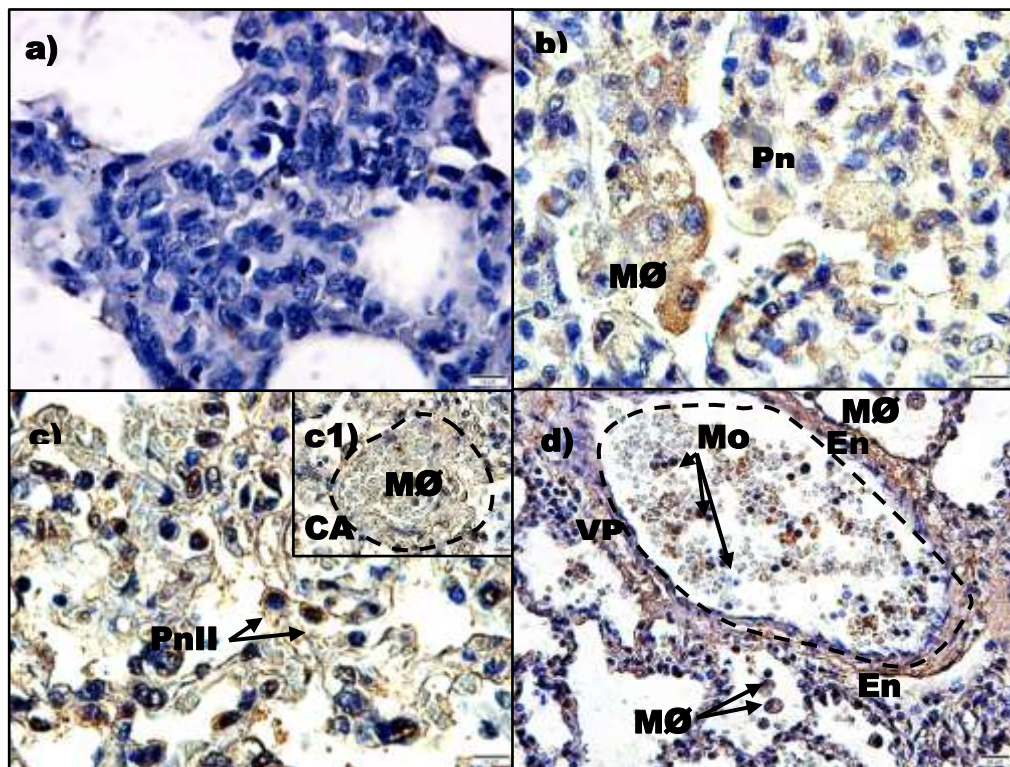


Figura 34 - Detecção do antígeno NS3 no parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em criança. – a) Tecido pulmonar controle de criança; b) Caso 1; c) Caso 2; d) Caso 3. PnII – Pneumócito tipo II; MØ – Macrófago; CA – Capilar alveolar; Mo – Monócitos; En – Endotélio; VP – Veia pulmonar; Ar – Artéria pulmonar.

5.8.7 – Detecção de TNF- α em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

O tecido pulmonar controle não apresentou marcação para TNF- α (Fig. 35a).

No caso 1, foi possível detectar TNF- α nas células endoteliais da veia pulmonar e no interior dos monócitos (Fig. 35b).

Já no caso 2, foi detectada uma marcação significativa em monócitos e no interior macrófagos alveolares (Fig. 35c).

E no caso 3, foi notada a detecção de TNF- α em infiltrado mononuclear peribronquiolar (Fig. 35d).

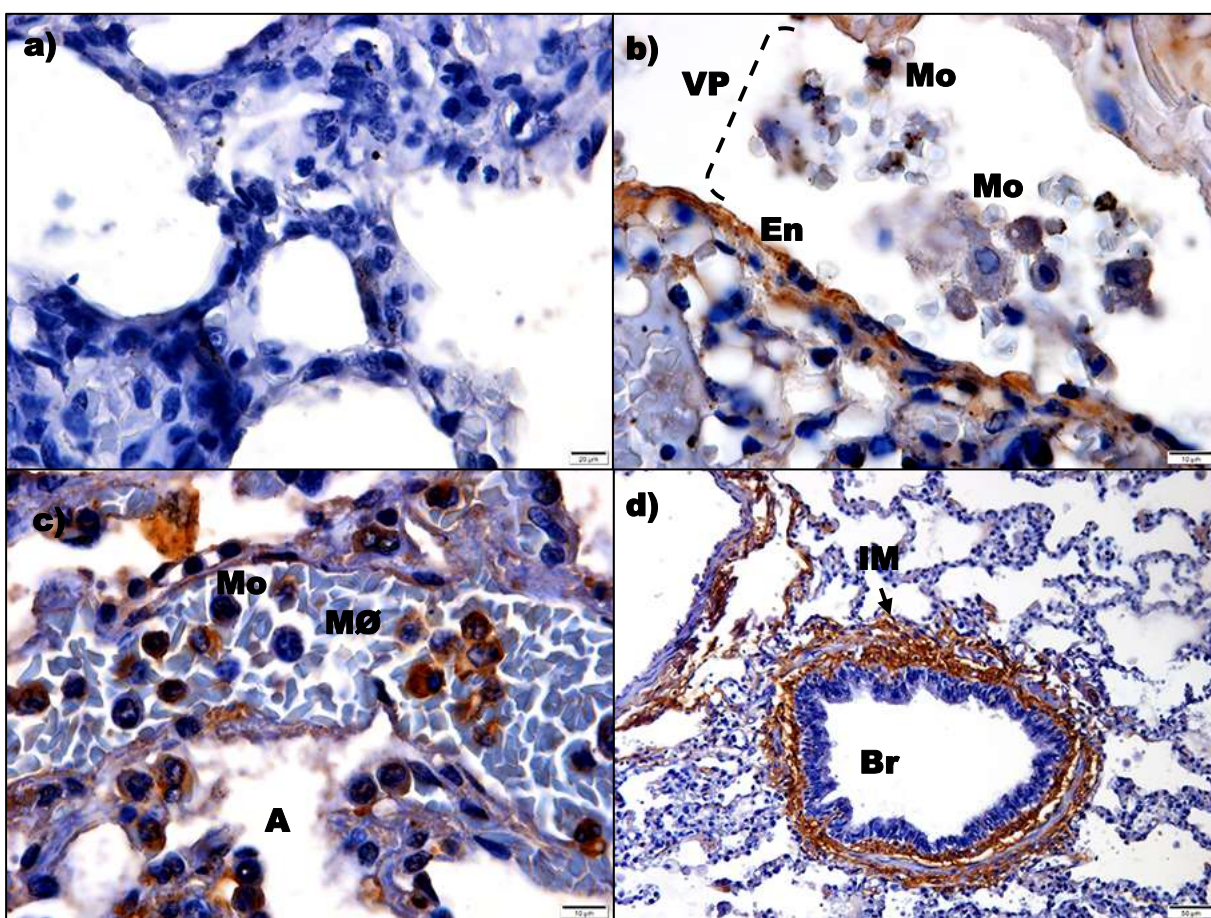


Figura 35 - Detecção de TNF no parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em criança. – a) Tecido pulmonar controle b) Caso 1; c) Caso 2 ; d) Caso 3 ;; MØ – Macrófago; A – Alvéolo; Mo – Monócitos; En – Endotélio; VP – Veia pulmonar; Br – Bronquiolo; IM – Infiltrado mononuclear.

5.8.8 - Detecção de RANTES em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

No tecido pulmonar controle não foi detectada nenhuma marcação positiva para RANTES (Fig. 36a).

No caso 1, foi observado áreas discretas de marcação no interior de macrófagos (Fig. 36b), e nas células endoteliais das veias pulmonares (Fig. 36b1).

No caso 2, foi vista marcação RANTES positiva também no interior dos macrófagos (Fig.36c).

Já no caso, 3 foi mostrada a marcação nas células endoteliais dos capilares pulmonares (Fig. 36d).

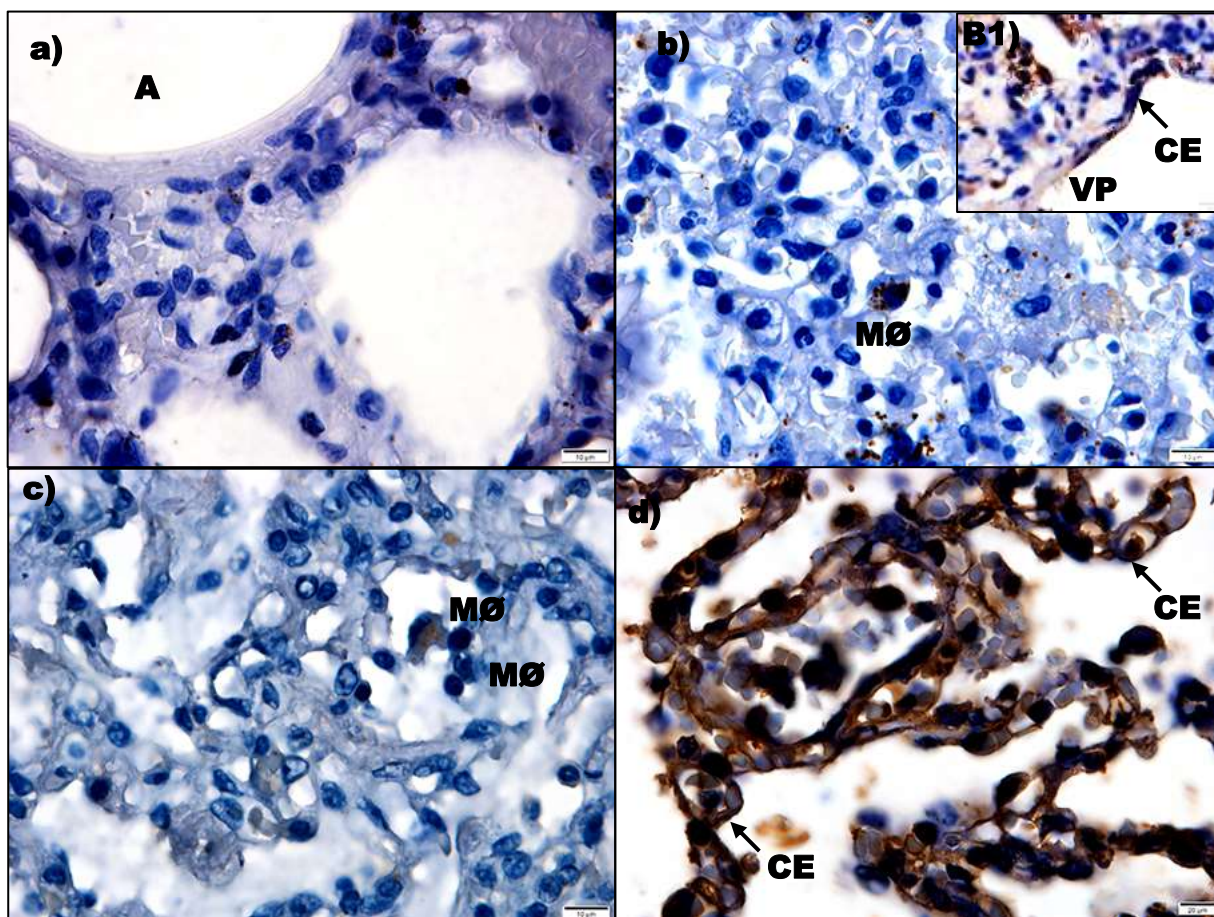


Figura 36 - Detecção de RANTES no parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em criança. – a) Tecido pulmonar controle de criança; b) Caso 1; c) Caso 2 ; d) Caso 3 ;; MØ – Macrófago; A – Alvéolo; En – Endotélio; VP – Veia pulmonar

5.8.9 - Detecção de VEGF-R2 em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

No tecido pulmonar controle não foi observada marcação para VEGF-R2 (Fig. 37a).

