



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

RENATA LIMA LOPES

**ESTUDO DE MEGACARIÓCITOS E DA EXPRESSÃO DE NS3 EM PULMÕES DE
CASOS DE DENGUE FATAL: ASSOCIAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA**

FORTALEZA

2022

RENATA LIMA LOPES

ESTUDO DE MEGACARIÓCITOS E DA EXPRESSÃO DE NS3 EM PULMÕES DE
CASOS DE DENGUE FATAL: ASSOCIAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Coorientadora: Dr^a Fernanda Capelo Barroso

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L855e Lopes, Renata Lima.
Estudo de megacariócitos e da expressão de NS3 em pulmões de casos de dengue fatal: associação clínico-patológica. / Renata Lima Lopes. – 2022.
95 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz.

Coorientação: Profa. Dra. Fernanda Capelo Barroso.

1. Dengue grave. 2. Megacariócitos. 3. Pulmão. 4. Imuno-histoquímica. 5. Arbovirose. I. Título.

CDD 571.9

RENATA LIMA LOPES

ESTUDO DE MEGACARIÓCITOS E DA EXPRESSÃO DE NS3 EM PULMÕES DE
CASOS DE DENGUE FATAL: ASSOCIAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovada em: 14/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Maria do Socorro Queiroz Alves de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Priscila Conrado Guerra Nunes
Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro (FIOCRUZ RJ)

A Deus, minha fortaleza.

Ao meu marido, que em sua simplicidade e retidão de caráter me ensina diariamente que amar e perdoar são as chaves da felicidade

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o meu sustento, guia e me fazer conseguir chegar até aqui.

À minha família, - marido, filhos, pai, mãe e avós – por sempre me apoiarem e apostarem em todos os meus planos e sonhos.

Aos amigos, de longe e de perto, que ganhei ao longo de minha caminhada e trouxeram leveza e inspiração.

Ao Dr. Joel Borges Filho, patologista do SVO e amigo que me orientou e me deu apoio ao longo da execução deste projeto.

À Prof. Dr^a. Margarida Pompeu, pela amizade, incentivo e orientação a mim dedicados ao longo dessa jornada, bem como pela oportunidade de fazer reflexões sobre a vida e nossas prioridades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, por ter me possibilitado a realização deste Mestrado num momento de retorno à “casa” após 20 anos de minha graduação.

À secretária do Programa, Valéria Cordeiro, por ser sempre tão prestativa, educada e pronta a ajudar e orientar nos assuntos administrativos, tendo sido um farol ao longo de todo o processo, desde a inscrição até a conclusão. Minha gratidão!

Aos colegas da turma de Mestrado, pela convivência e troca de experiências.

A Prof. Dr^a. Fernanda Capelo Barroso, por toda a paciência e por dar a oportunidade de desbravar numa nova área de pesquisa, por ter acreditado em meu potencial e, com todo o carinho, inteligência e humildade, ter idealizado esse Projeto.

À Prof^a. Romélia, Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro e a Priscila por aceitarem participar da Banca de Defesa e assim contribuírem para a melhoria desse trabalho

E por fim, ao Prof. Dr. Ajax, por ter mais uma vez permitido que seu caminho cruzasse com o meu e, novamente, ter me direcionado nos momentos em que eu perdia o azimute correto, você foi minha bússola acadêmica, profissional e até de desenvolvimento pessoal.

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

A todos a minha gratidão!

“É hora de recomeçar tudo outra vez, sem
ilusão e sem pressa, mas com a teimosia do
inseto que busca um caminho no terremoto.”
(Drummond)

RESUMO

A dengue é uma doença viral que vem se expandido mundialmente de forma preocupante nas últimas décadas. No Brasil, a dengue é endêmica com picos epidêmicos. Devido a existência de algumas lacunas na compreensão de sua patogênese, especialmente em casos graves que levam a morte, a dengue continua sendo uma ameaça significativa à saúde nas regiões atingidas. Estudos *in vivo* de casos fatais humanos podem contribuir de forma significativa para elucidação das células envolvidas na replicação do DENV, contribuindo para a trombocitopenia associada à gravidade da dengue. Objetivou-se identificar e quantificar os megacariócitos pulmonares, avaliar correlação entre dados clínicos e anatomopatológicos com plaquetas, e identificar a presença de NS3 em megacariócitos pulmonares em casos de dengue grave e fatal. Realizou-se um estudo observacional retrospectivo *post-mortem*, onde foram analisados blocos de parafina de tecido pulmonar de 34 casos de dengue fatal ocorridos no Ceará e que sofreram autópsia no Serviço de Verificação de Óbito (SVO) entre 2011 e 2013 com diagnóstico clínico e laboratorial de dengue devidamente notificados ao Núcleo de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do estado do Ceará. Os tecidos pulmonares foram preparados para identificação dos megacariócitos na coloração HE, estudo imunohistoquímico com anticorpos monoclonais anti-CD61 para confirmação da identificação e quantificação dos megacariócitos pulmonares, e demonstração da presença indireta da replicação viral nos megacariócitos com anticorpos monoclonais anti-NS3. Foram capturadas imagens na magnificação de 400x do parênquima pulmonar marcadas com anticorpo anti-CD61 e anti-NS3. Encontrou-se uma média maior de megacariócitos pulmonares em pacientes com dengue do que no grupo controle apresentando diferença estatisticamente significativa ($5,32 \pm 2,69$ vs. $2,61 \pm 1,97$ respectivamente $p < 0,001$). A maioria dos pacientes apresentou sinais de alerta para sangramento (55,88%) e sinais de hemorragia nas autópsias (91,18%). Com relação aos eventos trombóticos, ocorreram em 35,29% dos casos fatais de dengue e 58,33% dos eventos trombóticos foram pulmonares. Os resultados também revelaram que 38,24% dos pacientes com dengue apresentavam megacariócitos pulmonares marcados contra NS3 confirmando a presença de replicação do DENV nessas células. Em suma, demonstrou-se um aumento dos megacariócitos pulmonares, e a expressão, *in vivo*, de NS3 em megacariócitos pulmonares de pacientes com dengue grave, indicando que o DENV pode infectar essas células comprometendo a produção de plaquetas contribuindo, portanto, para um prognóstico desfavorável.

Palavras-chave: Dengue grave; Megacariócitos; Pulmão; Imuno-Histoquímica; Arbovirose;

ABSTRACT

Dengue is a viral disease that has been worryingly expanding worldwide for decades. In Brazil, dengue is endemic with epidemic peaks. There are some gaps in the understanding of dengue pathogenesis, especially in severe cases leading to death, it continues to be a significant health threat in the affected regions. *In vivo* studies of human dengue fatal cases can significantly contribute to identifying involved cells in DENV replication, which contributes to thrombocytopenia associated with the severity of dengue. The objective was to identify and quantify lung megakaryocytes, evaluate the correlation between clinical and anatomopathological data with platelets, and identify the presence of NS3 in lung megakaryocytes in cases of severe and fatal dengue fever. A retrospective postmortem observational study was carried out using paraffin blocks of lung tissue from 34 dengue fatal cases occurred in Ceará. All underwent autopsy at the Death Verification Service (SVO) between 2011 and 2013, and all had clinical and laboratory diagnosis of dengue and were duly notified to the Epidemiological Surveillance Center of the Ceará Department of Health. The lung tissues were prepared for identification of megakaryocytes by HE stain, immunohistochemistry with anti-CD61 monoclonal antibodies to confirm the identification and quantification of lung megakaryocytes, and demonstration of the indirect presence of viral replication in megakaryocytes with anti-NS3. Lung parenchymal images were captured at 400x magnification, marked with anti-CD61 and anti-NS3 antibodies. A higher average of lung megakaryocytes was found in dengue patients than the control group, presenting a statistically significant difference (5.32 ± 2.69 vs. 2.61 ± 1.97 respectively, $p < 0.001$). The majority of patients showed bleeding warning signs (55.88%) and hemorrhage signs at autopsies (91.18%). Regarding thrombotic events, they occurred in 35.29% of fatal dengue cases and 58.33% of thrombotic events were pulmonary. The results also revealed that 38.24% of dengue patients had pulmonary megakaryocytes stained against NS3, confirming the presence of DENV replication in these cells. In summary, it was demonstrated an increase in the number of lung megakaryocytes and the *in vivo* NS3 expression in lung megakaryocytes from patients with severe dengue fever, indicating that DENV can infect these cells, compromising platelet production, therefore contributing to an unfavorable prognosis.

Keywords: Severe dengue; Megakaryocytes; Lungs; Immunohistochemistry; Arbovirus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 2 - Distribuição dos casos de dengue, Chikungunya e Zika por ano de notificação. Região das Américas, 2008-2023.....	21
Figura 3 - Panorama epidemiológico da dengue no mundo.....	24
Figura 4 - Situação epidemiológica de casos de dengue no Ceará de 2010 a 2023.....	24
Figura 5 - Classificação clínica da dengue de 1997 e 2009 (OMS).....	26
Figura 6 - Vírus da dengue e sua estrutura genômica.....	29
Figura 7 - Ciclo de replicação do vírus da dengue.....	32
Figura 8 - Resposta imune nas infecções primárias e secundárias da dengue.....	33
Figura 9 - Métodos de detecção laboratorial do vírus da dengue.....	39
Figura 10 - Opções de diagnóstico laboratorial em pacientes com suspeita de dengue.....	41
Figura 11 - Medula óssea de indivíduo normal com megacariócitos indicados pelas setas....	42
Figura 12 - Megacariopoiese com marcadores de superfície de cada estágio da diferenciação desde a célula pluripotente até megacariócitos e plaquetas.....	44
Figura 13 - Hematopoiese e megacariopoiese na medula óssea.....	45
Figura 14 - Ilustração das vias clássica e de emergência da megacariopoiese e migração dos megacariócitos da medula óssea para os pulmões	45
Figura 15 - Ilustração de Ludwin Aschoff de 1893 de onstrando células gigantes nos capilares pulmonares (atualmente descritos como megacariócitos pulmonares)	46
Figura 16 - Citocinas e fatores de transcrição presentes na megacariopoiese.....	50
Figura 17 - Mecanismos efetores e resposta imune dos megacariócitos como células importantes nas repostas imunológicas.....	51
Figura 18 - Esquema do fluxograma da sequência da obtenção das amostras para confirmação do diagnóstico dos casos suspeitos de dengue no SVO-CE durante o período de 2011 a 2013	56

Figura 19 - Esquema do fluxograma da coleta de amostras de tecido pulmonar deste estudo em casos confirmados de dengue em adultos do SVO-CE no período de 2011 a 2013.....	57
Figura 20 - Protocolo com o planejamento do bloco dos casos de dengue com as microsessões (<i>spots</i>) dos 34 casos distribuídos em 10 colunas e 7 linhas de TMA	58
Figura 21 - Blocos e lâminas do estudo.....	59
Figura 22 - Fotografias em microscópio eletrônico de megacariócitos em tecido pulmonar e medula óssea.....	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação entre população média de megacariócitos dos grupos dengue e controle	69
Gráfico 2 – Correlação entre a contagem de plaquetas x megacariócitos pulmonares	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Vantagens e limitações dos diferentes testes de diagnóstico de dengue ...	40
Tabela 2	Dados demográficos de idade e sexos dos grupos dengue e controle.....	63
Tabela 3	Frequência do método diagnóstico laboratorial de dengue nos 34 casos da amostra.....	64
Tabela 4	Frequência de comorbidades dos casos de dengue (n=34).....	65
Tabela 5	Sinais clínicos de alerta para sangramentos e a frequência dos tipos de sangramento n = 34 casos.....	66
Tabela 6	Localização das hemorragias descritas nas necropsias estratificadas por sistemas em 31 dos 34 casos de dengue estudados.....	67
Tabela 7	Sinais de trombose na necropsia estratificada por órgãos (12 de 34 casos de dengue apresentaram sinais de trombose).....	67
Tabela 8	Número de casos de dengue com plaquetopenia ($\leq 100.000/\text{mm}^3$)	68
Tabela 9	Teste de associação entre plaquetas e dados de hemorragia e trombose.....	68
Tabela 10	Teste de associação entre média de MK e dados de hemorragia e trombose....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ADE	“ <i>Antibody depeden enhancement</i> ” ou citotoxicidade anticorpo dependente
Ag	Antígeno
AgNS1	Antígeno da Proteína Não Estrutural 1
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
D	Dengue
DC	Células dendríticas
DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Vírus Dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus Dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus Dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus Dengue sorotipo 4
DG	Dengue Grave
DSA	Dengue com sinais de alarme
ELISA	Ensaio Imunoabsorç~0o enzimática
FHD	Febre hemorrágica do dengue
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina e Eosina
hpf	“ <i>hiper power field</i> ” ou campo de alta potência
IEC	Instituto Evandro Chagas
IHQ	Imuno-histoquímica
INF- α	Interferon α
LACEN-CE	Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
MK	Megacariócitos
MKP	Megacariócito Precursor
MEP	Progenitor Megacariócito-Eritróide
MO	Medula óssea
NS1	Proteína Não Estrutural 1

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PRRs	Receptores de reconhecimento de patógenos
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa
SCD	Síndrome do choque da dengue
SESA-CE	Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
ssRNA	<i>Single strand RNA</i> ou RNA de fita simples
SVO-CE	Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado no Ceará
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativa
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular - 1

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μ	Média
σ	Desvio padrão
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E CLASSIFICAÇÃO DA DENGUE.....	24
1.3 AGENTE ETIOLÓGICO.....	26
1.4 REPLICAÇÃO VIRAL	29
1.5 RESPOSTA IMUNE	31
1.6 PATOGENIA DA DENGUE.....	33
1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	37
1.8 MEGACARIÓCITOS E PLAQUETAS.....	41
2. JUSTIFICATIVA.....	51
3. OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	53
4.2. DESENHO DO ESTUDO	53
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	55
4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	55
4.5. MICROARRANJO DE TECIDO PULMONAR (TISSUE MICROARRAY OU TMA).....	57
4.6. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	58
4.7. ESTUDO MORFOMÉTRICO	59
4.8. ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR CD61 E IDENTIFICAÇÃO DO MARCADOR NS3	59
4.8.1 Marcação com anticorpo anti-CD61.....	59
4.8.2. Marcação com anticorpo anti-NS3.....	60
4.9. ANÁLISE DOS DADOS.....	61
5. RESULTADOS.....	62
5.1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA.....	62
5.2. DADOS CLÍNICOS	64

5.3.	DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE HEMORRAGIA E TROMBOSE.....	65
5.4.	DADOS DAS PLAQUETAS	67
5.5.	QUANTIFICAÇÃO DOS MEGACARIÓCITOS.....	68
5.6.	IDENTIFICAÇÃO DE MEGACARIÓCITOS PULMONARES MARCADOS COM ANTICORPO ANTI-NS3.....	70
6.	DISCUSSÃO	72
7.	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	91
	ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	95

1. INTRODUÇÃO

Diante de inúmeros desafios na saúde pública, a dengue é uma doença infecciosa de origem viral que desafia por décadas estudiosos mundialmente. Trata-se de uma doença transmitida por um mosquito, o *Aedes aegypti* (Figura 1) possui uma gama variada de apresentações clínicas, que infelizmente não possui tratamento específico e pode, em alguns casos evoluir para o desfecho mais não desejado: a morte!

Devido a essa imprevisibilidade de sua evolução, existe um esforço de cientistas, especialistas, autoridades e indústria farmacêutica em desenvolver vacinas, medidas de controle do vetor e sobretudo de entender a patogênese da dengue grave para que novos guidelines clínicos sejam mais assertivos e efetivos pois é impossível minimizar o problema e escamotear os números alarmantes de boletins epidemiológicos da dengue e de sua variante hemorrágica. Este é um perigo real e que exige uma atenção muito cuidadosa e um olhar muito carinhoso para este problema que aflige principalmente países de zonas tropicais e subtropicais.

Figura 1 – Mosquito *Aedes aegypti*



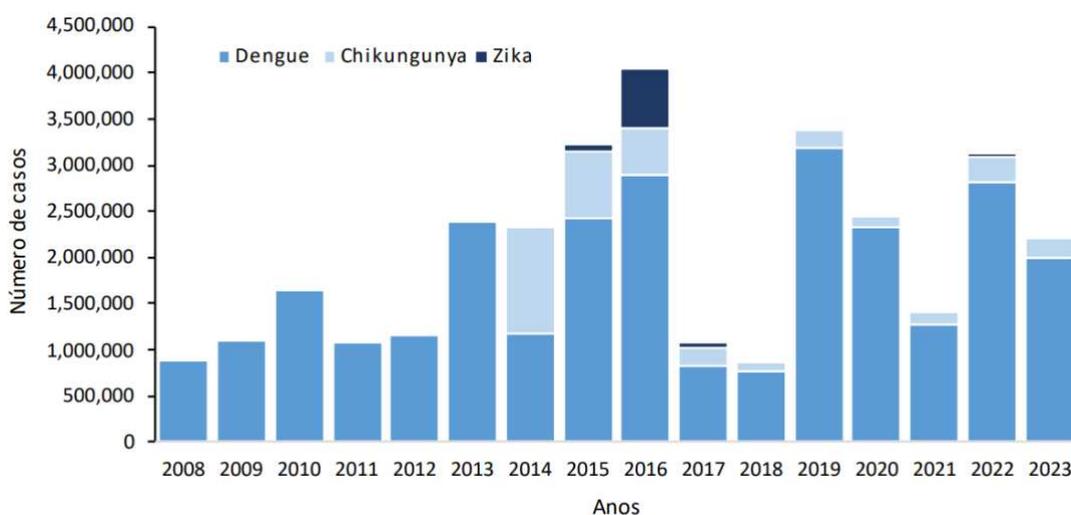
Foto do acervo pessoal da autora cedida pelo amigo fotógrafo e biólogo Vinicius de Souza

1.1 Epidemiologia

A dengue é uma doença viral que vem aumentando seu número de casos de forma alarmante nas últimas décadas em todo o mundo, sendo 2019 o ano de maior número de registro de casos até o momento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Este crescente aumento de casos pode ser um indício do contínuo negligenciamento desta doença mantendo-a como

uma constante ameaça à saúde pública mundial, especialmente em áreas tropicais e subtropicais (QI; ZHANG; CHI, 2008; SANYAOLU, 2017). Nas Américas, ainda que tenha sido registrado um aumento dos números de casos de dengue 2022, este número ainda não superou os números de casos de 2019, como demonstrado na figura 2 abaixo (OPAS/OMS, 2023)

Figura 2 - Distribuição dos casos de dengue, Chikungunya e Zika por ano de notificação. Região das Américas, 2008-2023



Fonte: Boletim de atualização epidemiológica da OPAS/OMS de junho 2023 (OPAS, 2023)

No século XVIII, curiosamente há relatos de uma doença febril com características muito similares ao que hoje denomina-se de dengue cujos primeiros surtos acometeram três continentes: África, Ásia e América do Norte (FERREIRA, 2012; GUBLER; CLARK, 1995; PACKARD, 2016; SANYAOLU, 2017) (Ferreira, 2012; Gubler, Clark, 1995; Packard, 2016; Sanyaolu, 2017). Ainda que, desde aquela época, já existisse a ocorrência de casos mais graves, a dengue foi considerada uma doença essencialmente benigna que acometia principalmente aqueles que viajavam para as regiões tropicais.

Com a disseminação da dengue após a 2ª guerra mundial, casos mais graves com sintomas hemorrágicos gradativamente foram emergindo nas regiões das Américas e do oceano Pacífico. Assim, a partir da década de 50, a dengue tornou-se um grande problema de saúde pública no continente americano, principalmente na região central e sul, fazendo-a merecer uma atenção especial da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) que instituiu medidas de prevenção para erradicação do *Aedes aegypti* (mosquito transmissor tanto da dengue quanto da febre amarela nessas regiões) (GUBLER; CLARK, 1995).-

Mesmo com toda essa atenção dispensada pela OPAS na erradicação do mosquito *A. aegypti*, a dengue ainda é uma das doenças virais mais impactantes transmitida por mosquitos. Desde 1995 ela já apresentava uma taxa de mortalidade de aproximadamente 5% (GUBLER; CLARK, 1995). Talvez seja a doença transmitida por mosquito de mais rápida taxa de propagação; haja vista que até 1970 apenas 9 países apresentavam epidemias com casos graves de dengue e, atualmente, a dengue é endêmica em mais de 100 países (FERREIRA, 2012; HOSANGADI, 2019; SANYAOLU, 2017). Por conseguinte, quase metade da população mundial corre o risco de infecção, já que, nos últimos 50 anos, houve, aproximadamente, um aumento de 30 vezes em sua incidência justificando a crescente preocupação mundial com relação a importância dos impactos socioeconômicos que esta doença pode causar (SANYAOLU, 2017).

Anualmente, estima-se que cerca de 400 milhões de indivíduos sejam infectados pelo vírus da dengue (DENV) no mundo, 2 milhões evoluam para forma mais grave e aproximadamente 25 mil pessoas evoluam para o óbito (BHATT *et al.*, 2013; DO CARMO *et al.*, 2020; FERREIRA, 2012; GUZMAN *et al.*, 2016; HOSANGADI, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020; WORLD MOSQUITO PROGRAM, [s. d.]; ZENG *et al.*, 2021). E, para reforçar esta estimativa, os casos de dengue reportados para OMS desde o ano 2000, vêm sofrendo um aumento em torno de 8 vezes e o os óbitos 4 vezes mais do que nas últimas 2 décadas (ZENG *et al.*, 2021).

Entre os anos de 2010 e 2019, o Brasil notificou aproximadamente 10 milhões de casos de dengue, representando mais da metade dos casos notificados em todo o continente americano (DO CARMO *et al.*, 2020). E, segundo a Fiocruz Minas, os anos com registro das maiores epidemias de dengue no Brasil foram 1998, 2002, 2008, 2010 e 2011 (FIOCRUZ MINAS, [s. d.]). Já o ano de 2016 foi caracterizado como um ano de grandes surtos de dengue em todo o mundo, sendo o Brasil o responsável por mais da metade dos casos registrados nas Américas (CAMARA MUNICIPAL DE FORTALEZA, 2022; NACHER *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2021), seguido de dois anos de baixa incidência de casos (2017 e 2018), sendo estes reportados como anos de menor incidência de dengue desde 2005, voltando a aumentar de forma importante em 2019 (KE, 2018; LINDENBACH; RICE, 2003) Vale também ressaltar que a epidemia de COVID de 2020 a 2022, pode ter afetado a transmissão e notificação dos casos de dengue durante esses anos (CODECO *et al.*, 2022)

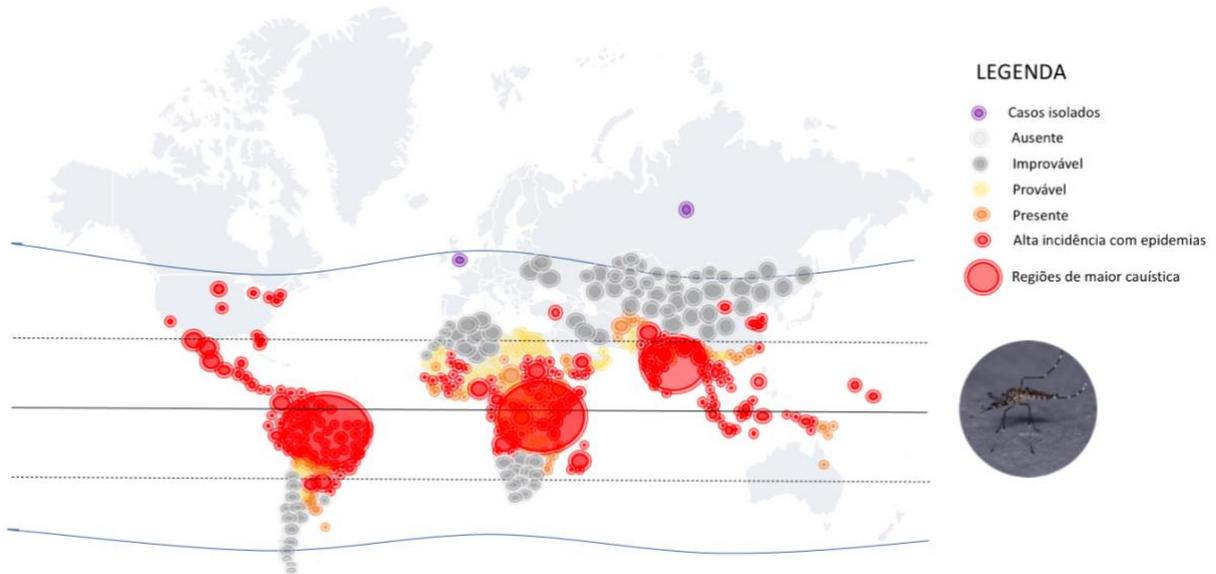
De acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde de setembro de 2019, os casos de dengue no Brasil continuam crescendo e a região Sudeste é a que mostra o maior aumento de casos mesmo com as medidas de combate ao *Aedes aegypti*. Além disso, as

regiões brasileiras do Nordeste (NE) e Sudeste (SE) são as que apresentam um maior registro de casos graves e óbitos por dengue (DE GÓES CAVALCANTI *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Dentre os estados da região nordeste, o Ceará é o que registra anualmente o maior número de casos de dengue notificados (DE GÓES CAVALCANTI *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2013), tendo este, registrado epidemias em 14 anos de uma série de 30 anos (entre 1986 e 2016), sendo que entre os anos de 2011 e 2016 não existiu nenhum ano livre de surtos epidêmicos. Além disso, desde o ano 2000 tem-se registrado números crescentes de óbitos por dengue anualmente. Ou seja, o Ceará vive em um longo período de endemia com surtos epidêmicos da dengue como mostra na figura 4 (DE GÓES CAVALCANTI *et al.*, 2017; INFO DENGUE CEARÁ, 2023; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Durante o período da pandemia de COVID-19, no início do ano de 2021 foi registrada uma queda de 66% de casos de dengue quando comparado com o mesmo período do ano anterior (MONT'ALVERNE, 2021). Este fato deve-se a priorização dos atendimentos para tratamento da COVID-19 e isto pode ter dado uma falsa impressão de que houve uma diminuição dos casos de dengue. Portanto, estes anos da pandemia de COVID-19 (2020 e 2021) foram atípicos e podem não representar a totalidade dos casos de dengue devido a uma subnotificação causada pelo fechamento das unidades de saúde e da restrição do atendimento para casos de COVID-19, além do medo da população de procurar atendimento médico (CAMARA MUNICIPAL DE FORTALEZA, 2022; NACHER *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2021)

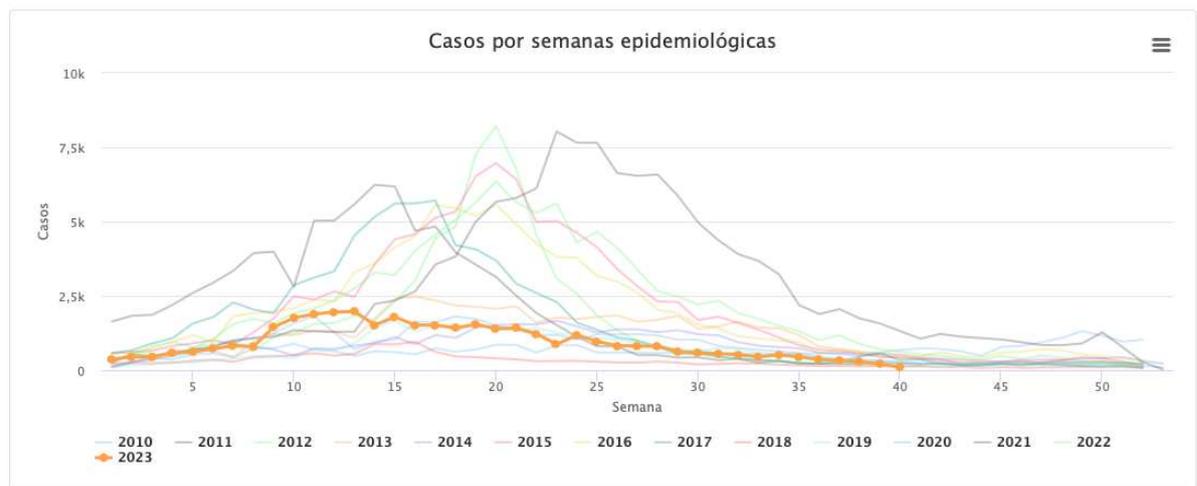
Figura 3 – Panorama epidemiológico da dengue no mundo



Fonte do mapa: Adaptação do Mapa de Saúde da Dengue do CDC referente a 2013;

Fonte da foto do mosquito: Arquivo do fotógrafo Vinicius de Souza

Figura 4 - Situação epidemiológica de casos de dengue no Ceará de 2010 a 2023



Fonte: (INFO DENGUE CEARÁ, 2023)

Além disso, vale ressaltar que desde 2015 outros dois arbovirus, zika vírus (ZIKV) e chikungunya vírus (CHIKV) passaram a circular no estado do Ceará (DE GÓES CAVALCANTI *et al.*, 2017) exigindo, portanto, uma maior atenção para o diagnóstico das arboviroses e sua correta notificação, tratamento e monitoramento.

Com a rápida propagação da dengue e seu crescente aumento em regiões endêmicas, ter um diagnóstico laboratorial precoce é crucial tanto para otimizar o tratamento como também priorizar ações de vigilância dos doentes com maior risco de evoluir para formas mais graves.

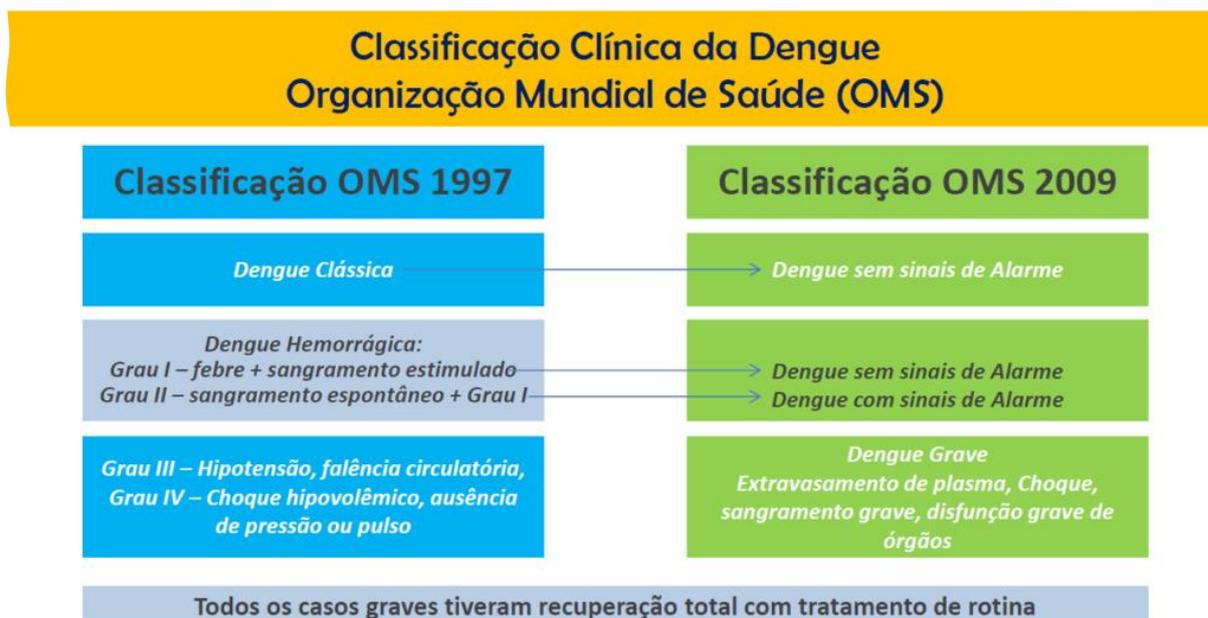
Vacinas contra a dengue vêm sendo desenvolvidas mesmo com a contínua incerteza quanto à otimização de sua utilização devido as características epidemiológicas únicas da dengue (HOSANGADI, 2019). Portanto é fundamental saber o real impacto desta doença para que políticas de saúde pública sejam desenvolvidas visando a minimização de gastos com saúde, utilização de recursos de forma mais eficiente através de medidas de controle do mosquito, tratamento e prevenção da doença (ZENG *et al.*, 2021).

1.2 Manifestações clínicas e classificação da dengue

Embora na maioria das vezes a dengue seja uma doença de curta duração e autolimitada, suas manifestações podem variar desde sintomas muito leves até quadros hemorrágicos mais graves e com repercussão sistêmica (DE AZEREDO; MONTEIRO; DE-OLIVEIRA PINTO, 2015; LEI *et al.*, 2001). Devido a este amplo espectro de apresentação clínica se faz essencial um constante monitoramento; assim, ações poderão ser tomadas antecipadamente para que óbitos sejam minimizados ou até mesmo evitados.

A partir de 2014, foi adotada no Brasil uma nova classificação de dengue (recomendada desde 2009 pela Organização Mundial de Saúde em substituição a anterior de 1997) distribuída entre 3 classes de acordo com sua gravidade: dengue (D), dengue com sinais de alarme (DSA) e dengue grave (DG) (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2016). Já a classificação anterior de 1997, e que foi utilizada no Brasil até 2013, seguia a seguinte categorização: dengue clássica (DC), febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) (HORSTICK *et al.*, 2015). E a partir de 2000 foi acrescentada à classificação de 1997 a categoria dengue com complicações (DCC) que foi utilizada no Brasil como uma classificação intermediária devido à dificuldade de classificação dos casos mais graves e fatais que não preenchiam todos os critérios para FHD (Figura 5) (BARROSO, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 5 – Classificação clínica da dengue de 1997 e 2009 (OMS)



A figura assinala as diferenças e modificações ocorridas entre as classificações dos referidos anos (1997 e 2009). Em 1997, havia a classificação de dengue clássica e hemorrágica e em 2009 essa classificação foi substituída por dengue sem sinais de alarme e dengue com sinais de alarme onde sinais de sangramento espontâneo sem repercussões hemodinâmica, e dengue grave quando os sinais de repercussão hemodinâmica se faziam presentes e antes eram classificados em 1997 como dengue hemorrágica grau III e IV.

Fontes: (GUIDACCI, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

De forma geral, dengue pode cursar com febre elevada e de início abrupto que pode durar de 2 a 7 dias, cefaleia intensa, adinamia, dor retro-ocular, dor muscular e articular, e em alguns casos exantema. Alguns casos de dengue podem evoluir para uma forma mais grave que geralmente tem início entre o 3º e 7º dia, quando começa a ocorrer uma melhora do quadro febril. É nesse período que se faz necessário o monitoramento em busca dos sinais de alerta como dores abdominais intensas, vômitos persistentes, tontura, sangramento de mucosas, irritabilidade, aumento progressivo do hematócrito e hepatomegalia. Caso algum sinal de alerta esteja presente a classificação será de dengue com sinais de alerta (DSA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2016).

Os casos classificados como dengue grave (DG) cursam com trombocitopenia, aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma causando acúmulo de líquidos e sangramentos. À medida que ocorre a intensificação da perda de líquidos ou sangue para o espaço extravascular, aparecem os sinais de disfunção em vários órgãos como pulmão, coração, rins, fígado e sistema nervoso central levando a um estado de choque hipovolêmico podendo ter o óbito como desfecho (CHAKRAVARTI *et al.*, 2006; CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006;

CHEN *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2016; ROTHMAN; ENNIS, 1999). Por isto, é crucial o monitoramento dos sinais de alerta e gravidade da dengue, pois o quadro de choque é de instalação rápida e, em alguns casos, o óbito pode ocorrer em menos de 24h.