Porém, no caso 1, foi observada a detecção positiva para VEGF-R2 nas células endoteliais da veia pulmonar e em monócitos (Fig. 37b).

No caso 2, foi notada a detecção em macrófagos alveolares (Fig. 37c).

Assim como no caso 3, porém em áreas focais dos capilares alveolares (Fig. 37d).

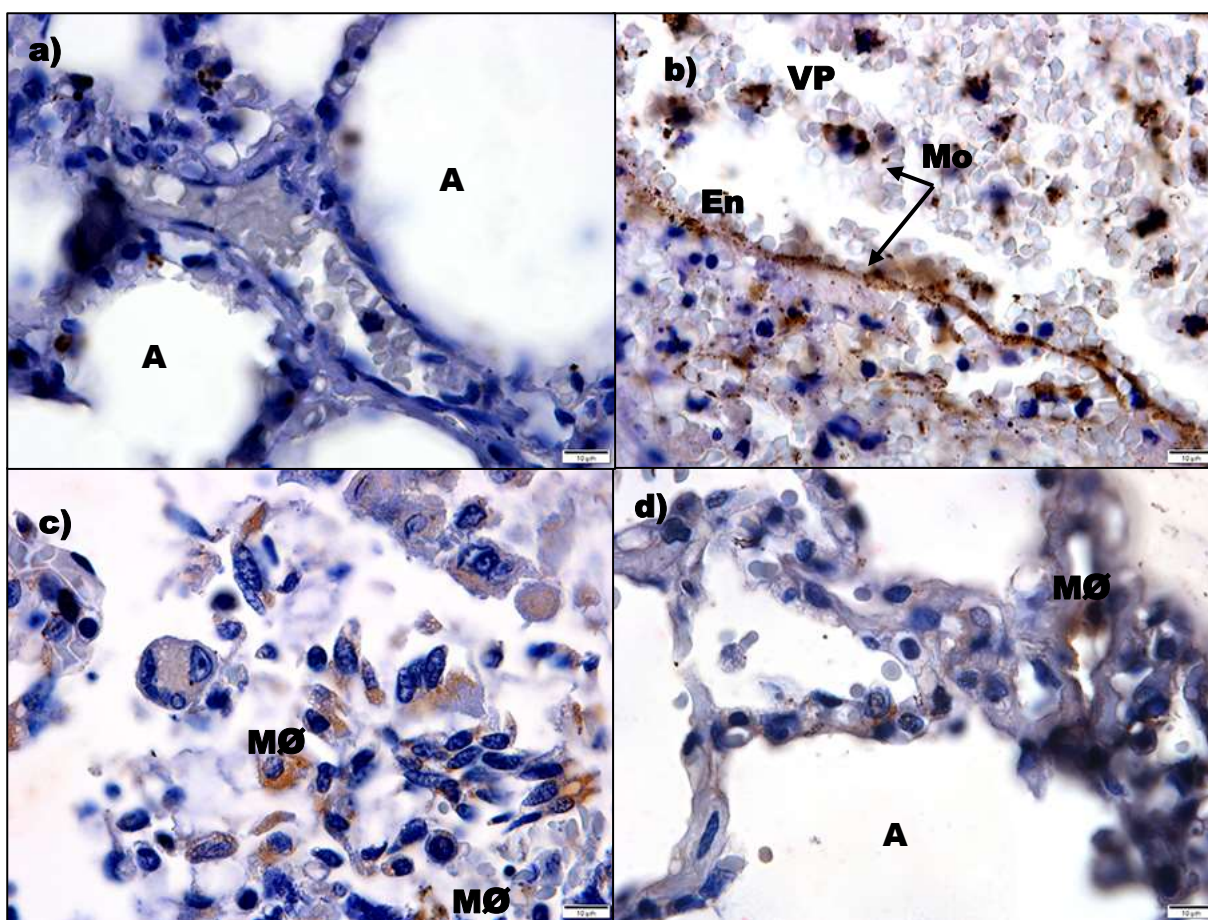


Figura 37 - Detecção de VEGF-R2 no parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em criança. – a) Tecido pulmonar controle de criança; b) Caso 1; c) Caso 2 ; d) Caso 3; MØ – Macrófago; A – Alvéolo; Mo – Monócitos; En – Endotélio ; VP – Veia pulmonar.

5.8.10 – Detecção de VCAM-1 em tecido pulmonar de casos fatais de dengue em crianças.

No tecido pulmonar controle não foi observado marcação positiva para VCAM-1 (Fig.38a).

Já no caso 1, foi detectada marcação positiva para VCAM-1 em macrófagos e monócitos circulantes e nas células endoteliais da veia pulmonar (Fig.38b).

No caso 2, também foi notada uma marcação significativa de VCAM-1 nos macrófagos alveolares disseminados pelo parênquima pulmonar (Fig. 38c).

Enquanto que no caso 3, foi mostrada uma intensa marcação de VCAM-1 em monócitos no interior da veia pulmonar (Fig.38d).

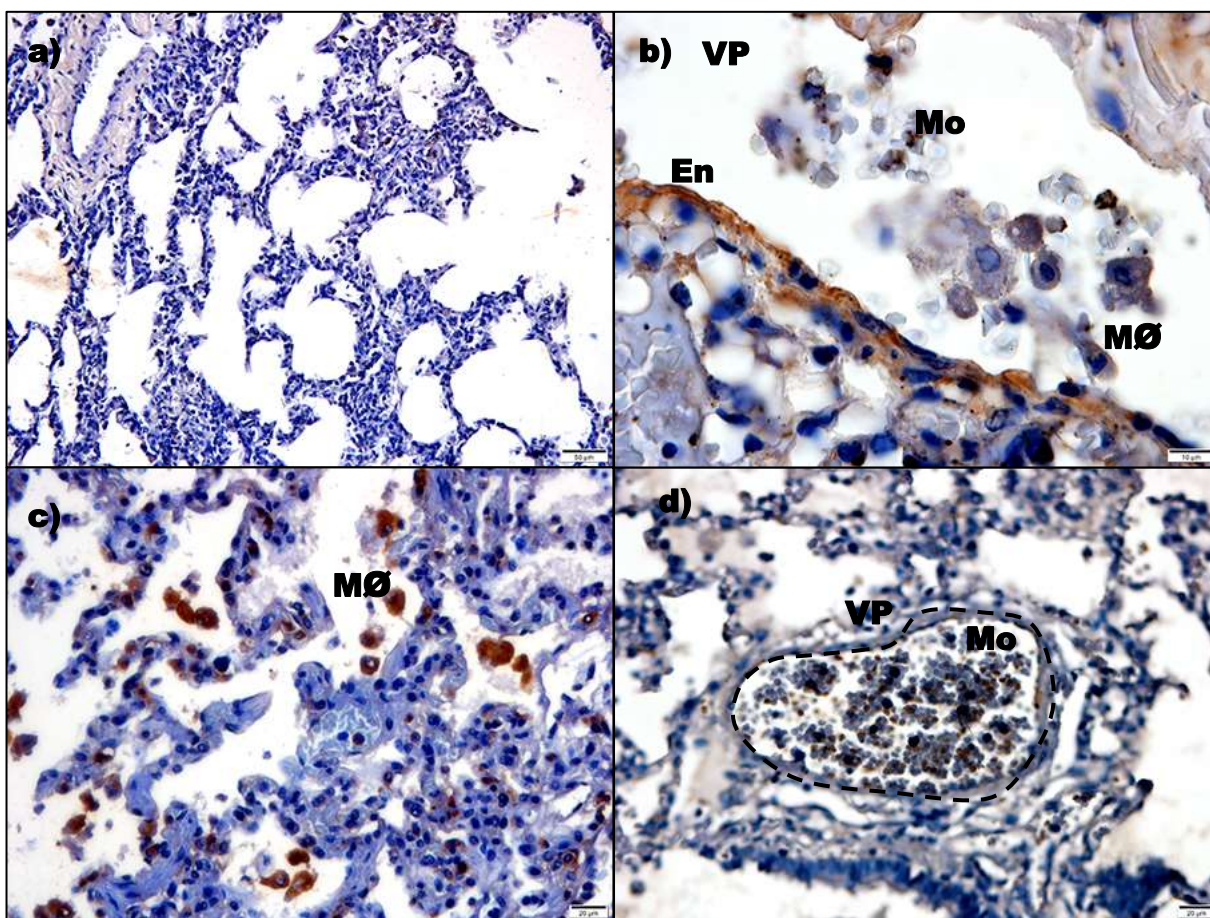


Figura 38 - Detecção de VCAM-1 no parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em criança.
– a) Tecido pulmonar controle de criança; b) Caso 1; c) Caso 2 ; d) Caso 3;; MØ – Macrófago; Mo – Monócitos; En – Endotélio ; VP –Veia pulmonar.

5.8.11 - Detecção de MMP9 em tecido pulmonar de casos fatais de DENV em crianças.

O tecido pulmonar controle não apresentou marcação para MMP9 (Fig. 39a).

No caso 1 foi visto a detecção de MMP9 no interior de monócitos e macrófagos alveolares (Fig. 39b).

Já no caso 2, foi observado a detecção para MMP9 em septos alveolares espessados, no interior dos pneumócitos tipo II e em macrófagos alveolares (Fig. 39c).

Já no caso 3, foi visto a expressão de MMP9 em macrófagos e nos septos alveolares (Fig. 39d).