Superada essa fase clínica mais crítica da dengue, haverá uma reabsorção do líquido extravasado de forma gradual seguido da melhora clínica progressiva (fase de recuperação). Embora a melhora clínica seja evidente durante a fase de recuperação, ainda se faz necessário o acompanhamento com monitorização débito urinário, controle do hemograma e atenção a alterações no eletrocardiograma para evitar, também, a instalação de complicações relacionadas a uma hiper-hidratação (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2016).

1.3 Agente etiológico

O DENV é um *Flavivirus* esférico envolto por um capsídeo que mede aproximadamente 50 a 70nm de diâmetro(KE, 2018; LINDENBACH; RICE, 2003). Seu genoma é constituído de RNA de fita simples de polaridade positiva, ou seja, contém uma única face aberta de leitura (GUZMAN *et al.*, 2010; PINHO, 2013; STIASNY; HEINZ, 2006). Vírus ssRNA (“*single strand RNA*” ou RNA de fita simples): são também conhecidos como vírus RNA-positivos, porque o RNA do genoma tem a mesma polaridade do mRNA. O genoma destes vírus funciona semelhante ao mRNA e logo que o vírus penetra na célula este se liga ao ribossomo e é traduzido para proteínas. Como todo e qualquer vírus, o DENV não têm metabolismo próprio e por isto precisa das estruturas celulares de outros organismos vivos auxiliando no seu processo de replicação (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

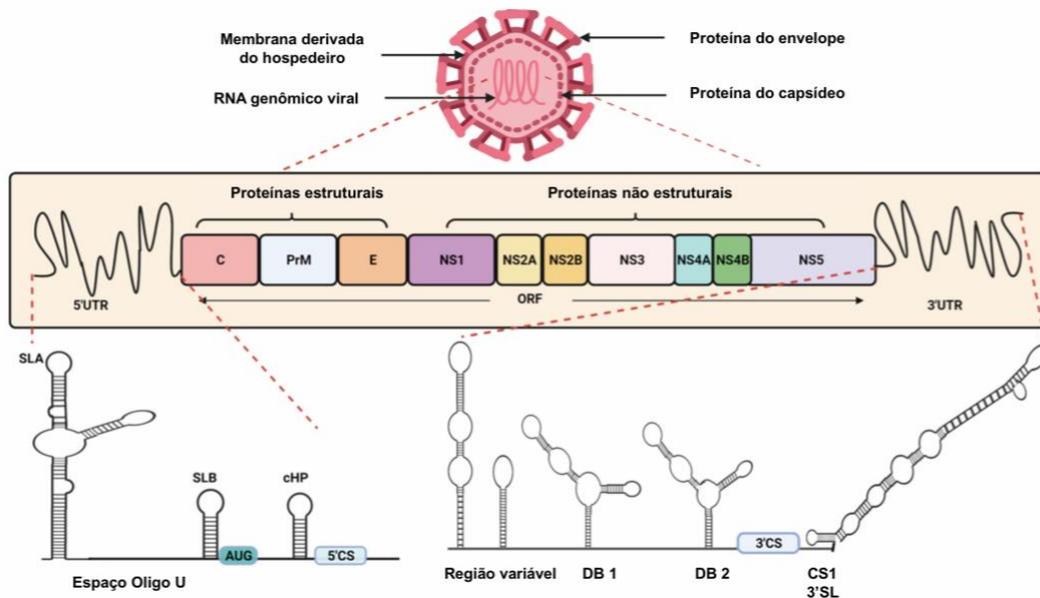
O RNA do DENV é encarregado por codificar 3 proteínas estruturais (capsídeo, precursor de membrana e glicoproteínas do envelope) responsáveis pela estrutura viral e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que são incumbidas de atividades de regulação e expressão viral incluindo a replicação, virulência e patogenicidade (Figura 6). De uma forma geral, as proteínas estruturais, capsídeo (C), precursor de membrana (prM) e envelope (E), são componentes essenciais e presentes nos vírus maduros, enquanto as proteínas não estruturais (NS) são expressas em células infectadas indicando a presença da replicação viral (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; BÄCK; LUNDKVIST, 2013; BRICKS, 2004; DE AZEREDO; MONTEIRO; DE-OLIVEIRA PINTO, 2015; GUZMAN *et al.*, 2010; PATRO *et al.*, 2019; QI; ZHANG; CHI, 2008; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Dentre as três proteínas estruturais do DENV, a glicoproteína E presente na membrana celular do DENV, facilita sua ligação com receptores celulares do hospedeiro. Ela é crucial no processo de infecção, pois é a responsável por facilitar a ligação do vírus da dengue aos receptores celulares do hospedeiro permitindo a fusão das membranas celulares com posterior interiorização do vírus da célula do hospedeiro (BRICKS, 2004; ZHANG *et al.*, 2003).

Além disso, as variações no epítipo da proteína E promovem as diferenças entre os 4 sorotipos do vírus da dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4). Esta diferença entre esses antígenos virais de superfície, determinará a resposta imunológica e proteção contra o DENV no hospedeiro; conferindo, portanto, características antigênicas distintas conforme o sorotipo específico (BRICKS, 2004; LINDENBACH; RICE, 2019; QI; ZHANG; CHI, 2008). A indução da resposta imunológica protetora será específica permanente contra o mesmo sorotipo e cruzada temporária contra os demais sorotipos devidos a algumas similaridades sorotípicas (PEELING *et al.*, 2010; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; ST. JOHN; RATHORE, 2019; WRAMMERT *et al.*, 2012) (PEELING *et al.*, 2010; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; ST. JOHN; RATHORE, 2019; WRAMMERT *et al.*, 2012).

As proteínas não estruturais (NS) exercem um papel crucial na patogênese da dengue por alterarem a produção de proteínas virais que ocorre no retículo endoplasmático do hospedeiro, local onde ocorre a replicação do DENV (TARANTINO *et al.*, 2016; WELSCH *et al.*, 2009). A proteína NS1 indica viremia e pode ser detectada durante fase aguda da doença (primeiros 7 dias de sintomas de dengue) tanto no sangue circulante como na membrana de células infectadas. Nos casos de dengue grave (anteriormente classificados como FHD, DCC e SCD) os níveis de NS1 mostram-se mais elevados do que a dengue clássica (previamente classificado como DC); sugerindo que a NS1 esteja envolvida no processo de maturação viral (GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2008; LEONG *et al.*, 2007; LIBRATY *et al.*, 2002; NIELSEN, 2009). Click or tap here to enter text. A detecção de NS1 não é recomendada após o 7º dia da doença devido a sua baixa sensibilidade e detectabilidade após a fase aguda da dengue. O teste NS1 positivo indica a confirmação de infecção pelo DENV, porém não determina o sorotipo. Testes negativos não descartam infecção e por isto devem ser testados com IgM para dengue para identificar uma possível exposição recente ao vírus (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

Figura 6 – Vírus da dengue e sua estrutura genômica.



Representação esquemática do modelo da estrutura do DENV mostrando as 3 proteínas estruturais: C (Capsídeo), PrM (Pré-Membrana) e E (Envelope) e as 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5); além das regiões não traduzidas representadas pela UTR que possuem a sequência CS1 e SL que desempenham um papel fundamental nas mudanças conformacionais do genoma do DENV facilitando sua replicação..

Fonte modificada: (NANAWARE et al., 2021)

Durante a infecção pelo DENV, além de serem produzidos anticorpos contra a glicoproteína E do envelope, há produção de anticorpos contra NS1 (essa proteína tem um componente solúvel que se liga ao complemento) sugerindo sua coparticipação na patogênese da dengue (DE AZEREDO; MONTEIRO; DE-OLIVEIRA PINTO, 2015; LEONG *et al.*, 2007). Assim, a dosagem de NS1 sérica livre ou ligada a anticorpos poderia ser utilizada para complementar o diagnóstico e, quem sabe, ser utilizada como um biomarcador preditor de gravidade (GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2008; LIBRATY *et al.*, 2002; NIELSEN, 2009).

Diferentemente da NS1, que pode ser secretada ou ficar ligada a superfície da membrana celular, a proteína não estrutural 3 (NS3) é apenas encontrada no citoplasma das células infectadas constituindo um indicativo de replicação viral no interior destas células (BALSITIS *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2000; LEONG *et al.*, 2007; MORAGAS, 2020; NUNES *et al.*, 2016). Fato descrito em literatura, quando células fagocíticas do baço, linfonodos, hepatócitos, células perivasculares cerebrais (BALSITIS *et al.*, 2009), macrófagos alveolares (PÓVOA *et al.*, 2014) e em macrófagos placentários e do cordão umbilical (NUNES

et al., 2016) apresentaram-se marcadas pelo anticorpo anti-NS3 citoplasmático em imunohistoquímica, sugerindo replicação viral no interior destas células.

Além disso, foi demonstrado que entre 20-50% das células de cultura *in vitro* com expressão de NS3 sofreram a apoptose celular induzida pela ação proteolítica desta proteína na via apoptótica das caspases (SHAFEE; ABUBAKAR, 2003). Portanto, a presença de NS3 em células infectadas podem induzir a apoptose através da estimulação excessiva ou aberrante dos linfócitos T citotóxicos (LEI *et al.*, 2001). Portanto, a NS3 é uma protease responsável por clivar o RNA genômico viral após sua tradução pelo DNA do hospedeiro (DA COSTA, 2009)

Por fim, as demais proteínas não estruturais estão envolvidas com o empacotamento do RNA e antagonismo do INF-I (NS2A); servirem de cofator para NS3 na formação do complexo de protease viral (NS2B); inibição da sinalização IFN (NS4A e NS4B) e por fim com a produção de um antagonista para IFN-I (NS5) promovendo o processo de replicação viral (DE AZEREDO; MONTEIRO; DE-OLIVEIRA PINTO, 2015).

Recentemente, trabalhos demonstraram, *in vitro*, que o receptor CCR5 exerce um papel crucial na replicação do DENV em macrófagos humanos uma vez que a expressão deste receptor torna a célula mais resistente a infecção viral. Com isto, há uma redução da carga viral nos órgãos alvo uma vez que diminui a entrada do DENV nas células alvo impedindo sua replicação e, conseqüentemente, a evolução clínica mais grave da doença (CAHILL *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2015). Assim, este receptor pode indicar um avanço no desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para a doença (MARQUES *et al.*, 2015).

Outra atual descoberta relacionada a este receptor CCR5, é que quando sofre a mutação chamada CCR5 Δ 32 há uma piora da evolução clínica das flaviviroses induzindo suas formas mais graves. Esta variante genética impede a expressão do receptor de superfície de membrana CCR5 alterando as respostas inflamatórias pode ele mediadas e que na dengue grave estão exacerbadas. Embora essa mutação seja associada a uma piora da gravidade das arboviroses, não parece demonstrar que aqueles que são portadores desta mutação teriam um risco maior de adquirir a doença (BRESTOVAC *et al.*, 2014; ELLWANGER *et al.*, 2020).

1.4. Replicação viral

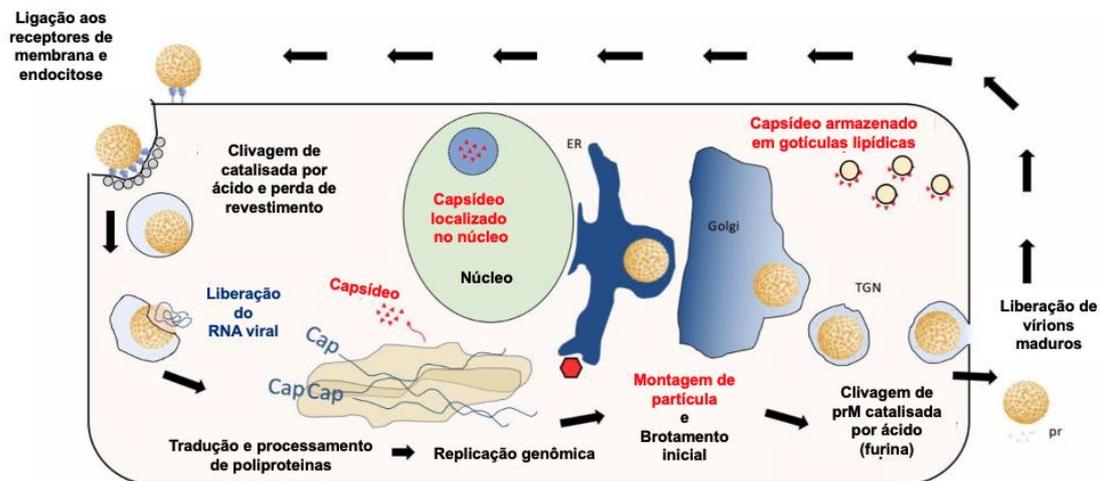
De forma geral, os antígenos do vírus da dengue (DENV) são abundantes durante a fase mais grave da doença e por isto são encontrados não só na circulação sanguínea como também em tecidos e em células infectadas (BALSITIS *et al.*, 2009; MORAGAS, 2020). Esta infecção de células ocorre no momento em que a proteína E do vírion encontra com receptores

da membrana (como o DC-SIGN, lectinas tipo C e receptores de manose) promovendo a fusão do envelope viral com a membrana celular do hospedeiro e, por fim, a endocitose do DENV (DIAMOND; PIERSON, 2015; GANDINI, 2014; LAUGHLIN *et al.*, 2012). Uma vez ocorrendo esta fusão de membranas, o RNA viral é liberado diretamente no citoplasma celular onde será traduzido como uma cadeia poliproteica única e, posteriormente, clivada por proteases virais e do hospedeiro (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; LAUGHLIN *et al.*, 2012; QI; ZHANG; CHI, 2008).

A junção das partículas virais traduzidas ocorre no retículo endoplasmático das células hospedeiras, onde também recebem seu envelope para que sejam posteriormente liberadas por exocitose através do complexo de Golgi (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; LAUGHLIN *et al.*, 2012; QI; ZHANG; CHI, 2008)(DIAMOND; PIERSON, 2015; GANDINI, 2014; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; TARANTINO *et al.*, 2016; WELSCH *et al.*, 2009). As proteínas estruturais (C, E e prM) formarão o vírion e as proteínas não estruturais (NS) serão responsáveis por coordenar a replicação e montagem viral e modulação da resposta imune do hospedeiro (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Dada a importância dessas proteínas não estruturais, Kaptein e seus colaboradores demonstraram que impedir a interação entre as proteínas NS3 e NS4B pode-se causar uma atividade antiviral. Em seu estudo, foi utilizado o JNJ-A07 (um inibidor do DENV) que atua justamente bloqueando a formação do complexo de replicação do DENV em camundongos (KAPTEIN *et al.*, 2021). Tal descoberta associada a importância do estudo da patogênese da dengue e suas células alvo podem resultar em medidas de tratamento precoce da dengue reduzindo a carga viral e o pico da viremia, o que pode minimizar a evolução para a forma mais grave da doença.

Figura 7 – Ciclo de replicação do vírus da dengue.



Representação do ciclo de replicação do DENV após a picada do mosquito *Aedes aegypti* que ocorre primeiramente pela adesão do DENV a membrana do hospedeiro por meio de receptores de membrana, seguido pela entrada do vírus na célula onde ocorrerá a liberação do RNA viral que será traduzido produzindo as proteínas virais com posterior montagem de novos vírions que só serão liberados quando maduros produzindo a viremia e consequente disseminação do vírus por todo o organismo do hospedeiro infectado

Fonte adaptada: (SOTCHEFF; ROUTH, 2020).

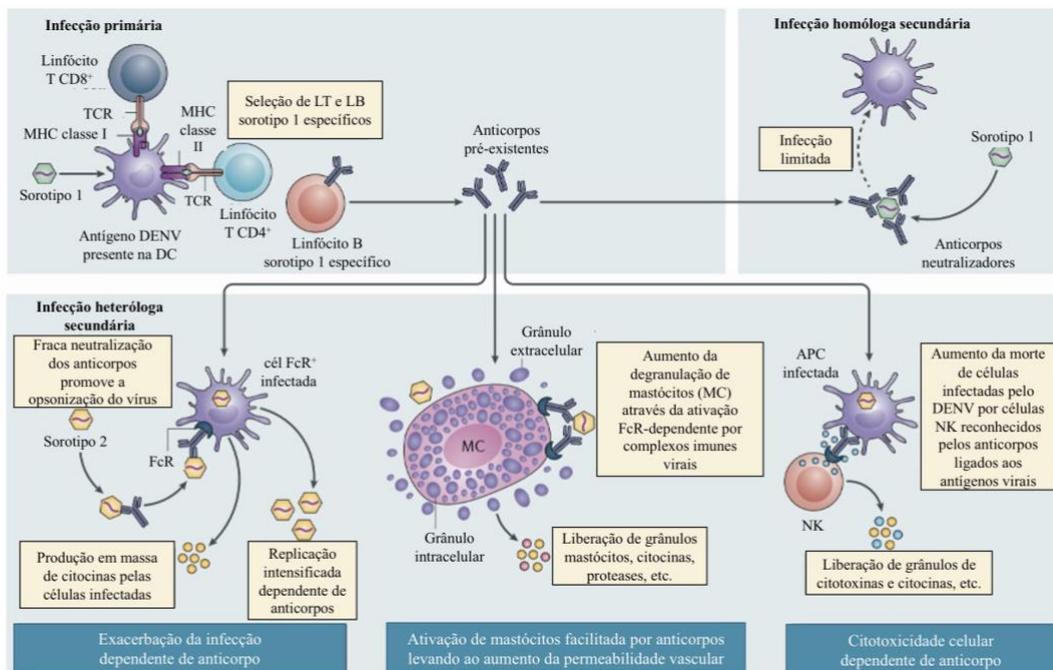
1.5 Resposta Imune

Duas diferentes respostas imunes podem ser deflagradas na dengue (Figura 8): aquela que envolve uma resposta celular direta iniciada pela primeira linha de defesa do organismo, a resposta imune inata; e outra resposta que envolve uma ação indireta com produção de anticorpos, a resposta imune adaptativa. Assim, de uma forma geral, o desaparecimento da doença acontece como uma resposta à atuação efetiva do sistema imune do hospedeiro.

A resposta imune inata, cujo importante papel é conter a dispersão viral, se inicia ainda no local da picada onde estão localizadas as células dendríticas, macrófagos, mastócitos e células de Langerhans (GANDINI, 2014; JESSIE *et al.*, 2004; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; ST. JOHN; RATHORE, 2019). A exposição das células dendríticas ao DENV promoverá sua ativação e maturação, levando a produção de TNF (fator de necrose tumoral) e INF- α (Interferon α). Ao mesmo tempo, a replicação do DENV desencadeará respostas ao INF- α provendo uma rápida degranulação dos mastócitos liberando TNF e retendo

os linfócitos nos linfonodos da pele. Ademais, o aumento do TNF promove uma maior expressão das moléculas de adesão E-selectinas das células endoteliais vasculares aumentando o recrutamento de monócitos para a região da pele, que posteriormente se diferenciarão em células dendríticas (DC) (ST. JOHN; RATHORE, 2019). Essa ativação de novas DC e recrutamento de outras células fagocíticas é de extrema importância por terem um papel de células citotóxicas, cuja característica antiviral é a produção de INF (GANDINI, 2014).

Figura 8 – Resposta imune nas infecções primárias e secundárias da dengue



Representação da resposta primária e secundária da dengue. A resposta primária se dá quando o indivíduo nunca teve contato prévio com o vírus da dengue e o nível de anticorpos se eleva lentamente pois não havia anticorpos pré-existentes. Já na infecção secundária, ela ocorre em indivíduos com infecção aguda por dengue, mas que tiveram uma infecção/exposição prévia ao DENV. Nas infecções secundárias o título de anticorpos se eleva rapidamente atingindo níveis mais altos. Se a infecção secundária for do mesmo tipo sorológico da infecção prévia (homóloga) os anticorpos pré-existentes neutralizarão a nova infecção pelo DENV sendo, portanto, uma infecção autolimitada. No entanto, se a nova infecção pelo DENV for de um sorotipo diferente (heteróloga), haverá uma neutralização parcial do vírus promovendo sua opsonização facilitando sua “fagocitose” com uma replicação intensificada e consequente importante liberação de citocinas pelas células infectadas acarretando uma ativação mastocitária e consequente aumento da permeabilidade vascular. Esta reação exacerbada é chamada de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, que na dengue heteróloga foram fracamente neutralizados e promoveram a maior entrada do DENV nas células do hospedeiro proporcionando sua replicação ao invés de neutralização total.

Fonte adaptada: (ST. JOHN; RATHORE, 2019)

Ainda que o DENV esteja internalizado no citoplasma celular das células infectadas, ele também é passível de ser reconhecido através da apresentação de seus antígenos pelos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que irão ativar mais células fagocíticas (monócitos, macrófagos, DC e células NK) responsáveis por todo o efeito pró-inflamatório acarretando o aparecimento dos sintomas da fase inicial da dengue (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). É justamente nesse período inicial de infecção e atuação da resposta imune inata que ocorre a viremia, por volta do 2º a 7º dia após a infecção; muitas vezes coincide com o início dos primeiros sinais de infecção pelo DENV. Esta fase é classificada como fase febril aguda da doença (FIGUEIREDO, 1999).

A resposta imune adaptativa ocorre após a infecção primária do DENV e tem um papel importante na produção de anticorpos (Ac) através da ativação dos linfócitos B (LB). Estes anticorpos (Ac) produzidos irão se ligar aos antígenos virais (em sua maioria a proteína E) para formar imunocomplexos inativando o vírus totalmente (quando são de mesmo sorotipo) ou parcialmente (quando de sorotipos diferentes) chamada de reação cruzada (GUZMAN; HARRIS, 2015; WRAMMERT *et al.*, 2012).

Durante uma infecção primária, a resposta adaptativa é um pouco mais lenta. Os níveis de anticorpos IgM vão se elevando de forma gradativa tornando-se detectável a partir do 5º dia pós infecção, enquanto a IgG só começa a ser detectada entre o 10º e 15º dia. Já nas infecções secundárias, a IgG de uma infecção pelo DENV anterior encontra-se presente e rapidamente aumenta seus níveis. Por isto, nas infecções secundárias pelo DENV altos títulos de IgG podem ser detectáveis já na fase aguda. No entanto o mesmo não acontece com a IgM que tende a ter níveis mais baixos do que na infecção primária (PEELING *et al.*, 2010).

1.6 Patogenia da dengue

Ainda que haja uma tentativa de explicar os mecanismos da dengue na sua forma grave, sua fisiopatologia ainda permanece desconhecida. Sendo assim, algumas hipóteses para explicar a patogênese dos mecanismos da dengue grave vêm sendo propostas; no entanto esses mecanismos ainda não estão completamente compreendidos (HALSTEAD; COHEN, 2015; LEI *et al.*, 2001; SIMMONS *et al.*, 2012; THEIN *et al.*, 1997; ZUBAIR *et al.*, 2016).

Como clinicamente a dengue tem um amplo espectro de apresentação, o retardo no tratamento ou o tratamento inadequado pode ser letal. Por isso há uma necessidade de um melhor entendimento fisiopatológico da dengue, principalmente no que diz respeito as

apresentações mais graves com sinais e sintomas hemorrágicos (DE AZEREDO; MONTEIRO; DE-OLIVEIRA PINTO, 2015; SERUFO *et al.*, 2000).

Existem algumas teorias que tentam elucidar a evolução da gravidade da dengue como a teoria anticorpo dependente (ADE), a teoria do “Pecado Original”, a do mimetismo molecular, da virulência viral e a da multicausalidade.

Dentre estas teorias propostas para explicar a patogênese da dengue grave, está a teoria da infecção secundária. Essa teoria baseia-se na deflagração de uma reação cruzada entre os diferentes sorotipos do vírus da dengue o que provocaria uma reação exacerbada do sistema imunológico ou citotoxicidade anticorpo dependente (em inglês “*antibody dependent enhancement*” ou ADE) que nada mais é do que um fenômeno de facilitação dos anticorpos da dengue (HALSTEAD, 1982). Apesar de toda essa reação exacerbada, a inativação contra um sorotipo diferente do DENV não ocorre, acarretando num aumento da produção de mediadores inflamatórios que por sua vez aumentará a permeabilidade vascular além de facilitar a entrada do novo sorotipo viral nas células alvos promovendo a indução da replicação viral (PATRO *et al.*, 2019; SIMMONS *et al.*, 2012; TANG; GREWAL; SHRESTA, 2015). Por isto, essa reação cruzada sem uma efetiva neutralização do vírus da dengue e com desencadeamento exacerbado da resposta imune podem aumentar o risco de desenvolvimento de casos graves de dengue (HALSTEAD *et al.*, 2005; SIMMONS *et al.*, 2012; TANG; GREWAL; SHRESTA, 2015).

Já na teoria do pecado original, sugere que células T (CD4+ e CD8+) e citocinas como o TNF estariam envolvidas na evolução para as formas mais graves da dengue por estimularem a liberação de citocinas pró-inflamatórias que atuariam diretamente sobre o endotélio vascular culminando com extravasamento de plasma e hemorragias características das fases mais graves da dengue (ELONG NGONO; SHRESTA, 2018; GRIFONI *et al.*, 2017; GUZMAN; HARRIS, 2015; MENTOR; KURANE, 1997; MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003; TISONCIK *et al.*, 2012).

Na teoria do mimetismo molecular, a gravidade da dengue seria resultado da reação imune do hospedeiro que produziria anticorpos que causariam uma reação cruzada ao plasminogênio (pró-enzima inativa que tem a função de degradar a fibrina e ativar metalproteinases da matriz celular) podendo levar a hemorragia devido ao aumento da destruição plaquetária ou da diminuição de sua produção (plaquetopenia) (ROTHMAN, 2004)

Na teoria da virulência viral relacionada a virulência do sorotipo viral chamada de teoria de Rosen que determina sugere que as formas mais graves da dengue são resultantes de sorotipos mais virulentos. E por fim a teoria da multicausalidade (mais aceita atualmente) que sugere que fatores genéticos do hospedeiro, etnia, expressão de moléculas HLA classe I e II,

nível de resposta imune do hospedeiro, níveis de NS1 elevados, citocinas liberadas e outros podem estar relacionados também com a maior ou menor gravidade da doença devido ao potencial de provocar agressão no endotélio vascular induzindo uma cascata de reações inflamatórias que causam repercussão hemodinâmica e hemorragias e/ou coagulopatias (AVIRUTNAN *et al.*, 1998; BEATTY *et al.*, 2015; CHUANG *et al.*, 2013; GREEN; ROTHMAN, 2006; GUZMÁN *et al.*, 2002; GUZMÁN; KOURI, 2002; MALAVIGE, 2004; MANOKARAN *et al.*, 2015; POLIZEL *et al.*, 2004; SCHNETTLER *et al.*, 2012; SRIKIATKHACHORN; KELLEY, 2014)

Por isto, apesar das várias teorias, considera-se, atualmente, que a ocorrência de casos graves seja multifatorial, incluindo fatores nutricionais e genéticos do hospedeiro, idade, sexo, estado imunológico, sorotipo e genótipo viral infectantes atuem no desenvolvimento do quadro.

Este aumento da permeabilidade das células endoteliais decorrente da liberação de citocinas ou quimiciocinas (resposta inflamatória) provocará um extravasamento de líquido para o extravascular levando a repercussões vasculares que podem culminar no choque hipovolêmico apresentado nas formas graves de dengue (CHAKRAVARTI *et al.*, 2006; CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006; CHEN *et al.*, 2007). Esse mecanismo do aumento da permeabilidade na dengue grave ainda não está totalmente esclarecido. No entanto tem sido identificada uma plaquetopenia associada a níveis mais elevados de VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1) associado com o aumento dos níveis de IL-10 e diminuição de IFN que com sua ação anti-inflamatória predispõe a instauração da FHD contribuindo com a diminuição da resposta imune contra o vírus da dengue (aumento da resposta TH2) (CHEN *et al.*, 2007).

Além da atuação de toda a cascata inflamatória bastante pronunciada na dengue, a lectina C codificada pelo gene CLEC5A (localizado no cromossoma 7 humano) exerce um papel essencial na ativação das células da linhagem mieloide, como os granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, megacariócitos e plaquetas. No trabalho de Chen e seus colaboradores foi demonstrado a existência de uma interação direta entre o receptor CLEC5A e o DENV estimulando e desencadeando a liberação de citocinas pró-inflamatórias embora não proporcione de forma direta na entrada do DENV nas células alvo. Um bloqueio deste receptor pode ser fundamental para uma atenuação da produção das citocinas pró-inflamatórias protegendo os tecidos de um grande extravasamento de plasma e hemorragias aumentando a sobrevivência dos pacientes que desenvolvem a forma mais grave da dengue e, portanto, reduzindo a mortalidade da doença (BAKKER *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2008).

Como o número de plaquetas na dengue grave está geralmente reduzido, a quantidade de IFN produzida por estas células também diminui. Conseqüentemente, há um aumento da carga viral diminuindo a resistência celular à infecção viral de tal modo a facilitar a entrada do DENV nas células alvo, inclusive nos megacariócitos e plaquetas, o que poderia explicar em parte a patogênese dos sintomas hemorrágicos da dengue até o momento não descrita *in vivo* em literatura (BOILARD; FLAMAND, 2019).

Recentemente foi descrito em literatura que o DENV2 é o sorotipo mais prevalente dentre os casos de dengue grave e estão associados com alguns marcadores inflamatórios. Tais marcadores são o interferon-gama (IFN- γ), fator estimulante de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), Interleucina 10 (IL-10) e proteína inflamatória de macrófagos 1 (MIP-1 β) e foram apontados como possíveis biomarcadores de gravidade e de prognóstico da doença em pacientes com dengue. Além disso, os antagonistas desses marcadores inflamatórios poderiam ser utilizados como agentes terapêuticos (PATRO *et al.*, 2019). Ou seja, a utilização das dosagens desses mediadores inflamatórios poderia ser extremamente útil para orientação e otimização terapêutica nos casos de dengue.

Em literatura, tem-se ainda algumas hipóteses direcionadas em explicar os fenômenos hemorrágicos da dengue grave. Entre elas, estão aquelas nas plaquetas dado ao seu envolvimento direto em fenômenos hemorrágicos. Uma destas hipóteses sugere que a diminuição da contagem plaquetária é induzida pela supressão de suas linhagens progenitoras, os megacariócitos, oriundos da medula óssea. Já outra hipótese sugere a existência de anticorpos com tropismo pelas plaquetas provocando sua “marcação” e destruição no sangue periférico (DE AZEREDO; MONTEIRO; DE-OLIVEIRA PINTO, 2015). Ambas as hipóteses, sugerem haver uma diminuição da população plaquetária associado ao processo inflamatório alveolar levando a um possível aumento do número de megacariócitos no interstício pulmonar. Esta produção de plaquetas extramedular seria uma tentativa de compensar a plaquetopenia induzida pela infecção viral pelo DENV (LEFRANÇAIS *et al.*, 2017).

Além disso, as lesões alveolares provocadas pelo DENV nos casos grave estão diretamente relacionadas com os óbitos destes pacientes (ABADIE *et al.*, 2005; HUGHES; BEASLEY, 2017; LIMONTA *et al.*, 2007; ST. JOHN, 2013; WIWANITKIT, 2015).

A explicação para este evento se daria por uma diminuição do número de plaquetas associada a inflamação alveolar aumentando a quantidade de MK no interstício pulmonar e, portanto, uma resposta da produção plaquetária compensatória associada a inflamação alveolar nos quadros de dengue grave. Esta forma de compensar o quadro hemorrágico que se estabelece na dengue grave atribuiria ao pulmão uma atividade hematopoiética, ato este reforçado pela

identificação de megacariócitos e fragmentos celulares semelhantes a plaquetas em alvéolos pulmonares (BASÍLIO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005; PÓVOA *et al.*, 2014).

Ainda que alguns pesquisadores tenham descrito partículas muito semelhantes às do vírus da dengue em células do endotélio pulmonar e macrófagos alveolares e o antígeno viral detectado por imuno-histoquímica (ARAÚJO *et al.*, 2011; JESSIE *et al.*, 2004; LIMONTA *et al.*, 2012; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997; MORAGAS, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2017), até o momento não houve descrição de replicação viral no interior dos megacariócitos. A identificação da replicação do DENV nos MK e em plaquetas poderia explicar a deflagração de um quadro hemorrágico pois MK não seriam capazes de produzir plaquetas suficientes causando maior sangramento. Como também, plaquetas produzidas e infectadas pelo DENV podem apresentar em sua superfície antígenos facilitando a formação imunocomplexos promovendo fenômenos trombóticos. Ambas as situações, hemorrágicas ou trombóticas, agravariam ainda mais os casos de dengue.

Assim, como reforçado por Póvoa e seus colaboradores, ainda persistem lacunas no conhecimento da fisiopatologia da dengue grave (PÓVOA *et al.*, 2014). Portanto, estudos de órgãos e células afetados durante o ciclo desta arbovirose são cruciais para que se traga uma gama maior de informações minimizando as lacunas de conhecimento sobre sua patogênese da dengue.

1.7 Diagnóstico laboratorial

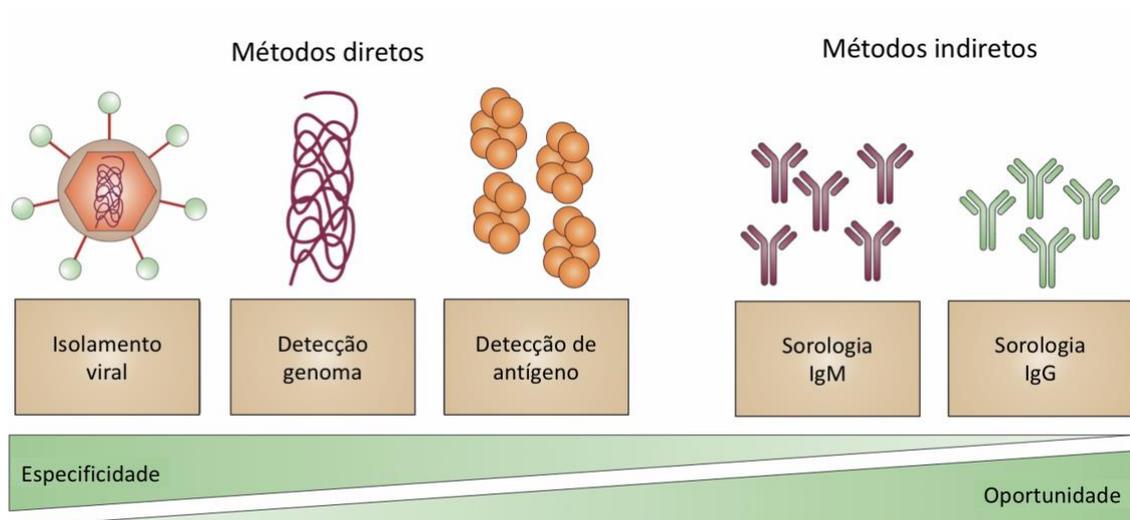
Como a dengue tem um quadro amplo de manifestações clínicas com patogênese não totalmente esclarecida e com grande potencial para uma evolução grave e letal, é crucial que se faça o seu diagnóstico antes que as manifestações clínicas mais graves se estabeleçam. Por isso, devido a dificuldade de identificação clínica, principalmente em estágios mais precoces da doença, e toda essa lacuna de entendimento dos mecanismos patogênicos envolvidos na deflagração da dengue grave, marcadores sorológicos seria de extrema valia pois a dengue tem se mostrado uma doença cada vez mais desafiadora do ponto de vista de saúde pública.