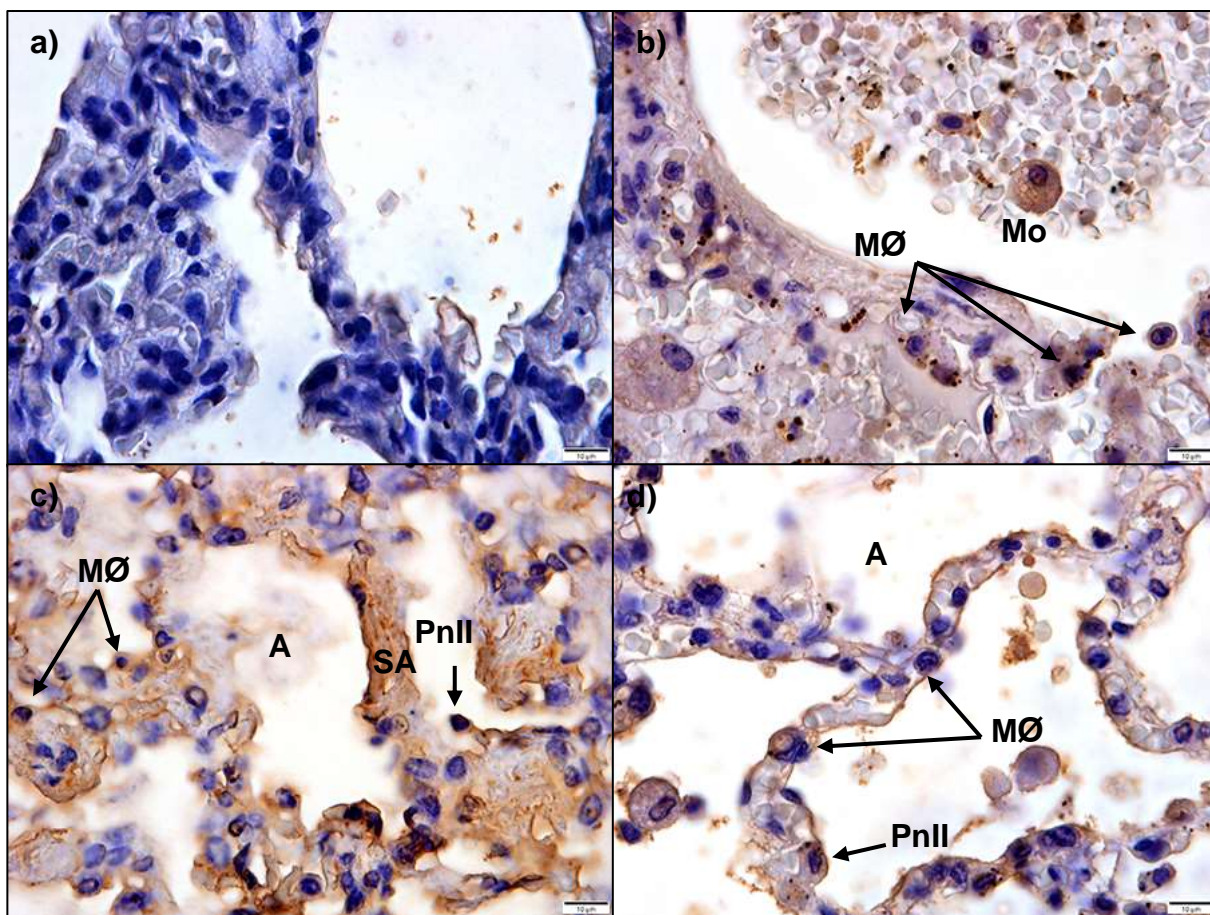


Figura 39 - Detecção de MMP9 em parênquima pulmonar de casos fatais de DENV em crianças. a) Tecido pulmonar controle de uma criança; b) Caso 1; c) caso 2 e d) Caso 3; MØ – Macrófago; A – Alvéolos; Mo – Monócito; SA – Septo alveolar; PnII – Pneumócito tipo II

5.9 – Avaliação histopatológica do tecido da língua em casos fatais de crianças com DENV

5.9.1 – Coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.)

Foram observadas áreas difusas de hemorragia na mucosa e áreas de infiltrado mononuclear (Fig. 40a) em áreas de hiperplasia do tecido linfóide (Fig. 40b).

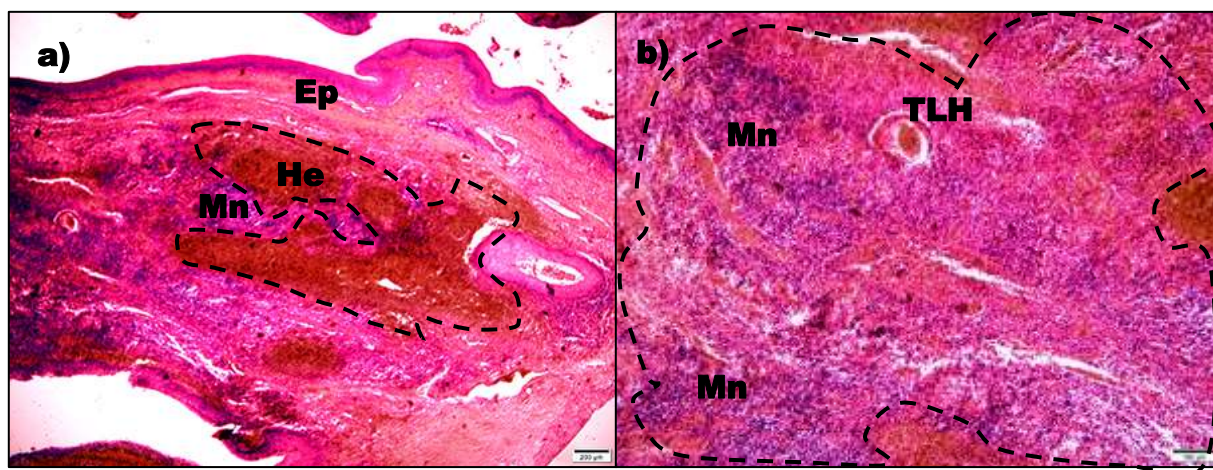


Figura 40 - Corte histológico de tecido da língua de casos fatais de DENV em criança corado com Hematoxilina e eosina. – a e b) Caso 1. Ep – Epitélio; He – Hemorragia; Mn – Infiltrado mononuclear; TLH – Tecido linfóide hiperplásico.

5.10 – Imunohistoquímica da língua

5.10.1 – Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido da língua

A detecção do antígeno da proteína NS3 foi observado em infiltrado inflamatório mononuclear abaixo do feixe de camada muscular (Fig. 41a) e em macrófagos em área de hemorragia (Fig. 41b).

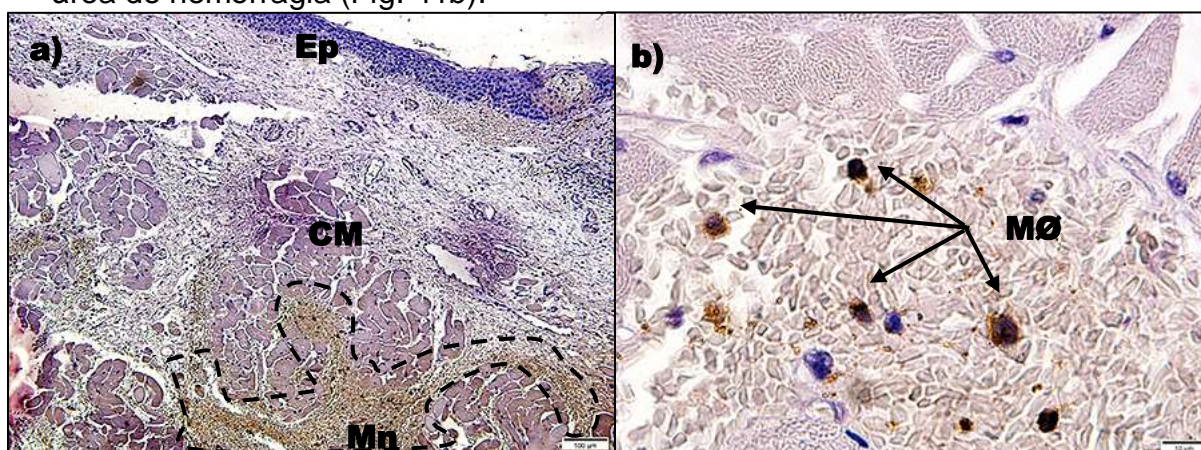


Figura 41 - Detecção do antígeno NS3 em tecido de língua de um caso fatal de DENV em criança. a/b) Caso 2; Ep - Epitélio; CM - camada muscular; MØ – Macrófago; Mn – Infiltrado mononuclear.

5.11 – Avaliação histopatológica do tecido da traquéia em casos fatais de crianças com DENV

5.11.1 – Coloração Hematoxilina e eosina (H.E.)

Foi observado no caso 1 um acúmulo de células inflamatórias mononuclear, indicando um processo infeccioso intenso (traqueíte). Foi possível também observar áreas de hemorragia na luz do órgão (Fig. 42a). Foi visto também, um aumento de infiltrado linfocitário em áreas de tecidos linfoides e uma área de metaplasia escamosa (Fig. 42b)

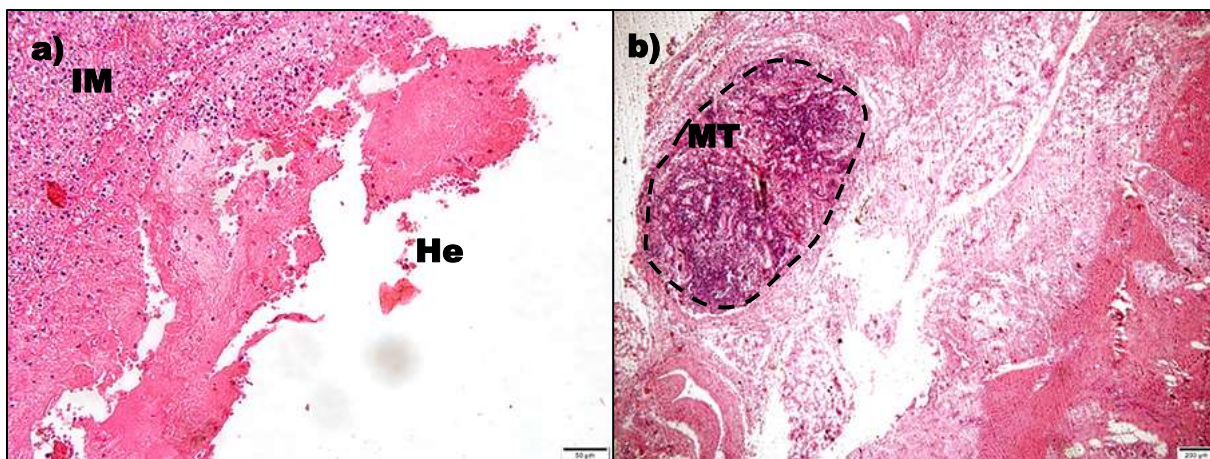


Figura 42 - Corte histológico de tecido de traquéia de crianças infectadas com DENV corado com Hematoxilina e Eosina. IM - Infiltrado mononuclear; He - Hemorragia; MT - Metaplasia escamosa.