Fazer um diagnóstico precoce é essencial para que haja um monitoramento daqueles casos potencialmente candidatos a evoluírem de forma mais grave e conseqüentemente minimizar as chances de óbito. Ou seja, o diagnóstico laboratorial além de ser crucial para um diagnóstico e monitoramento se faz vital para vigilância epidemiológica com intuito de investigar surtos epidêmicos. Até porque a identificação da doença em estágios iniciais da

doença e antes mesmo que manifestações clínicas de gravidade se estabeleçam pode ser de grande valia para tomadas de decisão no contexto clínico e de vigilância epidemiológica propiciando ferramentas para um melhor realocamento de recursos.

Dentre as possibilidades de diagnóstico laboratorial da infecção viral existe a pesquisa direta com a detecção de componentes virais no soro ou em tecidos e a pesquisa indireta através da dosagem sorológica de anticorpos IgM e IgG (PEELING *et al.*, 2010; SIMMONS *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2021), ilustrado pela figura 9.

Figura 9 – Métodos de detecção laboratorial do vírus da dengue



Fonte adaptada: PEELING *et al.*, 2010

Cada tipo de método possui vantagens e limitações (Tabela 1). Dentre as limitações estão a possibilidade de termos casos falso-positivos devido a contaminação com RNA viral, a necessidade de equipamentos de laboratório caros de laboratório e pessoal treinado. Dentre as vantagens estão a rapidez de alguns métodos em confirmar o diagnóstico, serem fáceis de se fazer e sua grande utilidade para vigilância epidemiológica.

Tabela 1 – Vantagens e limitações dos diferentes testes de diagnóstico de dengue.

Teste de diagnóstico	Vantagens	Limitações
Identificação e Isolamento viral	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmar a infecção • Específico • Identificar sorotipos 	<ul style="list-style-type: none"> • Requer amostra na fase aguda (0-5º dias após início) • Requer experiência e instalações apropriadas • Leva mais de 1 semana • Não diferencia entre infecção primária e secundária • Caro
Deteção RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção confirmada • Sensível e específico • Identifica sorotipo e genótipo • Resultados em 24–48 horas 	<ul style="list-style-type: none"> • Possíveis falsos positivos devido à contaminação • Requer amostra aguda (0-5 dias após o início) • Requer experiência e equipamento laboratorial caro • Não diferencia entre infecção primária e secundária
<i>Deteção do antígeno</i>		
Amostras clínicas (por exemplo, sangue para ensaio com NS1)	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção confirmada • Fácil de executar • Mais barato que isolamento viral ou deteção do RNA 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é tão sensível quanto o isolamento de vírus ou deteção de RNA
Tecidos de casos fatais (por exemplo, para imunohistoquímica)	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção confirmada 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é tão sensível quanto o isolamento de vírus ou deteção de RNA • Requer experiência em patologia
<i>Testes sorológicos</i>		
Soroconversão IgM ou IgG	<ul style="list-style-type: none"> • Infecção confirmada • Mais barato • Fácil de executar 	<ul style="list-style-type: none"> • Os níveis de IgM podem ser baixos em infecções secundárias • A confirmação requer duas ou mais amostras de soro • Pode diferenciar entre infecção primária e secundária*
Deteção de IgM (amostra única)	<ul style="list-style-type: none"> • Identifica prováveis casos de dengue • Útil para vigilância, rastreamento de surtos e monitoramento da eficácia das intervenções 	<ul style="list-style-type: none"> • Os níveis de IgM podem ser baixos em infecções secundárias

*Infecção primária: IgM-positivo e IgG-negativo (se as amostras forem coletadas antes do dia 8–10); infecção secundária: IgG deve ser superior a 1.280 inibição da hemoaglutinação no soro convalescente.

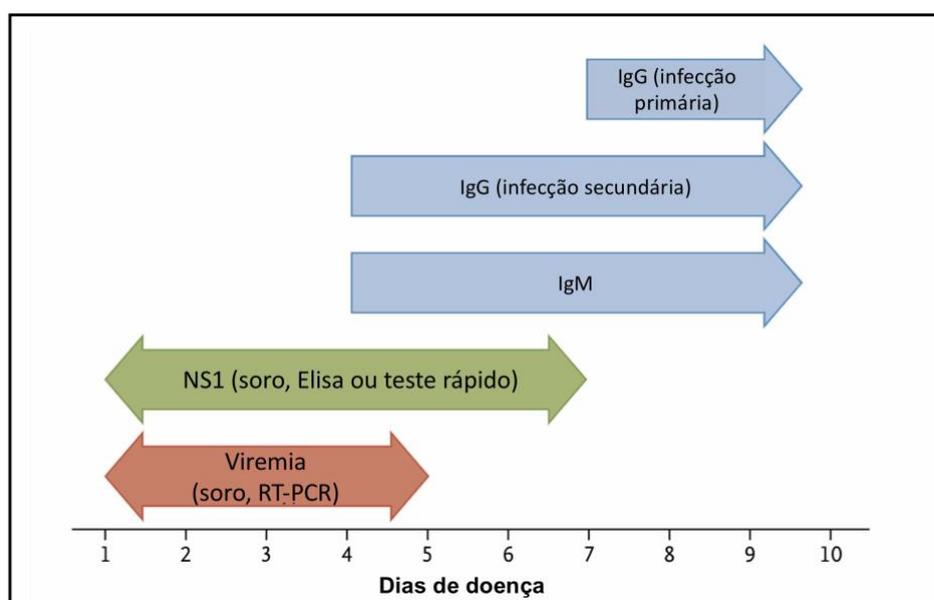
Fonte adaptada: PEELING et al., 2010

A deteção viral direta pode ser através do isolamento viral, isolamento do material genético viral por meio de RT-PCR ou pela deteção de antígenos virais como a proteína não estrutural solúvel 1 expressa pelo vírus (NS1) por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). As grandes vantagens de qualquer um desses métodos diretos é que confirmam a infecção pelo DENV, porém exigem amostras na fase aguda da doença (PEELING *et al.*, 2010; SIMMONS *et al.*, 2012).

Os métodos indiretos, as sorologias, são muito utilizados por serem os mais práticos, mais baratos e excelentes para monitoramento epidemiológico (PEELING *et al.*, 2010). Dentre as sorologias, a IgM já pode ser detectada logo no início da infecção pelo vírus da dengue a partir do 4º dia do início do quadro febril e a IgG é detectável a partir do 7º dia de infecção (PEELING *et al.*, 2010; SIMMONS *et al.*, 2012). Hoje, dificultados pelo acometimento da população que evita procurar serviços médicos nas fases agudas de suas afecções.

A figura 10 mostra um resumo dos métodos diagnósticos e o período de melhor detecção. Uma vez detectado o genoma viral, a proteína não estrutural 1 (NS1) ou demonstrar a soroconversão com IgM pode-se dizer que estes são casos confirmados para dengue. A dosagem de IgM é muito utilizada na para monitoramento epidemiológico e para monitorar e avaliar a eficácia das intervenções para evitar epidemias (PEELING *et al.*, 2010; SIMMONS *et al.*, 2012).

Figura 10 – Opções de diagnóstico laboratorial em pacientes com suspeita de dengue



Fonte adaptado de SIMMONS, 2012

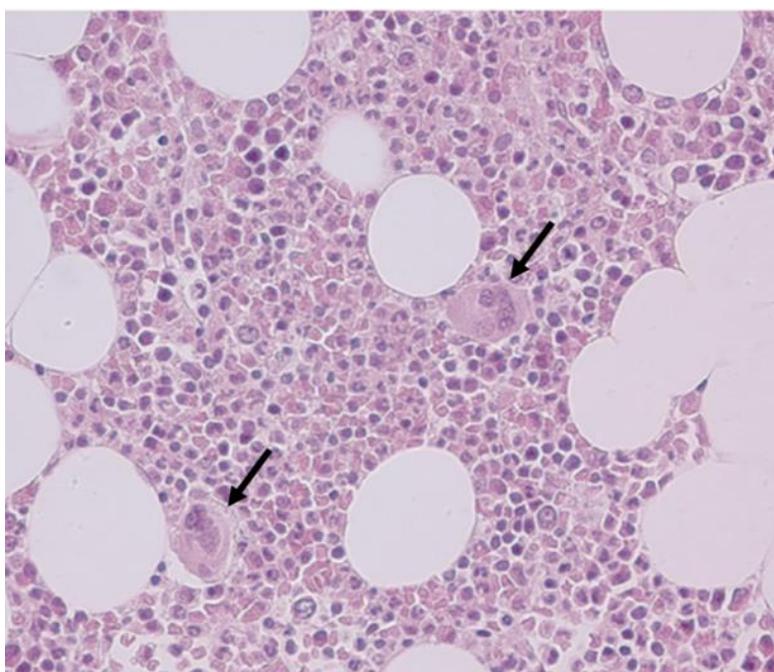
Assim, como os marcadores inflamatórios sugerem gravidade da dengue, a proteína secretada na fase inicial da infecção pelo DENV, a NS1 pode se ligar a anticorpos formando imunocomplexos e conseqüentemente induzir a ativação da cascata do complemento contribuindo para um aumento da permeabilidade vascular nos casos de dengue grave (CHUANG *et al.*, 2013; SRIKIATKHACHORN; KELLEY, 2014). Desta forma, a NS1 se mostra como um fator viral que contribui tanto para o aumento da replicação viral como para evasão da resposta imune. Outra atuação importante da NS1 é que esta proteína não estrutural do DENV se liga a protrombina (fator da coagulação que ao ser ativado converte o fibrinogênio em fibrina e quando associado as plaquetas ajudam a impedir sangramentos) inibindo a sua atuação o que conseqüentemente retarda a formação do tampão plaquetário refletindo no prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativa (TTPA), exame importante de avaliação da coagulação. A vantagem da dosagem de NS1 é que ela já pode ser detectada

precocemente antes mesmo da produção de anticorpos contra o DENV, sendo, portanto, uma proteína da fase aguda da infecção viral pelo DENV (CHUANG *et al.*, 2013).-

1.8 Megacariócitos e plaquetas

Os megacariócitos (MK) são células precursoras da linhagem megacariocítica produtoras das plaquetas (NOETZLI; FRENCH; MACHLUS, 2019). O tamanho destas células varia de 30-100 μm de diâmetro, sendo as formas mais maduras multinucleadas devido as endomitoses tornando capaz de produzir cerca de $10.000/\text{mm}^3$ plaquetas durante seu ciclo de vida (CUNIN; NIGROVIC, 2019; NOETZLI; FRENCH; MACHLUS, 2019; SZALAI; LARUE; WATSON, 2006). De uma forma geral, os megacariócitos são células gigantes polinucleadas de características morfológicas únicas com núcleo avermelhado, irregular, grande de aspecto multilobulado com cromatina densa e sem nucléolos visíveis. Já seu citoplasma é abundante e acidófilo com regiões de grânulos discretamente basófilos, como mostra na figura 11 (PACHECO *et al.*, 2003). É justamente nesta fase de abundância citoplasmática que haverá a produção de plaquetas por meio de fragmentação e seu núcleo será posteriormente metabolizado por macrófagos. Os MKs maduros localizam-se próximos aos sinusóides para liberar as plaquetas direto na corrente sanguínea (SILVEIRA *et al.*, 2011).

Figura 11 – Medula óssea de indivíduo normal com megacariócitos indicados pelas setas.



Medula óssea em indivíduo normal mostrando os aspectos morfológicos dos megacariócitos. MK acidófilos, em formas mais maduras, arredondados, multinucleado e coeso com cromatina densa e

localizados próximos aos sinusóides. Figura mostra megacariócitos normais na medula óssea corados com HE no aumento 1000x.

Fonte adaptada: (Silveira *et al.*, 2011)

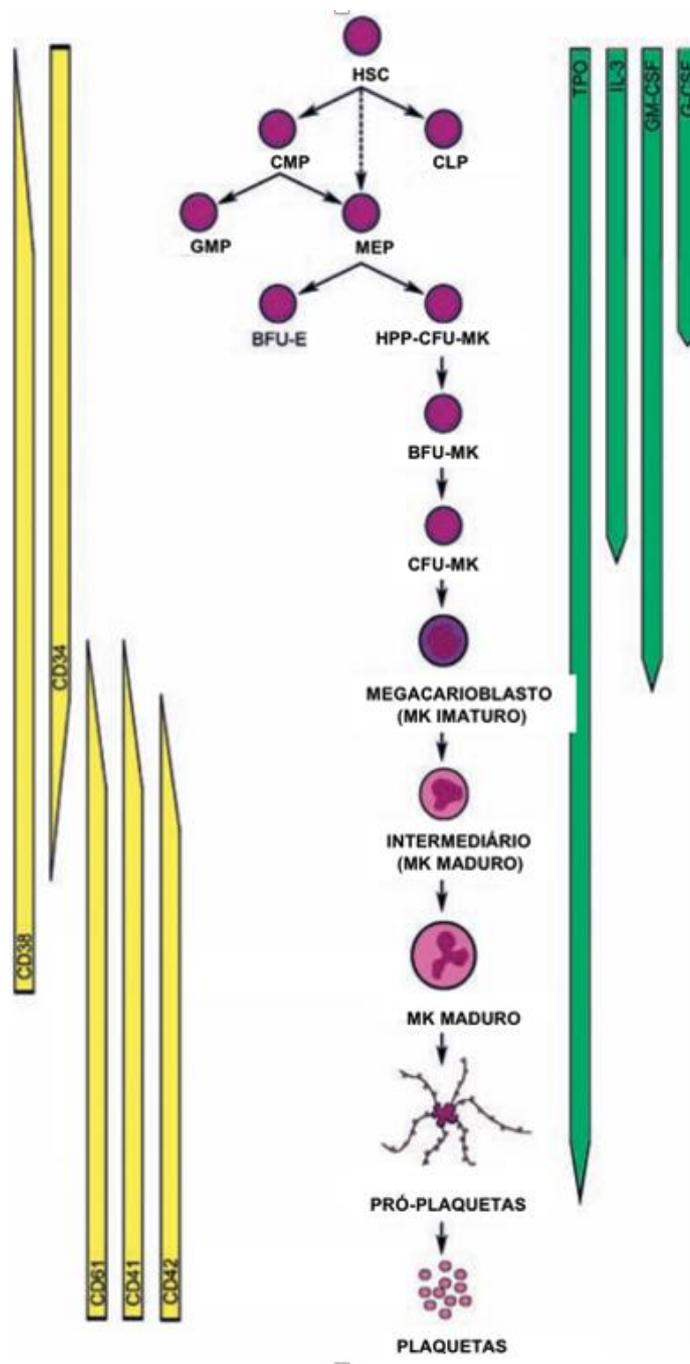
Em um indivíduo normal, os megacariócitos se diferenciam a partir de uma célula progenitora da medula óssea (célula hematopoiética pluripotente) capazes de formar todas as células sanguíneas, dentre elas os MKs (figura 13). A medida em que essa célula pluripotente se diferencia e prolifera o processo de maturação se inicia. Essa multiplicação e diferenciação clonal da linhagem megacariocítica ocorre sob a influência de reguladores, como unidades formadoras de colônias, fatores estimuladores, trombopoietina (hormônio glicoprotéico produzido pelo fígado e rins e exclusivo para estimulação da megacariopoiese) e outras citocinas, resultando na sua maturação. Com a maturação dos megacarioblastos durante a megacariopoiese há também uma mudança na expressão dos seus receptores de membrana como representado na figura 12 (SZALAI; LARUE; WATSON, 2006).

Ao longo desse processo de maturação os megacarioblastos sofrem alterações celulares e moleculares importantes que inclui múltiplas endomitoses sem ocorrer divisão celular (figura 13). Por isto, os megacariócitos são células gigantes e multinucleadas. Ao completar maturação, os megacariócitos passam a ser capazes de produzir as plaquetas que têm uma vida média de 7 dias em humanos e expressam os mesmos marcadores de superfície de membrana específicos de suas células progenitoras, os megacariócitos, representados na figura 12 (CECCHETTI *et al.*, 2011; DEUTSCH; TOMER, 2006; KAUR *et al.*, 2020, 2022; PATEL; HARTWIG; ITALIANO, 2005; SCHULZE; SHIVDASANI, 2004; SZALAI; LARUE; WATSON, 2006).

Alguns autores sugerem que a diferenciação das células da linhagem mielóide em MK ocorra ainda na medula óssea, enquanto outros são liberados na corrente sanguínea ainda imaturos até chegarem nos capilares pulmonares onde completariam sua diferenciação e liberariam as plaquetas. Esta migração e diferenciação no sítio pulmonar sugere que os pulmões sejam o principal sítio extra medular de produção e liberação plaquetária (NOETZLI; FRENCH; MACHLUS, 2019; SZALAI; LARUE; WATSON, 2006; THACHIL, 2009). De acordo com os estudos, os megacarioblastos são liberados na corrente sanguínea para os capilares pulmonares, onde sofrem processos de divisão, endocitose e diferenciação com a liberação das plaquetas, sugerindo que os pulmões participam como um dos principais sítios extra medular de produção e liberação plaquetária (NOETZLI; FRENCH; MACHLUS, 2019; SZALAI; LARUE; WATSON, 2006; THACHIL, 2009). Esse processo tem sido documentado

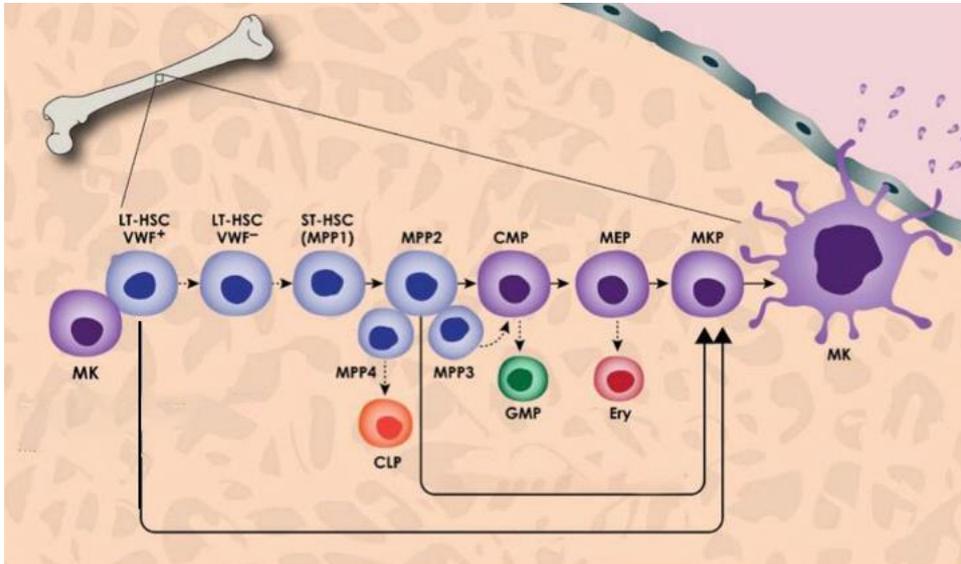
através de metodologias como a imuno-histoquímica utilizando os marcadores CD61, CD41 e CD42 da linhagem megacariocítica, nos precursores megacariocíticos e as plaquetas (produto final dos MK) (SZALAI; LARUE; WATSON, 2006) que são marcadores de superfície mostrados nas figuras 12 e 14.

Figura 12 – Megacariopoiese com marcadores de superfície de cada estágio da diferenciação desde a célula pluripotente até megacariócitos e plaquetas.



Fonte Adaptada: (SZALAI; LAURE; WATSON, 2006)

Figura 13 – Hematopoiese e megacariopoiese na medula óssea

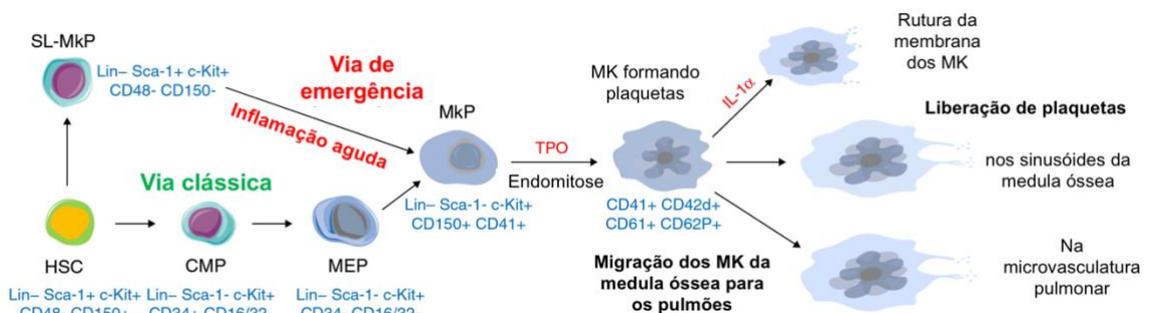


Representação da megacariopoiese na medula óssea e quais tipos celulares precusores são capazes de se diferenciar no megacariócito precursor (MKP).

Fonte Adaptada: (Noetzli; French; Machlus, 2019)

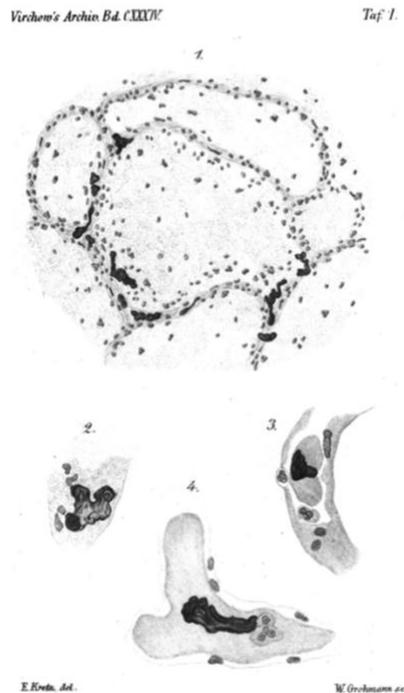
O potencial imune das plaquetas depende diretamente de suas células precursoras, os MK e por isto os megacariócitos originados nos pulmões (extramedulares) originariam plaquetas com maior capacidade de gerar resposta imune. Isto deve-se ao fato dos MKs pulmonares ficarem mais expostos a uma variedade e quantidade maior de patógenos do que aqueles da MO (ambiente mais estéril) (KROUPENOVA; LIVADA; MORRELL, 2022)-

Figura 14 – Ilustração das vias clássica e de emergência da megacariopoiese e migração dos megacariócitos da medula óssea para os pulmões



Fonte: (CUNIN; NIGROVIC, 2019)

Figura 15 – Ilustração de Ludwin Aschoff de 1893 demonstrando células gigantes nos capilares pulmonares (atualmente descritos como megacariócitos pulmonares)



Fonte: (BARCAT, 2017).

A busca por um melhor entendimento do papel dos megacariócitos e seus fragmentos (plaquetas) pode ser crucial na compreensão e dos fenômenos hemorrágicos da dengue grave pois estão envolvidos nos processos de hemostasia e coagulação. Processos esses que podem ser diretamente impactados pela infecção pelo vírus da dengue. Além disto, o megacariócito vem sendo apontado como uma célula com um papel importante junto a resposta do sistema imune contribuindo com a resposta inflamatória em diversos órgãos, dentre eles o pulmão, ocasionando alterações funcionais (BOILARD; FLAMAND, 2019; CUNIN; NIGROVIC, 2019; FRYDMAN *et al.*, 2020, 2019).

As manifestações hemorrágicas que ocorrem na dengue grave estão intrinsecamente relacionadas a função vital das plaquetas: a manutenção da homeostase vascular e prevenção de eventos hemorrágicos. Assim, os sinais de gravidade da dengue têm sido relacionados com uma redução da contagem de plaquetas e outras células do sistema imunológico. Além disso, esta depleção celular é, também, apontada como uma consequência da supressão da medula óssea causada pela infecção viral (VOGT *et al.*, 2019).

Como os megacariócitos são produtores das plaquetas, a identificação *in vivo* da infecção e replicação do vírus da dengue poderia explicar a queda da contagem plaquetária bem como funcionalidade inadequada em pacientes com dengue. No entanto, até o momento, só foi identificado *in vitro* e em modelos animais que o DENV é capaz de infectar megacariócitos, e consequentemente também as plaquetas (BOILARD; FLAMAND, 2019; VOGT *et al.*, 2019). Alguns estudos têm postulado que a elucidação dos mecanismos da infecção do MK pelo DENV pode contribuir principalmente na contenção das manifestações hemorrágicas da dengue que são potencialmente fatais (BOILARD; FLAMAND, 2019; VOGT *et al.*, 2019). Destaca-se ainda outro aspecto relevante, uma vez infectados os MK, seus produtos, as plaquetas, também apresentarão condições propícias para que a replicação viral ocorra. Tal fato é reforçado pelo indício de que as plaquetas possuem todo o maquinário necessário para proporcionar a replicação do DENV (PRYZDIAL; SUTHERLAND; SIMON, 2017; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015).

Noisakran *et al.*, identificaram no seu estudo *in vitro* que há um declínio transitório da celularidade da medula óssea (MO) no início da infecção pelo vírus da dengue, e começa a gradualmente retornar aos níveis normais a partir da 2ª semana pós-infecção. Ainda apontou que as CD61+ que mais tiveram marcação positiva para antígenos do DENV demonstrando uma infecção da linhagem megacariocítica, além de antígenos virais do dengue terem sido identificados nas plaquetas. Estas por sua vez possuíam o vírus com suas características de infectividade quando adicionado sangue de primatas não humanos há culturas de células (NOISAKRAN *et al.*, 2012b).

Clark e colaboradores (2016) demonstram a replicação do DENV em megacariócitos *in vitro*, através do aumento da contagem de células marcadas com CD61+ (marcador para megacariócitos) em pacientes com altos títulos de vírus da dengue (DENV) no sangue circulante. Tal observação, embora que *in vitro*, sugere que o DENV seja capaz de replicar em megacariócitos e plaquetas (CLARK *et al.*, 2016).

Uma explicação para os fenômenos hemorrágicos da dengue seria uma disfunção das plaquetas decorrente da infecção direta dos megacariócitos pelo DENV (CLARK, 2016). Embora recentemente tenha sido descrito a presença *in vitro* do DENV em megacariócitos, até o momento ainda não foi possível a demonstração da infecção e replicação do DENV em megacariócitos *in vivo*.

Uma vez havendo a demonstração dos MK como células alvo e participantes do ciclo do DENV, isto poderia reforçar o papel destas células na deflagração de uma resposta imunológica na dengue. Infelizmente, o papel dos MK no sistema imunológico ainda não está

totalmente definido embora tenha sido observado que, diante de estímulos patogênicos, os MK liberam plaquetas em casos de sepse, podendo inclusive liberar redes que contém material genético de forma semelhante as NETs dos neutrófilos (FRYDMAN *et al.*, 2019).

Isto é corroborado pelo aumento da população dos megacariócitos no sangue periférico dos pacientes sépticos (FRYDMAN *et al.*, 2020). Como a dengue grave é considerada um quadro séptico, a observação do aumento desta população celular poderia ajudar a compreender melhor o papel dos megacariócitos na patogênese do quadro hemorrágico da dengue.

Outros estudos mostram ainda que os megacariócitos permitem que outras células da linhagem hematopoiética transitem pelo interior de seu citoplasma havendo a possibilidade de troca de material, principalmente entre MK e neutrófilos (CUNIN; NIGROVIC, 2019; THACHIL; LISMAN, 2020). Essa comunicação entre células do sistema imunológico pode indicar que os megacariócitos possam também funcionar como células apresentadoras de antígenos com intuito de deflagrar uma resposta contra o agente invasor. Assim, além da possibilidade de contribuir para a replicação viral, as plaquetas e os megacariócitos contribuiriam com tentativa de remoção do vírus da dengue através da estimulação da resposta imune inata como a apresentação de antígenos e liberação de citocinas, além de promover uma resposta inflamatória (PRYZDIAL; LIN; SUTHERLAND, 2017).

Como uma célula de linhagem hematopoiética, os megacariócitos são produzidos e é iniciado seu processo de diferenciação na medula óssea. No entanto, já há algumas décadas descreve-se que os megacariócitos (MK) são encontrados de forma frequente nos capilares alveolares onde uma parte das plaquetas são liberadas na corrente sanguínea (KAUFMAN, R. *et al.*, 1965; KAUFMAN, R. M. *et al.*, 1965; LEVINE *et al.*, 1990).

Embora as plaquetas sejam facilmente encontradas na corrente sanguínea, o mesmo não ocorre com suas células progenitoras, os megacariócitos, que ficam, em sua maioria, sequestradas nos pulmões (HOWELL; DONAHUE, 1937). Assim, os megacariócitos estariam estrategicamente posicionados no sítio pulmonar, pois os capilares alveolares são expostos a uma grande variedade de patógenos, proteínas e mediadores inflamatórias liberadas pelo fígado na corrente sanguínea. Ou seja, os megacariócitos poderiam transferir material genético e se comunicar com outras células do sistema imune (processo chamado de emperipolese), liberar citocinas, ativar outras células do sistema imune e células endoteliais (CUNIN; NIGROVIC, 2019; PRYZDIAL; LIN; SUTHERLAND, 2017; THACHIL; LISMAN, 2020).

Sem dúvida, os megacariócitos formam uma classe peculiar de células e que não possuem uma função específica. Curiosamente, em 1890, pensou-se que estas células eram

oriundas de pequenas células linfóides que se multiplicavam tornando-se multinucleadas ou até mesmo oriundas da fusão atípica de linfócitos, leucócitos e osteoblastos, além de serem capazes de secretar materiais, hoje conhecidos como plaquetas (HOWELL, 1890).

Atualmente essa fusão atípica do passado pode ser o fenômeno recentemente descrito como engolfamento de outras células hematopoiéticas, principalmente neutrófilos (CUNIN *et al.*, 2019; CUNIN; NIGROVIC, 2019).

Os poucos megacariócitos encontrados no sangue circulante possuem um citoplasma escasso, mostrando-se como células menores podendo ser até confundidas com linfócitos, reforçando a hipótese de que teriam sido liberados na corrente sanguínea ainda imaturos. Assim, os MK, que teriam a habilidade de atravessar o endotélio na medula óssea aonde são originados, permaneceriam intactos e se dirigiriam até os capilares pulmonares onde seriam sequestrados e entrariam em contato com uma gama maior de patógenos e substâncias provenientes do meio externo (CUNIN; NIGROVIC, 2019; KAUFMAN, R. *et al.*, 1965)

Com relação à quantidade de plaquetas, esta contagem tende a se manter constante em condições fisiológicas. Estima-se que um único megacariócito produza em média 3.000-10.000 plaquetas com vida média de até 10 dias (KAUFMAN, R. *et al.*, 1965).

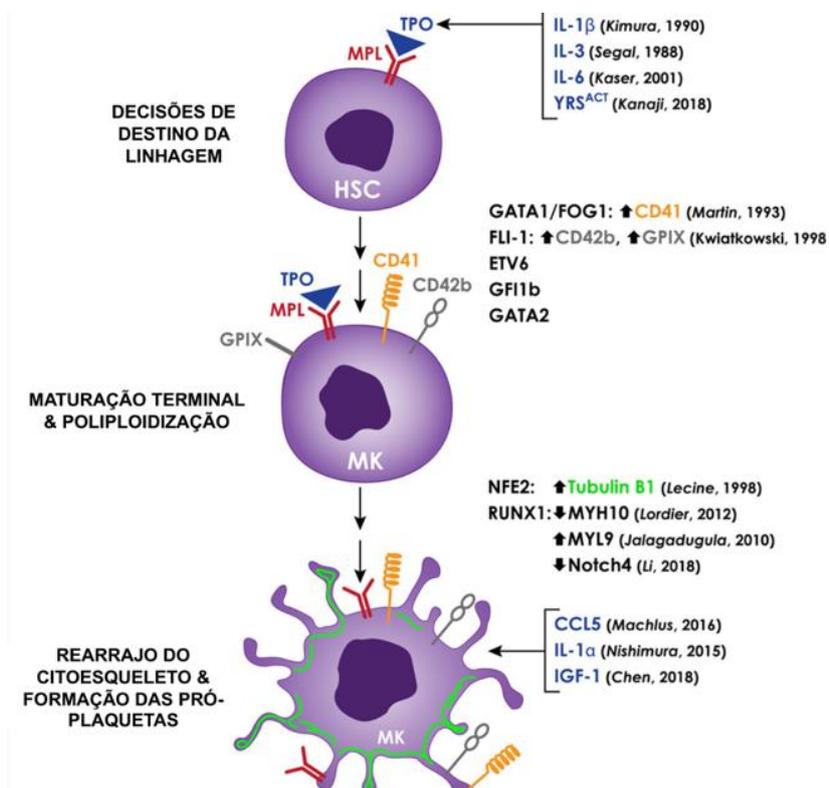
Os MK são células com tamanho de até dez vezes maior que um linfócito, o que dificulta sua passagem pelos capilares pulmonares o que indica que estas células ficam, em sua maioria, sequestradas nos pulmões e liberam as plaquetas diretamente na corrente sanguínea. Assim os megacariócitos estariam estrategicamente posicionados nos pulmões pois é um órgão que entra em contato diariamente com uma grande variedade de patógenos externos, além de proteínas e mediadores inflamatórias liberadas pelo fígado na corrente sanguínea.

Na presença de infecções, onde há um certo estímulo da megacariocitopoiese, pode haver um aumento da população pulmonar de megacariócitos (KAUFMAN, R. M. *et al.*, 1965). Kaufman *et al.*, em seus estudos datados de meados do século XX relatavam que os MK não eram produzidos nos pulmões, mas sim carregados até o leito capilar alveolar através da circulação venosa onde maturavam e liberavam na corrente sanguínea seus fragmentos celulares que hoje chamamos de plaquetas (KAUFMAN, R. *et al.*, 1965; KAUFMAN, R. M. *et al.*, 1965; SHARMA; TALBOT, 1986; TROWBRIDGE; SLATER; MARTIN, 1987). Isso pode ser confirmado em achados de necropsia, quando o número da população de megacariócitos mostra-se aumentado em casos de doenças, pois são levados até os pulmões que funcionam como “filtros” reduzindo assim a quantidade desta população celular no sangue periférico (SHARMA; TALBOT, 1986; TROWBRIDGE; SLATER; MARTIN, 1987).

Há ainda um aumento da população de megacariócitos pulmonares em pacientes com algumas infecções agudas, hemorragias, estados de choque e doenças pulmonares devido a consumptiva (SHARMA; TALBOT, 1986). O aumento da população megacariocítica pode ser observada nos casos de dengue grave, onde manifestações hemorrágicas com diminuição importante da volemia acontecem, podendo estar ou não associado a outras doenças pulmonares como pneumonite, broncopneumonia, edema e hemorragia pulmonares (BARROSO, 2017; BRAGA, 2014; PÓVOA *et al.*, 2014).