5.12 – Imunohistoquímica da traquéia

5.12.1 – Detecção do antígeno da proteína NS3 em tecido da traquéia de um caso fatal de dengue em criança.

Foi detectada a presença do antígeno da proteína NS3 em células endoteliais tumefeitas de vasos na região da lamina própria (Fig. 43a) e em monócitos no interior dos vasos do caso 3 (Fig. 43b).

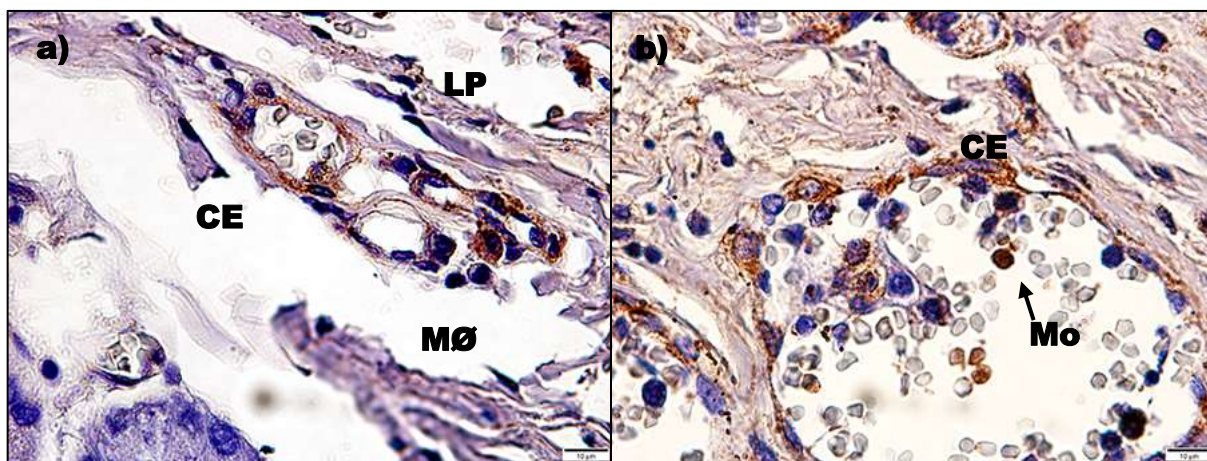


Figura 43 - Detecção de NS3 em tecido da traquéia de um caso fatal de DENV em criança – a/b) Caso 3; LP. – Lâmina Própria ; CE. – Células endoteliais; Mo – Monócitos; MØ – Macrófago..

6 – Discussão

Nos estudos que envolvem os casos humanos de dengue, cada vez mais vem se observando o comprometimento de diversos órgãos durante o curso da doença, principalmente nos casos fatais (Bhamarapravati *et al*, 1967, Nogueira *et al*, 2002; Siqueira *et al.*, 2005; Ling *et al*, 2007; Gupta *et al*, 2009; Sudaram *et al*, 2010; Miranda *et al*, 2013, Póvoa *et al.*, 2014, 2016; Nunes *et al.*, 2016; Stanaway *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017). Porém poucos estudos tem como alvo as crianças, que recentemente têm apresentado uma alta taxa de conversão de dengue clássica em dengue grave. Por isso este estudo foi focado nessa faixa etária.

Com relação aos sintomas apresentados podemos concluir que a febre é o principal sintoma do dengue, que se manifesta da forma aguda e intensa em todos os casos suspeitos de dengue. Seguido de dores corporais, que também foram observadas nos três casos e em estudos anteriores, sendo presente em 57% dos casos de dengue em crianças. Dor abdominal também é outro sintoma bastante significativo, pois ocorre em 47% dos casos de dengue infantil, e pode estar associado a hepatomegalia, comum em 70% dos casos de dengue em crianças. Os três casos apresentaram vômito, comum em 40% dos casos. Epsódios de sangramento podem indicar um mal prognóstico para a dengue, uma vez que manifestações como epistaxe, sangramento gengival, sangramento gastrointestinal são mais comuns em casos graves (Jagadishkumar *et al.*, 2012).

Altas taxas de extravasamento plasmático e choque são mais comuns e mais graves em crianças, se comparados com os grupos de maior idade (Verhagen *et al.*, 2014).

Baseado nas informações disponibilizadas pelo Hospital Municipal Jesus, observamos que o caso 1 não apresentava leucopenia, diferentemente dos outros dois casos. Porém o caso 1 apresentou uma bacteremia que evoluiu para septicemia, que foi diagnosticada através de uma hemocultura positiva para *Pseudomonas spp.* Neste caso, a presença desta bactéria pode ter alterado os valores de leucócitos, que no 5º dia se apresentava elevado e continuou elevando-se até o óbito do paciente. Estudos anteriores concluíram que a leucocitose pode estar associada ao agravamento da doença, devido a ocorrência de uma hemoconcentração decorrente de uma desidratação (Martinez-Torres *et al.*, 2008; Azeredo *et al.*, 2010). Porém, a leucopenia pode ocorrer independente da gravidade da doença (Ferreira *et al.*, 2015)

A plaquetopenia estava presente nos três casos de dengue em crianças do estudo. Desde o primeiro dia de internação os níveis de plaquetas estavam abaixo do valor mínimo esperado. Todos os três casos do estudo apresentaram, em pelo menos um exame, um nível de plaquetas inferior a 20 mil/mm³, valor considerado crítico, pois as chances de hemorragias se tornam maiores. Estudos anteriores observaram que quase 80% dos pacientes com dengue apresentaram plaquetopenia (Ayyub *et al.*, 2006). E em outro estudo realizado somente com crianças, a contagem de plaquetas foi inferior a 20mil/mm³ em 6,3%, entre 21mil e 50mil em 35,9% e entre 50mil a 100mil em 41,5%. Observaram também que os eventos hemorrágicos ocorreram em todos o níveis de plaquetopenia (Ramabhatta *et al.*, 2017), porém acredita-se que uma baixa contagem de plaquetas pode ser indicativo de dengue grave (Ferreira *et al.*, 2015)

Ainda com base nos exames realizados no Hospital Municipal Jesus, durante a internação dos pacientes, podemos concluir que as dosagens das transaminases hepáticas ALT e AST estavam bastante elevadas em todos os três casos de dengue em crianças estudados. No caso 3, a ALT chegou ao valor de 385 U/L, o que corresponde a um aumento de 12 vezes do limite máximo, e a AST chegou a 2117 U/L, que corresponde ao um aumento de 68 vezes o limite máximo. Corroborando com

achados anteriores, no qual a maioria dos pacientes com dengue grave apresentaram teste de função hepática anormal, que também observou que houve um aumento maior da enzima AST em decorrência ao choque por dengue (Mohan et al., 2000; Jagadishkumar et al., 2012; Póvoa et al., 2016).

Podemos observar através da histopatologia que o fígado apresentou degeneração nuclear e gordurosa em hepatócitos na forma de microesteatose e macroesteatose, tumefação hepatocitária, desorganização da tríade portal, pela presença de infiltrado inflamatório, além de hemorragia, edema e congestão vascular.

Foram realizadas também as colorações de tricrômio de Masson e Picrosírius, para a visualização das fibras colágenas, que nos permitiu observar uma intensa aglomeração e desorganização das fibras colágenas, caracterizando uma fibrose, na região periportal. Através da coloração do Ácido reativo de Schiff (P.A.S.) podemos observar um aumento na concentração de glicoproteínas, indicando a presença de glicogênio, necessário para a atividade celular. Normalmente essa alta concentração se dá em lugares onde existe um alto consumo de glicose, devido a alta taxa metabólica (Shafiei et al., 2014) No estudo dos nossos casos de dengue em crianças, foram observadas altas concentrações das glicoproteínas em áreas associadas a infiltrados mononucleares. Onde podemos concluir que estas células estão em intensa atividade fagocítica.

Com essas imagens, foi possível realizar uma análise semiquantitativa dos danos provocados pelo DENV ao tecido hepático. Os danos foram representados por: presença de fibras colágenas, degeneração gordurosa com caracterização de áreas de macroesteatose e microesteatose, grau de degeneração nuclear e necrose de hepatócitos, além do caracterização das áreas de alterações vasculares: hemorragia, edema e congestão vascular.

Com isso concluímos que em todos os três casos de dengue em crianças foram encontradas elevadas concentrações de fibras colágenas, principalmente o redor dos grandes vasos (veia centro lobular e veia portal). Em um tecido não infectado podemos observar taxas normais dessas proteínas, uma vez que desempenham importante papel na homeostase do organismo, mantendo a integridade vascular. Um acúmulo exagerado dessas proteína indicam um processo inflamatório ou infeccioso. E quando situados em musculatura lisa afetam os movimentos de drenagem, favorecendo o acúmulo de fluido, promovendo o edema (Lin et al., 2019).

Concluímos também que todos os três casos apresentavam degeneração gordurosa, sendo este um achado bastante comum nos casos de dengue (Póvoa et al., 2016; Sakinah et al., 2017; Win et al., 2019). O acúmulo de gordura indica um funcionamento anormal do hepatócito, que pode levar ao acúmulo excessivo de triglicerídeos em seu interior devido à redução, nesta célula, da oxidação dos ácidos graxos. As áreas de micro e macroesteatose estavam mais evidente nas áreas próximas a veia centrolobular, pois estas ficam distante do ducto do biliar, diferentemente dos achados de outro estudo recente onde a presença de macro e microesteatose se aproximava mais da área periportal (Win et al., 2019). Com esses dados e baseado na literatura podemos concluir que a esteatose, caracterizada pelo acúmulo de grandes vacúolos de gordura, é mais proeminentes na região centrolobular, porém em casos mais graves pode envolver todo o lóbulo.

Todos os três casos também apresentavam níveis variados de degeneração nuclear e necrose. A degeneração nuclear foi mais significativa, em cada um dos casos, nas áreas próximas ao espaço porta, provavelmente por esta área ser a primeira área a receber o sangue vindo do organismo e por isso mais rico em nutrientes e oxigênio. Além disso, em uma infecção, o sangue também chega mais

rico em citocinas e mediadores inflamatórios, que em excesso podem causar danos celulares. Estudo recente demonstrou que o tecido hepático de crianças infectadas com o DENV apresentava elevado grau de necrose hepatocitária, esteatose, hiperplasia de células de kupffer e hemofagocitose (Win et al., 2019), corroborando com os achados anteriores do nosso grupo (Póvoa et al., 2016).

Com relação às alterações vasculares observadas no fígado, podemos concluir que o caso 1 apresentou graus de hemorragia significativamente maiores quando comparado ao grupo controle e também com relação aos demais casos. Muito provavelmente devido a alterações causadas pela co-infecção por *Pseudomonas spp.* Outro motivo que pode explicar essa alteração mais intensa no caso 1 é pelo fato deste paciente ter tido uma sobrevivência (14 dias) maior que os demais pacientes (2 dias). Porém os casos 2 e caso 3 também apresentaram elevadas áreas de hemorragia, se comparados ao grupo controle.