Além disso, foi demonstrado que a replicação viral excessiva dentro das células alvo leva a um aumento do estresse oxidativo (acumulação de ROS) e conseqüentemente pode levar a apoptose destas células. No entanto, Kaur e seus colaboradores observaram que os megacariócitos diferenciados e infectados pelo DENV mostravam uma redução dos níveis desses ROS devido à ativação do fator de transcrição NFE2L2 promovendo, portanto, a replicação viral pois parece interferir no processo de diferenciação e maturação dos megacariócitos (KAUR *et al.*, 2022). A figura 16 mostra os principais fatores de transcrição e citocinas envolvidas no processo de maturação da linhagem megacariocítica e a figura 17 o potencial inflamatório e função dos megacariócitos e plaquetas.

Figura 16 – Citocinas e fatores de transcrição presentes na megacariopoiese



Fonte: adaptada de (NOETZLI; FRENCH; MACHLUS, 2019)

Como até o momento nada foi descrito relação ao papel dos megacariócitos e/ou plaquetas na replicação viral da dengue, o presente estudo buscou identificar a presença aumentada de megacariócitos e identificar a replicação do DENV em megacariócitos do tecido pulmonar in vivo. Assim, poderemos contribuir ampliando o rol de células infectadas pelo DENV, bem como trazer mais informações que possam contribuir para desvendar os mecanismos fisiopatológicos da dengue grave e da plaquetopenia associada nestes casos.

Figura 17 – Mecanismos efetores e resposta imune dos megacariócitos como células importantes nas repostas imunológicas.



Fonte adaptada: (CUNIN; NIGROVIC, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

A dengue é uma doença que tem reemergido como um grande desafio para saúde pública mundial e os casos de maior gravidade vêm aumentando em incidência, portanto entender o mecanismo de infecção e recuperação das plaquetas para dar subsídio ao desenvolvimento de terapias que contenham essas manifestações mais graves da doença é de fundamental importância. O estudo das células progenitoras das plaquetas, os megacariócitos, e sua possível infecção com replicação pelo DENV pode contribuir com a elucidação de um provável mecanismo envolvido na plaquetopenia da dengue, bem como na evolução para casos de maior gravidade. Assim o presente trabalho poderá contribuir demonstrando a infecção pelo DENV nos megacariócitos pulmonares e poderá ajudar a desvendar outros mecanismos fisiopatológicos além de dar suporte ao desenvolvimento de tratamentos específicos que tenham como alvo a proteção dos megacariócitos contra a infecção do vírus da dengue e conseqüentemente das plaquetas, além de manter a produção destas e minimizar os riscos de sangramentos e/ou trombozes. Bem como identificar megacariócitos pulmonares marcados com NS3 indicando infecção destas células pelo vírus da dengue.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliação dos megacariócitos pulmonares e sua relação com a clínica, a anatomopatologia e histopatologia dos casos fatais por dengue. .

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a morfologia dos megacariócitos dos casos fatais por dengue frente aos casos controles
- Correlacionar as manifestações hemorrágicas (clínica e anatomopatológica) com os níveis de plaquetas e a população dos megacariócitos pulmonares dos casos fatais por dengue;
- Comparar sinais anatomopatológicos de trombose com os níveis de plaquetas e a população dos megacariócitos pulmonares dos casos fatais por dengue;
- Identificar a presença de NS3 em megacariócitos do tecido pulmonar como indício indireto de replicação do DENV em pacientes com dengue grave e fatal.

4. MATERAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi realizado perante aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer de nº 4.144.913 e CAAE com nº 34438320.8.0000.5054 (Anexo A), e seguiu as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos estabelecidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS (BRASIL, 2012) e respeitou os princípios fundamentais de autonomia, beneficência, justiça e equidade.

4.2. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo descritivo do tipo observacional transversal, qualitativo, quantitativo e analítico a partir de uma amostra de 126 pacientes que foram a óbito com diagnóstico clínico e laboratorial de dengue. Todos os casos tiveram o diagnóstico laboratorial de dengue refeito e confirmado pelo SVO-CE. Para isto, foram colhidas informações epidemiológicas e materiais biológicos (sangue, líquido e amostras teciduais) pelo SVO-CE e LACEN-CE para o devido diagnóstico e confirmação da causa das mortes. Após esta investigação, todos os 126 casos foram classificados como mortes por dengue de acordo com os critérios de vigilância epidemiológica durante este período de epidemia de dengue no estado do Ceará de 2011 a 2013. Além disso, todos esses 126 casos de dengue fatal foram autopsiados e os resultados foram também analisados pelo Comitê de Investigação de Óbitos por Arboviroses do SVO-CE.

Foram incluídos no trinta e quatro (34) pacientes adultos que evoluíram para o óbito durante o período de janeiro/2011 a dezembro/2013 (período de epidemia de dengue), no Estado do Ceará – Brasil e todos possuíam o diagnóstico confirmado de dengue devidamente notificados ao Núcleo de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de saúde do Estado do Ceará (SESA-CE).

Inicialmente foram analisados os atestados de óbito dos pacientes adultos submetidos a autópsias completas no Serviço de Verificação de Óbitos da Secretaria de Saúde

do Ceará, com diagnóstico de febre hemorrágica da dengue e dengue com complicação (nomenclatura utilizada no período de 2011 a 2013 e atualmente classificados como dengue grave), cuja confirmação diagnóstica laboratorial foi efetuada pelo Laboratório Central (LACEN-CE), através de imunohistoquímica, pesquisa NS1, pesquisa IgM sérica, RT-PCR e/ou isolamento viral a partir de amostras biológicas de sangue, líquido, efusões e tecidos coletadas pelo SVO-CE durante as autópsias.

A amostras estudadas se referem a casos de óbitos de dengue fatal hemorrágica no período de janeiro/2011 a dezembro/2013, no Estado do Ceará – Brasil.

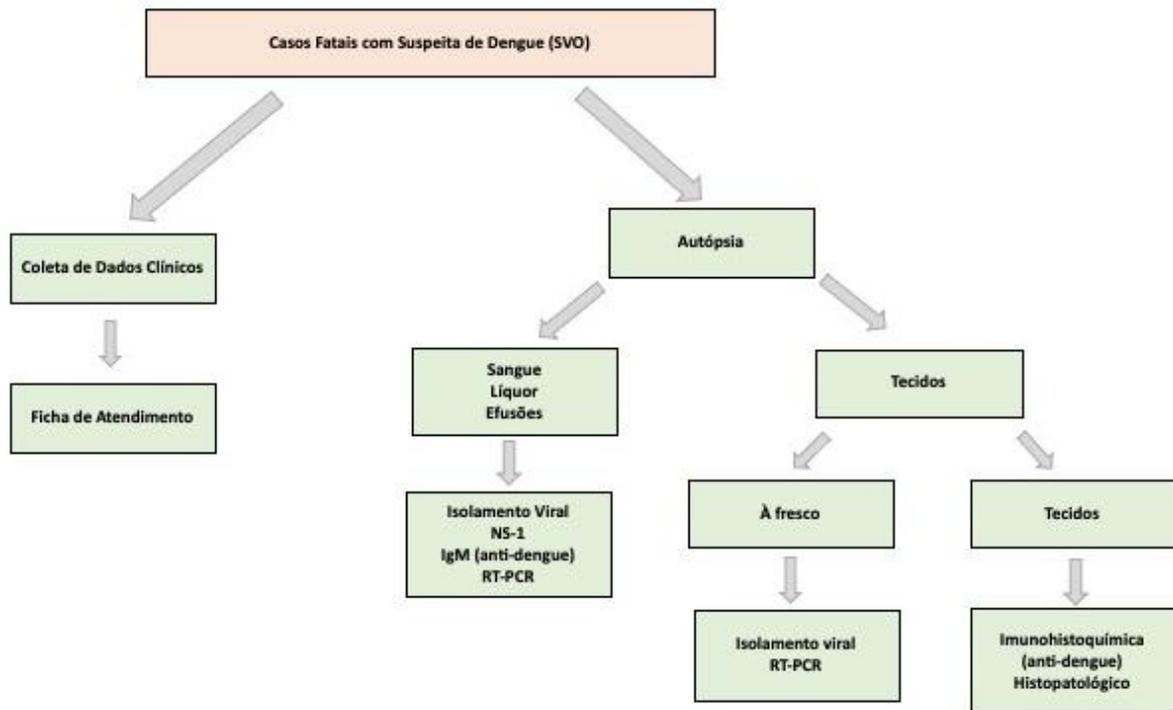
Foram coletadas 32 amostras para controle de tecido pulmonar humano normal de adultos que foram a óbito por morte súbita sem comprometimento pulmonar e sem diagnóstico de dengue ou outra arbovirose.

Após a seleção dos pacientes adultos, que fariam parte do estudo, foram solicitados ao SVO-CE os blocos de parafina com tecido pulmonar para que fossem feito estudo histopatológico com as lâminas coradas com hematoxilina-eosina para identificação dos megacariócitos e plaquetas, bem como a realização de marcação pela imunohistoquímica com anticorpo anti-CD61 (para confirmação e quantificação de megacariócitos) e anticorpo anti-NS3 (para identificação de replicação viral em megacariócitos pulmonares).

Os dados de identificação, clínicos e anatomopatológicos foram obtidos através da revisão dos prontuários e fichas de atendimentos fornecidas pelo SVOCE.

Com relação à confirmação do diagnóstico laboratorial de dengue (Figura 18), segue-se o fluxograma do SVO-CE de casos suspeitos de dengue no período de 2011 a 2013 e está representado na figura abaixo.

Figura 18 – Esquema do fluxograma da sequência da obtenção das amostras para confirmação do diagnóstico dos casos suspeitos de dengue no SVO-CE durante o período de 2011 a 2013



Fonte: (BRAGA, 2014).

4.3. Critérios de inclusão

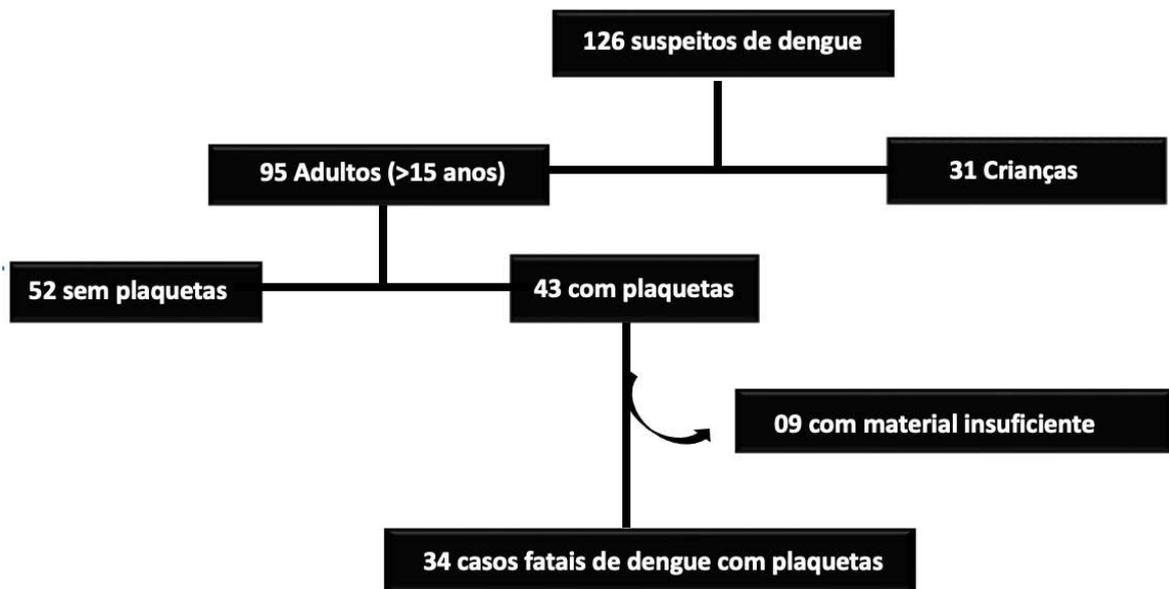
- Grupo Dengue: Adultos (>18 anos) com diagnóstico clínico e laboratorial de dengue confirmados e devidamente notificados ao Núcleo de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do estado do Ceará. (Figura 19).
- Grupo Controle: pacientes adultos (>18 anos) que foram a óbito por morte súbita sem comprometimento pulmonar e sem diagnóstico de dengue ou outra arbovirose.

4.4. Critérios de exclusão

- Ausência de dados (hemograma ou contagem de plaquetas) ou material insuficiente para análise (blocos de parafina com tecido pulmonar)

Dos 126, utilizamos 34 casos fatais por dengue pois eram casos de pacientes adultos com exame de contagem de plaquetas realizado em até 24h antes do óbito e que tinham material suficiente para análise (confeção de blocos e lâminas de TMA para coloração e imuno-histoquímica) (Figura 19).

Figura 19 – Esquema do fluxograma da coleta de amostras de tecido pulmonar deste estudo em casos confirmados de dengue em adultos do SVO-CE no período de 2011 a 2013



Fonte: Elaborado pelo autor

Foi instituído um grupo um grupo controle com 32 pacientes que foram a óbito por morte súbita (em geral por acidentes vasculares cerebrais, infarto agudo do miocárdio fulminante, hemorragia gastrointestinal aguda ou arritmia cardíaca) e com autópsia também realizada pelo SVO-CE. Foram excluídos casos com sorologia positiva para outra arbovirose, doenças crônicas como câncer, diabetes, HIV, autoimunes, doenças pulmonares (infecciosas ou não) por gerarem um estado inflamatório pois poderiam influenciar na representatividade da população de megacariócitos em um indivíduo normal.

4.5. Microarranjo de tecido pulmonar (*tissue microarray* ou TMA)

Microarranjo de DNA ou chip de DNA é composta por um conjunto de pontos (*spots*) em um bloco de parafina preenchidos com o tecido a ser estudado, no caso pulmão, contendo sondas para determinadas moléculas alvo. Esta tecnologia de *microarray* permite investigar centenas ou milhares de genes em uma amostra através de uma reação de hibridização.

O protocolo utilizado pelo laboratório foi constituído por 7 linhas e 10 colunas sendo os 2 primeiros spots do bloco são de tecido renal de rato para facilitar a leitura sequencial dos casos. O bloco de dengue contém 34 casos e o controle 32 casos. (Figura 20)

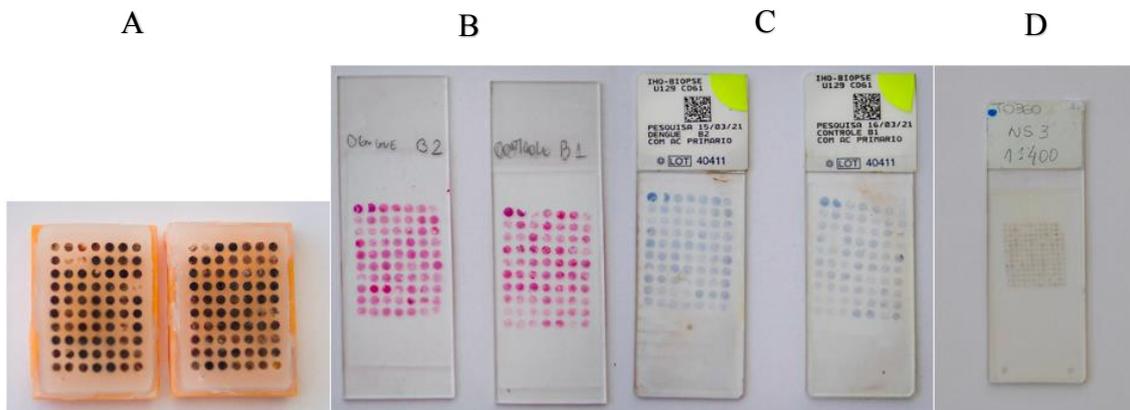
Foram utilizados microarranjos de tecidos pulmonares (TMA) (Figura 21) para quantificação da imunexpressão do biomarcador CD61 foi realizado no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). O tecido pulmonar foi inicialmente visualizado no HE para avaliar a presença de MK e sua morfologia, no entanto, a escolha dos spots foi aleatória nos blocos de parafina.

Figura 20 – Protocolo com o planejamento do bloco dos casos de dengue com as microsessões (*spots*) dos 34 casos distribuídos em 10 colunas e 7 linhas de TMA

Bloco de TMA - DENGUE										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	RIM	RIM	0328/11	0328/11	0855/11	0855/11	0897/11	0897/11	1194/11	1194/11
2	1371/11	1371/11	1374/11	1374/11	1637/11	1637/11	1764/11	1764/11	2162/11	2162/11
3	2356/11	2356/11	5244/11	5244/11	0407/12	0407/12	0555/12	0555/12	0684/12	0684/12
4	0704/12	0704/12	0846/12	0846/12	0943/12	0943/12	1149/12	1149/12	1169/12	1169/12
5	1338/12	1338/12	1584/12	1584/12	1863/12	1863/12	1978/12	1978/12	2117/12	2117/12
6	2739/12	2739/12	2902/12	2902/12	3406/12	3406/12	3447/12	3447/12	1544/13	1544/13
7	1844/13	1844/13	2064/13	2064/13	4703/13	4703/13	2756/13	2756/13	5165/13	5165/13

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Blocos e lâminas do estudo.



2 Blocos (A) e 2 lâminas de HE confeccionadas no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) (B) 5 lâminas com marcação com anticorpo anti-CD61 confeccionadas no Laboratório Biopse em Fortaleza/CE (C) e 5 lâminas de TMA confeccionadas no Laboratório Multiuso do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e marcadas com anticorpo anti-NS3 (D) contendo os 34 casos de dengue e os 32 casos controles, além dos controles positivo e negativo.

Fonte: Arquivo da pesquisa e elaborada pelo autor.

4.6. Análises histopatológicas

Os blocos de parafina dos tecidos pulmonares foram cortados utilizando-se lâmina descartável para corte histológico da marca Leica (MR) de perfil alto 818 (80mm x 14mm x 0,35mm), no micrótomo Leica modelo RM.