A hemorragia foi maior no caso 1, provavelmente devido ao quadro de coinfeção, que gerou uma migração maior de células T CD4+ e T CD8+, e consequentemente um aumento de citocinas e mediadores inflamatórios (TNF- α , VEGF-R2, RANTES, VCAM-1 e MMP9). Esse aumento pode favorecer o extravasamento de plasma e alteração de permeabilidade vascular. O caso 2 e o caso 3 também apresentavam aumento de células inflamatórias e de citocinas e mediadores inflamatórios, porém em menor concentração, o que pode ter gerado altos níveis de congestão vascular no tecido. Outra alteração vascular significativa observada nos casos de dengue foram as áreas de edema. As áreas onde esses níveis foram maiores inclui grandes vasos sanguíneos (veia centro lobular do caso 1 e espaço portal do caso 3) o que nos leva a concluir que esse edema pode ser decorrente do extravasamento de plasma oriundo desses vasos sanguíneos.

Analisando as células inflamatórias, observamos que os três casos apresentam concentrações similares de T CD4+ e de T CD8+. Porém, uma alta concentração destas células foi encontrada, principalmente, ao redor da região periportal, mesma área onde foi encontrada também uma maior concentração de degeneração nuclear e necrose, mostrando que, possivelmente, ambos os processos possam estar interligados. Isso porque, essas células tem um fator protetivo durante uma infecção por dengue, onde o linfócito T CD8+ atua diretamente sobre a proteína NS3, o capsídeo viral, NS5 e NS4a/b, enquanto que as células T CD4+ tem como alvo as proteínas do capsídeo, envelope, NS3, NS2a/b e NS5 (Tian et al., 2019). Porém, em altas concentrações, essas células podem levar a uma alta toxicidade, provocando morte celular, devido a excessiva produção de citocinas.

Foi observado também, um aumento na população de linfócitos T (CD8+ e CD4+), bem como de macrófagos (CD68+), no interior dos capilares sinusoidais, nas proximidades do espaço porta e em algumas áreas do parênquima hepático. Em estudo anterior, que analisou a relação dos linfócitos T CD8+ na Hepatite C, observou que os linfócitos T CD8+, concentrados em sua maioria ao redor do espaço porta, atuam como citotóxicos e produtores de citocinas e que estariam diretamente relacionados com a intensidade das lesões hepáticas. Observaram também que o aumento de T CD8+ está estatisticamente ligados ao aumento das enzimas hepáticas AST (Viso et al., 2007).

No tecido hepático, foi possível detectar a presença do antígeno viral NS3 no interior dos hepatócitos, nas células de Kupffer, em macrófagos e nas células endoteliais dos principais vasos que irrigam o fígado, corroborando com os resultados descritos anteriormente (Póvoa et al. 2014, Win et al., 2019). Esses achados nos permitem afirmar que o vírus tem tropismo por estas células, possuindo a capacidade

de infectar as células e de se replicar no seu citoplasma, promovendo a lise da célula e liberação de novos vírus, que irão infectar células vizinhas.

Como dito anteriormente, houve uma expressão significativa da citocina pró-inflamatória TNF- α . Essa citocina foi detectada no interior dos macrófagos dos três casos estudados, e que, muito provavelmente, induziu uma resposta inflamatória exacerbada causando uma migração excessiva de linfócitos para o sítio da infecção. Níveis elevados de TNF- α foram encontrados em pacientes diagnosticados com dengue grave (Butthep *et al.* 2012). TNF- α também estava elevada no plasma de pacientes crianças que foram hospitalizadas com dengue (Ferreira *et al.*, 2015). Sabe-se que TNF- α , facilita o transporte de macromoléculas através do endotélio (Henry e Duling, 2000) e ativação de vários componentes celulares endoteliais gerando uma disfunção endotelial (Dewi *et al.*, 2004; Gunther *et al.*, 2011), além de induzir a apoptose das células endoteliais (Chau *et al.*, 2004).

Essas altas concentrações de TNF- α e células inflamatórias induziram um aumento na expressão de alguns mediadores inflamatórios, bem como RANTES, VEGF-R2, VCAM-1 e MMP9, que, por sua vez, atraíram mais células inflamatórias e citocinas, aumentando a intensidade da resposta inflamatória. Essa resposta inflamatória descontrolada é, possivelmente, responsável pelo agravamento do quadro da infecção.

Sabe-se que, VEGF é uma potente citocina facilitadora da permeabilidade e que tem um papel na mediação do extravasamento plasmático nos casos de dengue com sinais de alerta e nos casos graves. Em estudos anteriores, que utilizaram o plasma de paciente com dengue grave, foi observado uma menor concentração de VEGF e de seu receptor solúvel sVEGF-R2 (Seet *et al.*, 2009; Kalita *et al.*, 2015). Porém acredita-se que esta citocina esteja diminuída no plasma, porém elevada nos tecidos (Srikiatkachorn *et al.*, 2007).

A presença de RANTES, VCAM-1 e MMP9 na circulação é regulada positivamente pela presença de TNF- α (Masuda *et al.*, 2002) e que, conforme ocorre o agravamento do quadro clínico do dengue, os níveis de VCAM-1 aumentam gradativamente, durante a fase aguda da doença (Koraka *et al.*, 2004). Esses mediadores irão ativar as células endoteliais, permitindo uma maior permeabilidade vascular. Estes dados corroboram com os nossos resultados encontrados, onde observamos um aumento na expressão de RANTES, VCAM-1 e MMP9 nas células endoteliais .

Outro fator indicador da degradação endotelial é o aumento na expressão de MMP9, que quando elevada, se direciona até aos componentes da matriz extracelular, degradando-a e favorecendo a migração de leucócitos para o local da infecção. Em um estudo anterior, foram observados elevados níveis de MMP9 em casos de dengue grave. São produzidas por células infectadas com DENV, tendo um papel fundamental na indução da permeabilidade de uma monocamada de células endoteliais e no extravasamento plasmático *in vitro* (Kubelka *et al.*, 2010).

Com relação aos achados do pulmão, observamos que, as áreas de hemorragia, edema, espessamento de septo e a formação da membrana hialina são características de choque por dengue. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório tiveram resultados similares (Póvoa *et al.*, 2014, 2016, Rodrigues *et al.*, 2014). Além disso, neste presente estudo observamos hiperplasia de macrófagos alveolares e áreas com infiltrado mononuclear. Esse aumento na celularidade, a presença de infiltrado mononuclear e a hiperplasia de macrófagos alveolares, já foram reportadas anteriormente em pacientes adultos como complicações decorrente de uma infecção por DENV (Rodrigues *et al.*, 2014; Póvoa *et al.*, 2014, 2016).

Com a coloração Tricrômio de Masson e Picrosírius, para detecção de fibras colágenas, podemos observar um aumento na expressão dessas fibras, principalmente, ao redor da veia pulmonar. Além de observarmos um aumento na expressão dessas fibras também disseminadas pelo parênquima, de alguns casos, coincidindo com os septos alveolares e alguns brônquios. Estudos anteriores também observaram um aumento na expressão das fibras colágenas na região dos septos alveolares, e estas estariam promovendo o espessamento do septo (Oliveira et al., 2019).

Com a coloração Ácido Reativo de Schiff podemos observar uma marcação positiva, indicando alta concentração de carboidratos (glicoproteínas), que são normalmente encontrados nos tecidos conectivos, muco e membrana basal. Essa marcação estava mais evidente nos septos alveolares, o que indica a presença de membrana hialina. Achados anteriores também já observaram altas concentrações de membrana hialina em pacientes com dengue grave sugerindo o choque por DENV (Póvoa et al., 2014, 2016; Oliveira et al., 2017).

Através da imunohistoquímica foi possível identificar uma maior presença de células inflamatórias, (linfócitos T CD8+ e macrófagos CD68+). Principalmente nas regiões de espessamento de septo, difusas pelo parênquima e ao redor da veia pulmonar. Sabe-se que a presença aumentada de linfócitos T CD8+ no pulmão está associada a quadro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), pois se acredita que os linfócitos T CD8+ gere modificações nas fibras elástica e na musculatura dos brônquios. Os brônquiólos podem ficar obstruídos por uma fibrose e por infiltrado de macrófagos (CD68+) e linfócitos T CD8+. Não se sabe exatamente como os linfócitos T CD8+ e os macrófagos provocam essas alterações, mas acredita-se que participem da apoptose e destruição das células epiteliais da parede alveolar, liberando TNF- α , perforinas e granzimas, além de estimularem a produção de fibras colágenas (Rufino, 2013).

Podemos observar também, que houve marcação positiva para o antígeno viral da proteína NS3 no interior dos pneumócitos tipo II, nos macrófagos alveolares e no interior dos capilares alveolares. Demonstrando, dessa forma, que o DENV foi capaz de penetrar nessas células e de se replicar em seu interior. Resultados similares foram encontrados por pesquisadores do nosso grupo, em estudos anteriores, com o pulmão de pacientes adultos, onde a marcação de NS3 foi positiva no interior dos macrófago alveolares, nos pneumócitos tipo II e nas células endoteliais (Póvoa et al., 2014).

Observamos a marcação positiva para TNF- α nas células endoteliais da veia pulmonar, nos monócitos e macrófagos alveolares. Além disso, uma marcação significativa em um infiltrado mononuclear peribronquiolar. Sabe-se que o TNF- α é uma citocina envolvida em várias disfunções de caráter inflamatório e fibrótico, desempenhando papel importante no comprometimento da função pulmonar. Tanto que terapias anti-TNF- α tem surtido bons efeitos no controle da resposta inflamatória pulmonar crônica (Clambarella, 2009)

Assim como encontrado no fígado, houve um aumento na expressão dos mediadores inflamatórios: RANTES, VEGF-R2 e VCAM-1. Em nosso estudo, observamos uma expressão maior de RANTES no interior de macrófagos e células endoteliais da veia pulmonar e dos capilares pulmonares. RANTES tem sido descrito como um dos responsáveis pelo recrutamento de linfócitos T e monócitos sanguíneos, o que gera um aumento de macrófagos alveolares e linfócitos T CD8+ no parênquima pulmonar levando ao quadro de DPOC (Costa et al., 2009). Já o VEGFR2 foi detectado nas células endoteliais da veia pulmonar e capilares alveolares e em monócitos e macrófagos alveolares. Quando ligado ao VEGF, promove a divisão,

proliferação e migração das células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, o extravasamento plasmático (Ding et al., 2014, Nunes, et al., 2019).

Foram observados aumentos na expressões de VCAM1 em macrófagos e monócitos circulantes e nas células endoteliais da veia pulmonar. Esta citocina promove a adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio vascular. Estudos verificaram altas concentrações de VCAM1 em fibroblastos, sintetizadores de colágeno (Unemoto et al., 2003), o que pode favorecer a formação da membrana hialina.

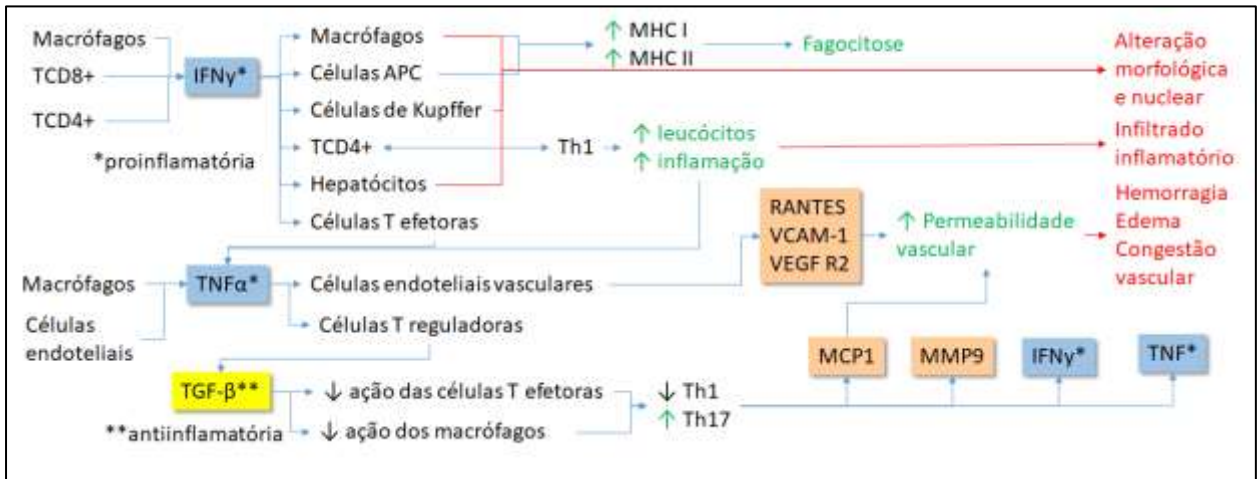
Ainda analisamos, histologicamente, a língua, na qual observamos áreas extensas de hemorragias, com hiperplasia de tecido linfóide e intenso infiltrado inflamatório mononuclear. Também identificamos o antígeno da proteína viral NS3 no interior de macrófagos situados imediatamente abaixo da camada muscular. Demonstrando que o DENV foi capaz de alcançar a região da língua e de se replicar no interior do tecido lingual. Essa replicação gerou lesões bolhosas, com conteúdo hemorrágico em seu interior, na superfície da língua. Alguns estudos já relacionaram alterações na língua com infecções por DENV, nos quais observaram sangramento agudo na gengiva e palato além de placas eritematosas e vesículas na língua e palato. O sangramento na língua pode causar dificuldade respiratória devido obstrução física, que pode variar desde sangramentos esporádicos a um sangramento profuso (Pedrosa et al., 2017). No entanto, o achado de hiperplasia de tecido linfóide é relatado por nossa equipe pela primeira vez.

E por fim, as análises histopatológicas da traquéia demonstraram um acúmulo de células mononucleares, indicando uma traqueíte, com focos de hemorragia na luz do órgão, um aumento de infiltrado linfocitário em áreas de tecido linfóide e uma área de metaplasia escamosa. Além disso, observamos a presença do antígeno da proteína viral NS3 em células endoteliais que se apresentavam tumefeitas na parede de vasos próximos a região da lâmina própria e nos monócitos, no interior desses vasos. Demonstrando assim, que o vírus foi capaz de alcançar esse tecido e de se replicar no interior dessas células, promovendo as alterações descritas. E que, as alterações descritas, como hemorragia, podem ser resultado da atração de citocinas e células inflamatórias para o local da lesão, promovendo uma resposta imune exagerada.

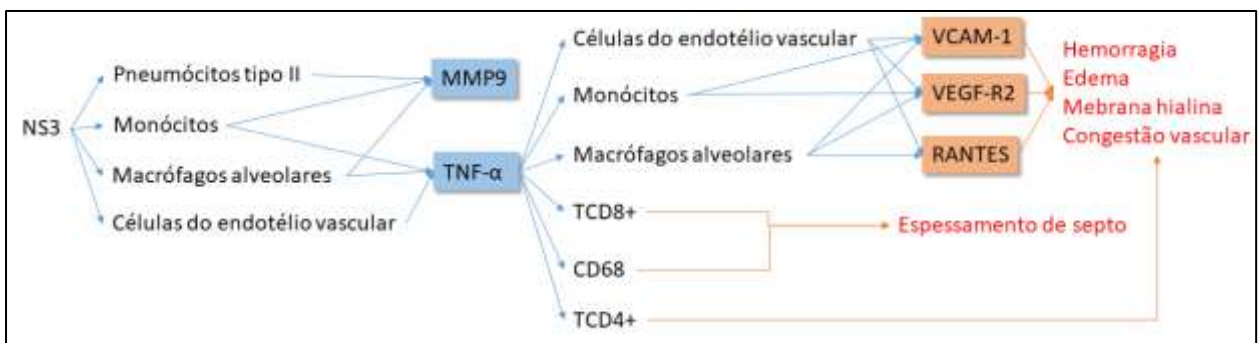
Este estudo é um dos poucos focados na imunopatogênese do dengue em crianças. O mais preocupante é que os casos de dengue em crianças tendem a evoluir para casos de dengue grave. Não se sabe ao certo porquê as crianças são mais suscetíveis ao dengue grave. Acreditamos que seja, talvez, por uma imaturidade do sistema imune e por uma incapacidade de combater o DENV, sem que os efeitos colaterais das citocinas e mediadores inflamatórios sejam mais danosos que a doença em si. Com este estudo, esclarecemos um pouco mais a imunopatogênese da doença, avaliando quais os possíveis biomarcadores de uma dengue grave, a fim de, na fase inicial da doença, identificá-los e estabelecer o melhor protocolo para tratamento. Leucócitos não são bons marcadores, uma vez que podem estar elevados ou diminuídos, e podem ter seus valores alterados se paciente apresentar uma co-infecção. Porém, a plaquetopenia é um bom indicador de que aquele paciente pode apresentar manifestações hemorrágicas. Outro fator é a presença aumentada de células T CD4+, T CD8+ e macrófagos CD68+, que indicam uma resposta inflamatória exagerada, que pode culminar com a síndrome do choque do dengue através do desencadamento de citocinas e mediadores inflamatórios. A investigação das principais células e mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese do dengue

contribui para o esclarecimento dos principais mecanismos envolvidos durante uma infecção. Dessa forma, poderemos modular a resposta imune, evitando os efeitos deletérios de sua ativação e assim, evitar a evolução para dengue grave e óbitos.

Resumindo, no fígado:



e no pulmão:



7 – Conclusões

- Com base em todos os resultados encontrados neste estudo e com o conhecimento prévio sobre a infecção por dengue nos tecidos, podemos observar que o vírus do dengue foi capaz de causar danos graves e permanentes em todos os órgãos analisados neste estudo, comprometendo seu funcionamento.
- Todos os casos estudados apresentaram alterações hematológicas, sendo detectado uma baixa contagem de plaquetas e um aumento nas enzimas hepáticas ALT e AST, demonstrando que manifestações hemorrágicas e disfunção hepática são sinais de uma possível evolução para dengue grave.
- Foram verificadas alterações histopatológicas no fígado (hemorragia, edema, congestão vascular, macro e microesteatose, infiltrado inflamatório) e no pulmão (espessamento de septo, formação de membrana hialina, hemorragia e edema). Além disso podemos observar aumento na concentração de fibras colágenas em ambos órgãos.
- Evidenciamos a presença do antígeno da proteína viral NS3 no interior das principais células constituintes de cada órgão e em macrófagos circulantes, confirmando que a replicação do DENV pode ocorrer nos macrófagos, hepatócitos, pneumócitos do tipo II e células endoteliais. As citocinas também estavam presentes no endotélio dos principais vasos que irrigam esses tecidos.
- O aumento na expressão das células inflamatórias (T CD4+, T CD8+ e CD68+) estaria desencadeando um aumento na expressão de citocinas e mediadores vasculares (TNF- α , RANTES, VEGF-R2, VCAM-1 e MMP9) que irão ativar mais células inflamatórias, levando ao quadro de choque hipovolêmico, característico do dengue grave.
- As citocinas e mediadores vasculares propostos estavam sendo produzidos, de fato, pelas células infectadas. Além de estarem associadas às áreas de lesão, indicando que a patologia estava sendo consequência de uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro.
- A disfunção endotelial não é unicamente provocada pelo vírus do dengue. Mas também pela produção de fatores vasoativos por macrófagos e células dendríticas que afetam o funcionamento das células endoteliais contribuindo para o extravasamento plasmático e celular.
- Os linfócitos T, os macrófagos e as células endoteliais de uma maneira geral foram as células predominantes na replicação e na produção das citocinas e mediadores.
- Deste modo, as plaquetas, as células inflamatórias e as citocinas e mediadores vasculares (TNF α , RANTES, VEGF-R2, VCAM-1 e MMP9) são qualificados como prováveis biomarcadores plasmáticos ou teciduais para dengue grave.

8 – Perspectivas

Devido o cronograma apertado e algumas dificuldades em conseguir alguns reagentes, algumas investigações ainda não foram realizadas. Pretendemos dar continuidade ao estudo, realizando a imunohistoquímica para MCP1, IL-10, IP10, TGF-B, perforina, IFN-gama, HMGB1, CD4+, MMP2, dentre outras, que julgamos igualmente importantes para a compreensão da imunopatogênese do dengue. Além disso, pretendemos avaliar a ação concomitante de algumas citocinas e mediadores, que acreditamos agirem em sincronia, como por exemplo NS3 e VCAM-1 ou NS3 e VEGF-R2 a fim de observarmos se há de fato um efeito sinérgico entre elas. Pretendemos quantificar as fibras de colágeno no fígado e no pulmão, através da coloração de picosirius e utilizando um software que calcula a porcentagem deste aumento. Almejamos realizar, nos tecidos da língua e da traquéia, as mesmas imunohistoquímicas realizadas no fígado e pulmão. Além de incluir as citocinas e mediadores que não foram realizados ainda no fígado e no pulmão, que foram citados acima.

9 - Referências Bibliográficas

- Agrupis, K. A., Ylade, M., Aldaba, J., Lopez, A. L., & Deen, J. (2019). Trends in dengue research in the Philippines: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007280>
- Almishri, W., Santodomingo-Garzon, T., Le, T., Stack, D., Mody, C. H., Swain, M. G., ... Dreux, M. (2016). Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.3227>
- Araújo, V. E. M. de, Bezerra, J. M. T., Amâncio, F. F., Passos, V. M. de A., & Carneiro, M. (2017). Aumento da carga de dengue no Brasil e unidades federadas, 2000 e 2015: análise do Global Burden of Disease Study 2015. In *Rev BRas epidemiol maio* (Vol. 20).
- Azeredo, E. L, Zagne S. M. O., Santiago M. A. et al., "Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever," *Immunobiology*, vol. 204, no. 4, pp. 494–507, 2001.
- Azeredo E. L., Kubelka C. F., Albuquerque L. M. et al., "Tissue factor expression on monocytes from patients with severe dengue fever," *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 45, no. 4, pp. 334–335, 2010.
- Aye, K. S., Charngkaew, K., Win, N., Wai, K. Z., Moe, K., Punyadee, N., ... Halstead, S. B. (2014). Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. *Human Pathology*, 45(6), 1221–1233. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.01.022>
- Ayyub, M., Khazindar, A.M., Lubbad, E.H., Barlas, S., Alfi, A.Y., Al-Ukayli, A. Characteristics of dengue fever in a large public hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2006;18:9–13.
- Azevedo, M.B. et al. O previsível e o prevenível: mortes por dengue na epidemia carioca. *Saúde em Foco/Informe Epidemiol Saúde Colectiva*, Rio de Janeiro, v.24, p.65-80, 2002.
- Barreto, M.L., & Teixeira, M.G. (2008). Dengue no Brasil: Situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avancados*, 22(64), 53–72. <https://doi.org/10.1590/s0103-40142008000300005>
- Bhamarapavati, N., Tuchinda, P., Boonyapaknavik, V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol* 1967;61:500–10.
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L, Hay, S.I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bosco Siqueira, J., Martelli, C.M.T., Coelho, G.E., Da Rocha Simplício, A.C., & Hatch, D.L. (2005). Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002.

Emerging Infectious Diseases, 11(1), 48–53.
<https://doi.org/10.3201/eid1101.031091>

Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, 2017.

Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, 2018.

Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, 2019.

Butthep, P.; Chunchakan, S.; Yoksan, S.; Tangnararatchakit, K.; Chuansumrit, A. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v.31, n.12, e232–e238, 2012.

Castillo Ramirez, J. A., & Urcuqui-Inchima, S. (2015, June 1). Dengue Virus Control of Type I IFN Responses: A History of Manipulation and Control. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, Vol. 35, pp. 421–430.
<https://doi.org/10.1089/jir.2014.0129>

Cedillo-Barrón, L., García-Cordero, J., Shrivastava, G., Carrillo-Halfon, S., León-Juárez, M., Bustos Arriaga, J., ... Gutiérrez Castañeda, B. (2018). The role of flaviviral proteins in the induction of innate immunity. In *Subcellular Biochemistry*.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_17

Chau, B.N., Chen, T.T., Wan, Y.Y., DeGregori, J., & Wang, J.Y. (2004). Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis requires p73 and c-ABL activation downstream of RB degradation. *Molecular and cellular biology*, 24(10), 4438–4447.
doi:10.1128/mcb.24.10.4438-4447.2004

Clambarella, B.T. Role of TNF- α in inflammatory response caused by silica particles in mice. Rio de Janeiro s.n. 2009; xvii, 60p Available from:
<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8059/2/69443.pdf>

Costa, C.H., Rufino, R., Lapa e Silva, J.R. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. *Rev. Assoc. Med. Bras.* [Internet]. 2009 [cited 2020 Jan 19]; 55(3): 347-354. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=ci_arttext&pid=S0104-42302009000300031&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302009000300031>.

Dewi, B.E., Takasaki, T., Kurane, I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods*. 2004;121:171–180. 24.

Ding M, Liu L, Hu C, Liu Y, Qiao Y, Jiang X. Expression of VEGFR2 and NRP-1 in non-small cell lung cancer and their clinical significance. *Chin J Cancer Res*. 2014 Dec;26(6):669-77. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2014.12.04. PMID: 25561764; PMCID: PMC4279211.

- Dokland, T., Walsh, M., Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Ee, K.H., & Wang, S. (2004). West Nile virus core protein: Tetramer structure and ribbon formation. *Structure*, 12(7), 1157–1163. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.024>
- Egloff, M. P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J.L., & Canard, B. (2002). An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: Crystal structure and functional characterization. *EMBO Journal*, 21(11), 2757–2768. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2757>
- Evans, J.D., & Seeger, C. (2007). Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signaling. *Journal of Virology*, 81(21), 11809–11816. <https://doi.org/10.1128/JVI.00791-07>
- Falgout, B., & Markoff, L. (1995). Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 69(11), 7232–7243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7474145>
- Falgout, B., Chanock, R., & Lai, C.-J. (1989). Proper Processing of Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Requires the N-Terminal Hydrophobic Signal Sequence and the Downstream Nonstructural Protein NS2a. In *JOURNAL OF VIROLOGY*.
- Fonseca, B., & Figueiredo, L. (2006). Dengue. In: Focaccia R (ed) *Tratado de Infectologia*, 2a edição, Atheneu, São Paulo,. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000082&pid=S0037-8682200600020001400009&lng=en
- Gamble, J., Bethell, D., Day, N. P. J., Loc, P. P., Phu, N. H., Gartside, I. B., ... White, N. J. (2000). Age-related changes in microvascular permeability: A significant factor in the susceptibility of children to shock? *Clinical Science*, 98(2), 211–216. <https://doi.org/10.1042/cs0980211>
- Green, A. M., Beatty, P. R., Hadjilaou, A., & Harris, E. (2014, March 20). Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 426, pp. 1148–1160. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.023>
- Gubler, D.J. (1989). *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Charles Franklin Craig Lecture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(6), 571–578. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.571>
- Gubler, D.J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. In *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* (Vol. 11).
- Gubler, D.J. (2004). The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: Full circle? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.013>

- Gubler, J. D. (2011). Dengue, Urbanization, and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
- Gunther VJ, Putnak R, Eckels KH, et al. A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine*. 2011;29:3895– 3904
- Gupta, A., Srinivasan, R., Setia, S., Soundravally, R., and Pandian, D. G. (2009). Uveitis following dengue fever. *Eye* 23, 873–876. doi: 10.1038/eye.2008.124
- Guzman, M. G., Alvarez, M., & Halstead, S. B. (2013, July). Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology*, Vol. 158, pp. 1445–1459. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3>
- Halstead, S. B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *Journal of Infectious Diseases*, 140(4), 527–533. <https://doi.org/10.1093/infdis/140.4.527>
- Halstead, S., & Wilder-Smith, A. (2019). Severe dengue in travellers: pathogenesis, risk and clinical management. *Journal of Travel Medicine*. <https://doi.org/10.1093/jtm/taz062>
- Hammon, W. M. D., Rudnick, A., & Sather, G. E. (1960). Viruses associated with epidemic hemorrhage fevers of the Philippines and Thailand. *Science*, 131(3407), 1102–1103. <https://doi.org/10.1126/science.131.3407.1102>
- Henry CB, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(6):H2815–H2823. doi:10.1152/ajpheart.2000.279.6.H2815
- Hotta, S. (1953). Dengue epidemics in Japan, 1942-1945. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56(4), 83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13053605>
- Ibañez-Bernal, S., Baltasar, B., Mutebi, J. P., Argot, E., Rodriguez, G., Martinez-Campos, C., ... Flisser, A. (1997). First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico.
- Iglesias, N. G., & Gamarnik, A. V. (2011). RNA Biology Dynamic RNA structures in the dengue virus genome. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14992>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004, October). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, Vol. 5, pp. 987–995. <https://doi.org/10.1038/ni1112>
- Jagadishkumar K, Jain P, Manjunath VG, Umesh L. Hepatic involvement in dengue fever in children. *Iran J Pediatr*. 2012;22:231–6.
- Kalita J, Chauhan PS, Mani VE, Bhoi SK, Misra UK . VEGF and its receptors in dengue virus infection, 2015

- Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusakawa, J., Ebner, K. E., & Padmanabhan, R. (1995). Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32), 19100–19106. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.19100>
- King, C. A., Marshall, J. S., Alshurafa, H., & Anderson, R. (2000). Release of Vasoactive Cytokines by Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of a Human Mast Cell/Basophil Line. *Journal of Virology*, 74(15), 7146–7150. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7146-7150.2000>
- Kubelka, Claire F. Damasco, Paulo V. Ávila, Carlos A. L. Motta-Castro, Ana Rita C. Cunha, Rivaldo V. Cruz. Oswaldo G et al. *Journal of Infection*, Vol.61, issue 6, 501-505.
- Kyung, M. C., & Diamond, M. S. (2008). Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *Journal of Medical Virology*, 80(3), 547–556. <https://doi.org/10.1002/jmv.21091>
- León-Juárez, M., Martínez-Castillo, M., Shrivastava, G., García-Cordero, J., Villegas-Sepulveda, N., Mondragón-Castelán, M., ... Cedillo-Barrón, L. (2016). Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virology Journal*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0456-4>
- Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J. M., & Khromykh, A. A. (2008). Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *Journal of Virology*, 82(10), 4731–4741. <https://doi.org/10.1128/jvi.00002-08>
- Lindenbach, B. D., Thiel, H.-J., & Rice, C. M. (2006). 33 Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.
- Ling L.M., Wilder –Smith A., Leo Y.S. et al., 2007. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *Journal of clinical virology*, v. 38, n 3, p 265-268, 2007
- Lobigs, M., Lee, E., Ng, M. L., Pavy, M., & Lobigs, P. (2010). A flavivirus signal peptide balances the catalytic activity of two proteases and thereby facilitates virus morphogenesis. *Virology*, 401(1), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.008>
- Mackenzie, J. M., & Westaway, E. G. (2001). Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *Journal of Virology*, 75(22), 10787–10799. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10787-10799.2001>
- Martínez Torres, E. (2008). Dengue. *Estudos Avançados*, 22(64), 33–52. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142008000300004>
- Metselaar, D., Grainger, C. R., Oei, K. G., Reynolds, D. G., Pudney, M., Leake, C. J., ... Simpson, & D. I. H. (1980). An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). In *Bulletin of the World Health Organization* (Vol. 58).

- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., & Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8873–8882. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609919200>
- Miller, S., Sparacio, S., & Bartenschlager, R. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8854–8863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512697200>
- Min M.W., Charngkaew, K., Punyadee, N., Aye, K.S., Win N., Chaisri, U., Chomanee, N., Avirutnan, P., Yoksan, S., Malasit, P. *Ultrastructural Features of Human Liver Specimens from Patients Who Died of Dengue Hemorrhagic Fever*, *Tropical medicine and infectious disease*, 2019.
- Miranda, S.L.M., Caprara, A., Rocha Peixoto, A.C., Monteiro, C.V.M.; Pessoa, R.S. Percepção de atores sociais responsáveis pela gestão de resíduos sólidos no contexto do dengue. *Revista Brasileira de Promoção de Saúde*. Fortaleza, vol.26, n. 1, p.233-241, 2013.
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., ... Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science Translational Medicine*, 7(304). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>
- Mohan B., Patwari A.K., Anand V.K., et al. Hepatic dysfunction in childhood dengue infection. *J Trop Pediatrics* 2000;46:40-3.
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9, 921–927 (2003). <https://doi.org/10.1038/nm887>
- Mota, M. T. de O., Terzian, A. C., Silva, M. L. C. R., Estofolete, C., & Nogueira, M. L. (2016). Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.008>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the Flavivirus life cycle. 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Nogueira, R. M., Schatzmayr, H. G., de Filippis, A. M., dos Santos, F. B., da Cunha, R. V., Coelho, J. O., ... Miagostovich, M. P. (2005). Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerging infectious diseases*, 11(9), 1376–1381. doi:10.3201/eid1109.041043
- Nunes, P. C. G., Paes, M. V., de Oliveira, C. A. B., Soares, A. C. G., de Filippis, A. M. B., Lima, M. da R. Q., ... dos Santos, F. B. (2016). Detection of dengue NS1 and NS3 proteins in placenta and umbilical cord in fetal and maternal death. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.24479>
- Ochi H, Masuda J, Gimbrone MA. 2002. Hyperosmotic stimuli inhibit VCAM-1 expression in cultured endothelial cells via effects on interferon regulatory factor-1 expression and activity. *Eur J Immunol* 32:1821–1831.

- Oliveira, É.C.L., Pontes, E.R.J.C., Cunha, R.V., Fróes, Í.B., & Nascimento, D. (2009). Alterações hematológicas em pacientes com dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(6), 682-685.
- Oliveira, W. K. de, Brito, S. M. F., Pereira, G. F. M., Luiz de Abreu, A., Rohlf, D. B., Duarte, E., ... Carvalho da Silva, V. L. (2019). *Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde*. 50, 1–14.
- Oral Sci, B. J., Byatnal, A., Mahajan, N., Koppal, S., Ravikiran, A., & Devi K, P. M. (n.d.). Case Report Unusual yet isolated oral manifestations of persistent thrombocytopenia-A rare case report (Vol. 12).
- Pan American Health Organization (PAHO). (2017). Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. In Pan American Health Organization. Retrieved from <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/33895>
- Pedrosa, M., de Paiva, M., Oliveira, L., Pereira, S., da Silva, C., & Pompeu, J. (2017). Oral manifestations related to dengue fever: a systematic review of the literature. *Australian Dental Journal*, 62(4), 404–411. <https://doi.org/10.1111/adj.12516>
- Penelopie Koraka, Bernadette Murgue, Xavier Deparis, Eric C. M. Van Gorp, Tatty E. Setiati, Albert D. M. E. Osterhaus, Jan Groen, Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity, 2004
- Phoo, W. W., Li, Y., Zhang, Z., Lee, M. Y., Loh, Y. R., Tan, Y. B., ... Luo, D. (2016). Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13410>
- Póvoa, T. F., Oliveira, E. R. A., Basílio-de-Oliveira, C. A., Nuovo, G. J., Chagas, V. L. A., Salomão, N. G., ... Paes, M. V. (2016). Peripheral organs of dengue fatal cases present strong pro-inflammatory response with participation of IFN-Gamma-, TNF-Alpha and RANTES-Producing cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168973>
- Ramabhata, S., Palaniappan, S., Hanumantharayappa, N. et al. *Indian J Pediatr* (2017) 84: 897. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2423-0>
- Reiter, P., Aui, M. A. A., & Colon, N. (1991). Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions or daily monitoring of *Aedes aegypti* populations (Vol. 7).
- Rodhain, F. (1997). Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, 45–60.
- Rodrigues RS, Brum ALG, Paes MV, Póvoa TF, Basilio-de-Oliveira CA, Marchiori E, et al. Lung in dengue: Computed tomography findings. *PLoS One*. 2014 May 16;9(5).
- Ruche, G. La, Souarès, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Desprès, P., ... Gastellu-Etchegorry, M. (2010). First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance*, 15(39), 19676. <https://doi.org/10.2807/ese.15.39.19676-en>

- Rufino R. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. 2013.
- Salles, T. S., Da Encarnação Sá-Guimarães, T., De Alvarenga, E. S. L., Guimarães-Ribeiro, V., De Meneses, M. D. F., De Castro-Salles, P. F., ... Moreira, M. F. (2018, April 24). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review. *Parasites and Vectors*, Vol. 11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2830-8>
- Sarkar, J., Mohan, C., Misra, D. N., & Goel, A. (2011). Lingual hematoma causing upper airway obstruction: An unusual manifestation of dengue fever. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(5), 412–413. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60115-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60115-6)
- Scott, J. A., Brogdon, W. G., & Collins, F. H. (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(4), 520–529. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.49.520>
- Sedgwick, S.G. & Smerson, S.J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework, *Trends Biochem. Sci.*, 24(8), 1999, 311-316.
- 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. *Int J Infect Dis*. 2009;13(5):e248–253. doi: 10.1016/j.ijid.2008.11.028.
- Severa, M., & Fitzgerald, K. A. (2007). TLR-Mediated Activation of Type I IFN During Antiviral Immune Responses: Fighting the Battle to Win the War. In *Interferon: The 50th Anniversary* (pp. 167–192). https://doi.org/10.1007/978-3-540-71329-6_9
- Siler, J. F., Hall, M. W., & Hitchens, A. P. (1926). Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity, and Prevention. *Philipp. J. Sci*, 29(1–2).
- Slowik MR, Min W, Ardito T, Karsan A, Kashgarian M, Pober JS, Evidence that tumor necrosis factor triggers apoptosis in human endothelial cells by interleukin-1 converting enzyme-like protease-dependent and independent pathways *Lab invest* 77, 257-267, 1997.
- Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanaroj 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 Feb 15;81(4):1592–600.
- Srikiatkachorn, A., & Green, S. (2010). Markers of Dengue Disease Severity. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02215-9_6
- Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J., & Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*.
- Stanaway, J. D., Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., Coffeng, L. E., Brady, O. J., ... Murray, C. J. L. (2016). The global burden of dengue: an analysis

- from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 712–723. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00026-8)
- Sun, D.-S., King, C.-C., Huang, H.-S., Shih, Y.-L., Lee, C.-C., Tsai, W.-J., ... Chang, H.-H. (2007). Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(11), 2291–2299. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02754.x>
- Sundaram, C., Shantveer, G., Uppin, S. G., Dakshinamurthy, K. V., and Borgahain, R. (2010). Acute disseminated encephalomyelitis following dengue hemorrhagic fever. *Neurol. India* 58, 599–601. doi: 10.4103/0028-3886. 68666
- Tan, B.-H., Fu, J., Sugrue, R. J., Yap, E.-H., Chan, Y.-C., & Tan, Y. H. (1996). Recombinant Dengue Type 1 Virus NS5 Protein Expressed in *Escherichia coli* Exhibits RNA-Dependent RNA Polymerase Activity. In *VIROLOGY* (Vol. 216).
- Tauil, P. L. (2001). Urbanization and dengue ecology. *Cadernos de Saúde Pública / Ministério Da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, 17 Suppl, 99–102. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700018>
- Touyz, R. M. (2005, March 1). Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: Role of angiotensin II. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, Vol. 14, pp. 125–131. <https://doi.org/10.1097/00041552-200503000-00007>
- Unemoto, K., Sakai, M., Shima, H., Guarino, N., & Puri, P. (2003). Increased expression of ICAM-1 and VCAM-1 in the lung of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatric surgery international*, 19(5), 365–370. doi:10.1007/s00383-003-1012-7
- Uno, N., & Ross, T. M. (2018, December 1). Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging Microbes and Infections*, Vol. 7. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0168-0>
- Van Boxel-Dezaire, A. H. H., Rani, M. R. S., & Stark, G. R. (2006, September). Complex Modulation of Cell Type-Specific Signaling in Response to Type I Interferons. *Immunity*, Vol. 25, pp. 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.014>
- Van der Schaar, H. M., Rust, M. J., Waarts, B.-L., van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R. J., Wilschut, J., ... Smit, J. M. (2007). Characterization of the Early Events in Dengue Virus Cell Entry by Biochemical Assays and Single-Virus Tracking. *Journal of Virology*, 81(21), 12019–12028. <https://doi.org/10.1128/jvi.00300-07>
- Viso ATR (1), Barbosa T de C (2), Yamamoto L (3), Pagliari C (4), Fernandes ER (5), Brasil RA (5), et al. Portal CD4+ and CD8+ T lymphocyte correlate to intensity of interface hepatitis in chronic hepatitis C. *Inst Med Trop São Paulo [Internet]*. 2007;49(6):371–8. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rimts/v49n6/07.pdf>

- Wai, C. (2003). A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38(2), 518–526. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50346>
- Wang, Q.-Y., Xie, X., Zou, J., & Shi, P.-Y. (2015). Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.007>
- Wang, W., Chen, H., Yang, C., Hsieh, S., Juan, C., Chang, S., ... King, C. (2006). Slower Rates of Clearance of Viral Load and Virus-Containing Immune Complexes in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Infectious Diseases*, 43(8), 1023–1030. <https://doi.org/10.1086/507635>
- Werneck, G. L., Macias, A. E., Mascarenas, C., Coudeville, L., Morley, D., Recamier, V., ... Toh, M.-L. (2018). Comorbidities increase in-hospital mortality in dengue patients in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 113(8), 180082. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180082>
- Wilder-Smith, A., Gubler, D. J., Weaver, S. C., Monath, T. P., Heymann, D. L., & Scott, T. W. (2017, March 1). Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 17, pp. e101–e106. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30518-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30518-7)
- Wilson, M. E., & Chen, L. H. (2002). Dengue in the Americas. In *Dengue Bulletin* (Vol. 26). Retrieved from www.cdc.gov/travel/other/dengue-
- Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2013). Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *Journal of Virology*, 87(8), 4609–4622. <https://doi.org/10.1128/jvi.02424-12>
- Youn, S., Li, T., McCune, B. T., Edeling, M. A., Fremont, D. H., Cristea, I. M., & Diamond, M. S. (2012). Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. *Journal of Virology*, 86(13), 7360–7371. <https://doi.org/10.1128/jvi.00157-12>
- Zou, C., Huang, C., Zhang, J., Wu, Q., Ni, X., SunID, J., & DaiID, J. (2019). Virulence difference of five type I dengue viruses and the intrinsic molecular mechanism. 81471571. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007202>
- Zou, J., Lee, L. T., Wang, Q. Y., Xie, X., Lu, S., Yau, Y. H., ... Shi, P.-Y. (2015). Mapping the Interactions between the NS4B and NS3 Proteins of Dengue Virus. *Journal of Virology*, 89(7), 3471–3483. <https://doi.org/10.1128/jvi.03454-14>