As amostras de tecidos pulmonares das autópsias foram fixadas em formalina (10%) e emblocadas em resina de parafina. Para a análise histopatológica foram feitos cortes adicionais a na espessura de 4 μ m, seguindo-se a sequência de desparafinização em xileno, reidratação com álcool, fixação com hematoxilina/eosina (HE) e utilizado para fixação das lamínulas óleo do Canada sintético QEEL para micrótomo.

Foram confeccionadas lâminas, com dois spots com diâmetro de 2mm por paciente para ambos os grupos, dengue e controle (Figura 21), sendo uma lâmina de cada grupo corada com hematoxilina e eosina e 5 lâminas silanizadas que foram identificadas e estocadas a 5°C para preservação até a realização da marcação com as imunohistoquímicas (com anticorpos anti-CD61 e anti-NS3).

4.7. Estudo morfométrico

A análise dos megacariócitos foi realizada sob microscopia óptica com objetiva de 40x em microscópio Zeiss (MR) Scope A1 e ocular de 10x (aumento de 400x) e realizada captura de imagens do parênquima pulmonar com a câmera AxioCam ERc 5s anexada ao microscópio. A morfometria computadorizada foi realizada através do software Zen 2.3 (MR) através da contagem dos megacariócitos e das imunomarcações tanto para CD61 quanto para NS3.

Foi utilizada análise da relação histomorfométrica dos megacariócitos para ambos os grupos (dengue e controle) coradas com hematoxilina e eosina (HE). Aqui foi observado presença e ausência dos megacariócitos pela coloração no HE e posteriormente confirmada pela imunexpressão com CD61 com a sua quantificação para posterior análise em ambos os grupos (dengue e controle).

A marcação com NS3 foi utilizada para identificação dos megacariócitos infectados pelo DENV pois células NS3+ identificadas confirmam a presença de replicação do DENV no interior destas células dos tecidos pulmonares estudados.

4.8. Estudo Imunohistoquímico para identificação e quantificação do marcador CD61 e identificação do marcador NS3

4.8.1 Marcação com anticorpo anti-CD61

A técnica aplicada no presente estudo para identificação e quantificação dos megacariócitos foi realizada no Laboratório Biopse em Fortaleza-CE da seguinte forma: utilizou-se cortes de 3µm de espessura dos TMA dos grupos dengue e controle (de que estavam previamente fixados em formalina), bem como seu respectivo controle positivo (medula óssea) e fixados em lâminas de vidro silanizadas (3-aminopropiltrióxido). Em seguida, as lâminas foram levadas à estufa a 60°C por sessenta minutos para secagem e fixação do tecido. Todas as reações foram realizadas por automação pelo método da imunoperoxidase indireta com técnica e detecção pelo sistema XT Ultraview DAB v3, revelados com diaminobenzidina (DAB) utilizando-se o equipamento Benchmark Ultra Ventana da ROCHE que segue as seguintes etapas: recuperação antigênica, bloqueio das enzimas endógenas com peroxidase, incubação com anticorpos primários (antígeno CD61), e incubação dos anticorpos secundários (reagentes para revelação do complexo antígeno-anticorpo).

Na imunohistoquímica para detecção da expressão do antígeno CD61 foi utilizado um anticorpo monoclonal de camundongo que tem marcação citoplasmática e que quando marcados com o complexo enzimático avidina-biotina-cromógeno, cuja substância cromogênica é diaminobenzidina, confere à reação positiva uma coloração marrom-acastanhada.

No estudo em questão, o anticorpo anti CD61 utilizado foi do fabricante Cell Marque Corporation USA, clone 2f2, pronto para uso e não precisou diluir (0,28 µg/mL). Além da marcação foi realizado um teste de background sem a incubação com o anticorpo primário, apenas com a contracoloração (a hematoxilina).

4.8.2. Marcação com anticorpo anti-NS3

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para identificar a presença de antígenos virais de proteínas não estruturais, NS3, viral nos megacariócitos das amostras de tecidos pulmonares. O protocolo utilizado foi o do Laboratório de Imunologia viral no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ).

A recuperação antigênica foi realizada por aquecimento do tecido na presença de solução de recuperação de alvo EnVision Flex pH alto (Dako, CA, EUA). Os tecidos foram bloqueados para peroxidase endógena com 3% de peroxidase de hidrogênio em metanol e lavados em Tris-HCl (pH 7,4). Para reduzir a ligação não específica, os cortes foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então incubadas durante a noite a 4 ° C com anticorpo recombinante anti-DENV NS3 (PÓVOA *et al.*, 2014). No dia seguinte, as seções foram incubadas com anticorpo secundário REVEAL COMPLEMENT (Spring Bioscience, CA, EUA) por 10 min e um conjugado de anticorpo secundário REVEAL-HRP (Spring Bioscience, CA, EUA) por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (Spring Bioscience, CA, EUA) como cromogênio e os cortes foram contrastados com hematoxilina de Harris (Dako, CA, EUA).

A identificação da replicação do DENV deu-se por meio da identificação morfológica dos megacariócitos pulmonares marcados com o anticorpo anti-NS3. Os controles negativo e positivo foram adicionados a reação conforme orientação do fabricante.

4.9. Análise dos dados

Os dados da amostra foram inicialmente incluídos em tabelas utilizando o programa Microsoft Excel[®]. Os dados foram: a identificação dos pacientes, idade, sexo, diagnóstico laboratorial da dengue, tempo de evolução da doença, sinais clínicos de hemorragia, sinais de hemorragia e trombose na necropsia, contagem de plaquetas, contagem dos megacariócitos pulmonares, avaliação de presença da marcação com o anticorpo anti-NS3 (indicativo de replicação viral) nos megacariócitos pulmonares.

Os dados foram digitados em planilha eletrônica e utilizado o Microsoft Excel[®] e os softwares GraphPad Prism[®] ver 5.00 e Jamovi ver 1.6 (2021) para análise estatística. Foram consideradas variáveis qualitativas e quantitativas e realizados os seguintes testes: teste exato de Fisher para as variáveis categóricas, e o teste T de Student e teste de Mann-Whitney para as variáveis contínuas condicionados à adesão a distribuição normal Shapiro Wilks. Feito teste de correlação Spearman entre as variáveis estudadas. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando o $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Descrição da amostra

Esta amostra representada pelos 34 casos de dengue confirmada foi constituída de 19 casos (55,88%) em pacientes do sexo masculino e 15 (44,12%) do sexo feminino com média de idade de $47,71 \pm 17,22$ anos conforme apresentado na Tabela 02 Já o grupo controle, representado na Tabela 02, foi constituído por 32 pacientes que foram a óbito por morte súbita, com faixa etária semelhante ao grupo dengue, autopsiados pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Secretaria de Saúde do Ceará entre janeiro/2015 e março/2020 sem alterações anatomohistopatológicas pulmonares descritas em atestado de óbito. Dentre estes, 25 (78,12%) eram do sexo masculino e 7 (21,88%) do sexo feminino com média de idade de 57,14 anos.

Tabela 2 – Dados demográficos de idade e sexos dos grupos dengue e controle

	Gênero		Idade (anos)	
	Nº casos	%	Média	Desvio padrão
Grupo de Dengue (n=34)				
Feminino	15	44,12%	45,87	17,89
Masculino	19	55,88%	49,16	17,03
Total	34	100,00%	47,71	17,22
Grupo Controle (n=32)				
Feminino	7	21,88%	56,00	19,05
Masculino	25	78,12%	53,36	23,37
Total	32	100,00%	53,94	22,23

Nº = número; % percentual em relação ao total de casos da amostra

Fonte: Elaborada pelo autor

Todos os casos de dengue analisados tiveram confirmação laboratorial em pelo menos um método de diagnóstico e estão representados na tabela 03. Dentre os métodos utilizados pelo SVO para confirmação laboratorial da dengue a Imuno-histoquímica do tecido hepático foi a que mais confirmou a presença do DENV tendo resultado positivo em 29 casos (85,29%) seguida pela detecção de NS1 em tecido pulmonar em 24 dos casos (70,59%), 8 casos (23,53%) foram IgM positivos e em apenas 3 casos (8,82%) conseguiu-se isolamento viral.

Tabela 3 - Frequência do método diagnóstico laboratorial de dengue nos 34 casos da amostra.

Método Diagnóstico	Nº casos dengue	% total das observações
IHQ tecido hepático	29	85,29%
NS1 IHQ tecido pulmonar	24	70,59%
IHQ tecido pulmonar	10	29,41%
IgM sérico (ELISA)	8	23,53%
NS1 sérico (ELISA)	6	17,65%
RT-PCR sérico	6	17,65%
Isolamento Viral	6	17,65%
Sorotipos do DENV	6	17,65%
RT-PCR sérico	3	8,82%
Isolamento Viral	3	8,82%

Nº = número;

% percentual em relação ao total de casos da amostra

Fonte: Elaborada pelo autor

Foi possível determinar apenas o sorotipo de 06 dos 34 casos estudados (17,8%), sendo 03 casos do sorotipo DENV-1 e 03 do sorotipo DENV-4.

Com relação ao tempo de evolução da doença, a média de evolução da doença até o óbito foi de $5,41 \pm 3,89$ dias, sendo 20 dias a evolução mais longa e 1 dias a mais curta.

Com relação tempo de evolução da dengue, desde o início dos sintomas até o óbito, foi de 5.41 ($\sigma = \pm 3.89$) dias (sendo 5,87 dias para sexo feminino e 5,05 dias para sexo masculino).

Quando observamos a amostra no que se refere a frequência das comorbidades, encontramos 19 casos com comorbidades (55,88%) e 15 (44,12%) sem nenhuma comorbidade descrita. A frequência das comorbidade identificadas está representada na Tabela 04, sendo as doenças cardiovasculares as mais prevalentes: hipertensão arterial sistêmica (HAS) em 8 dos casos (23,53%), cardiomiopatia em 7 (20,59%), dislipidemia em 1 (2,94%). Etilismo, tabagismo e diabetes em seguida com os maiores percentuais de frequência, 23,53%, 11,76% e 8,82% respectivamente. As demais doenças (asma, doença renal, doença falciforme e cirrose hepática) tiveram uma frequência de um caso em cada comorbidade (2,94%)

Tabela 4 – Frequência de comorbidades dos casos de dengue (n=34).

Comorbidade	Nº casos dengue	% Total das observações
HAS	8	23,53%
Etilismo	8	23,53%
Cardiomiopatia	7	20,59%
Tabagismo	4	11,76%
Diabetes	3	8,82%
Obesidade	1	2,94%
Dislipidemia	1	2,94%
Asma	1	2,94%
Doença renal	1	2,94%
Doença Falciforme	1	2,94%
Cirrose hepática	1	2,94%

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2. Dados Clínicos

Com relação aos dados clínicos do grupo de dengue (Tabela 05), os sinais de hemorragia (sintoma de alerta da dengue) foram encontrados em 55,88% (19/34 dos casos), sendo relatado hematêmese em 20,59% (7/34), melena em 11,76% (4/34), gengivorragia 8,82% (3/34), hemoptise 5,88% (2/34), hemorragia vaginal 5,88% (2/34) e sangramento no local da punção 2,94% (1/34).

Tabela 5 – Sinais clínicos de alerta para sangramentos e a frequência dos tipos de sangramento n = 34 casos.

Sinais Clínicos de alerta	N	% das observações
Sem sinais de Sangramento	15	44,12%
Com sinais de Sangramento	19	55,88%
Tipos de Sangramento	19	100,00%
Hematêmese	7	36,84%
Melena	4	21,05%
Petéquia	4	21,05%
Equimose	3	15,79%
Hematoma	3	15,79%
Gengivorragia	3	15,79%
Hemoptise	2	10,53%
Hemorragia vaginal	2	10,53%
Sangramento no local da punção	1	5,26%

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3. Dados anatomopatológicos de hemorragia e trombose

Foram também descritos sinais de hemorragia nas necropsias em 91,18% (31/34) pacientes foram encontrados sinais de hemorragia cuja localizações mais frequentes foram: sistema respiratório 58,06% (18/34) seguido de 25,81% (8/34) para sistema digestivo, 25,81% (8/34) cavidades, 16,13% (5/34) sistema circulatório, 12,90% (4/34) sistema urinário, 12,90% (4/34) pele, 9,68% (3/34) SNC, 6,45% (2/34) sistema reprodutor, 3,23% (1/34) endócrino e 3,23% (1/34) sistema músculo-esquelético, representados na tabela 06 abaixo.

Tabela 6 – Localização das hemorragias descritas nas necropsias estratificadas por sistemas em 31 dos 34 casos de dengue estudados.

Localização das Hemorragias em necropsia	N	%
Sistema Respiratório	18	58,06%
Sistema Digestivo	8	25,81%
Cavidade	8	25,81%
Sistema Circulatório	5	16,13%
Pele	4	12,90%
Sistema Urinário	4	12,90%
Outros	4	12,90%
SNC	3	9,68%
Sistema Reprodutor	2	6,45%
Sistema Endócrino	1	3,23%
Sistema Muscular	1	3,23%

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já com relação aos sinais de trombose nas necropsias (tabela 07), foram descritos em 12 pacientes do total dos casos de dengue (35,29%) cuja localizações mais frequentes desses casos com sinais de trombozes foram: pulmão (58,33%), coração (41,67%), rim (16,67%), baço (8,33%) e intestino delgado (8,33%).

Tabela 7 – Sinais de trombose na necropsia estratificada por órgãos (12 de 34 casos de dengue apresentaram sinais de trombose).

Sinais de trombose na necrópsia	N	%
Pulmão	7	58,33%
Coração	5	41,67%
Rim	2	16,67%
Baco	1	8,33%
Intestino	1	8,33%

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4. Dados das plaquetas

A contagem de plaquetas do grupo dengue foi dividida em 2 subgrupos segundo os critérios de plaquetopenia na dengue plaquetas $\leq 100.000/\text{mm}^3$ e plaquetas $> 100.000/\text{mm}^3$ (Ministérios da Saúde, 2016). Foi observado que 24 casos (70,59%) possuíam plaquetas $\leq 100.000/\text{mm}^3$ e 10 possuíam (29,41%) possuíam plaquetas $> 100.000/\text{mm}^3$. A média das plaquetas do grupo de dengue foi de 92.324 mm^3 , sendo a média para o sexo feminino de 116.848 mm^3 e para o sexo masculino de 72.963 mm^3 (Tabela 08). Os dados de plaquetas utilizados foi os últimos exames de plaquetas nas 24h que antecederam o óbito dos pacientes com diagnóstico de dengue.

Tabela 8 – Número de casos de dengue com plaquetopenia ($\leq 100.000/\text{mm}^3$)

Plaquetas	N	%
$\leq 100.000/\text{mm}^3$	24	70,59%
$> 100.000/\text{mm}^3$	10	29,41%
Total de casos de dengue	34	100%

Fonte: Elaborada pelo autor

Com relação aos dados clínicos de hemorragia, dados de hemorragia e trombose na necropsia foi realizado teste de associação entre essas variáveis com contagem de plaquetas <100.000 (plaquetopenia na dengue) e plaquetas >100.000 não foram encontradas associações estatisticamente significativas para nenhuma dessas variáveis ($p=1$, $p=0,549$ e $p=0,113$ respectivamente) (Tabela 09).

Tabela 9 – Teste de associação entre plaquetas e dados de hemorragia e trombose.

Plaquetas				Sinais Clínicos de Hemorragia		Sinais de Hemorragia na Necropsia		Sinais Trombose na Necropsia	
PLAQUETAS	n	%	Média	n	%	n	%	n	%
≤ 100.000 *	24	71%	51.626	21	87,5%	21	61,76%	9	26,47%
> 100.000	10	29%	190.000	9	90,0%	10	29,41%	3	8,82%
Teste de Fisher				$p=1,0$		$p=0,549$		$p=0,113$	

* Para plaquetopenia: PLAQUETAS $\leq 100.000/\text{mm}^3$

Fonte: Elaborada pelo autor.

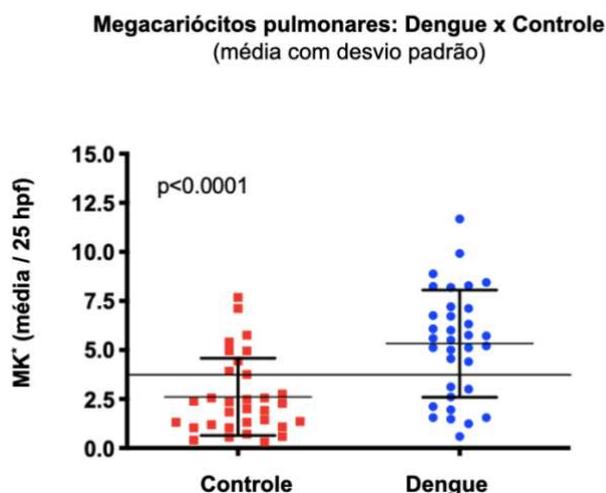
5.5. Quantificação dos megacariócitos

Quando observamos a amostra com relação aos megacariócitos, identificamos pela morfologia estas células em 32,35% dos casos com a coloração de hematoxilina e eosina. Quando fizemos a imunohistoquímica marcando com o anticorpo anti-CD61 os megacariócitos foram visualizados em 100% dos casos.

A partir da marcação com o anticorpo anti-CD61, foram feitas as contagens dos megacariócitos em 25 campos selecionados aleatoriamente com um aumento de 400x. A média (μ) da densidade dos megacariócitos pulmonares da amostra foi de 5,32 por campo no aumento de 400x ($\sigma = \pm 2,69$), sendo a média para o sexo feminino de 5,81/campo e para sexo masculino de 4,94/campo no grupo de dengue. No grupo controle, a média (μ) dos megacariócitos pulmonares foi de 2,61 por campo no aumento de 400x ($\sigma = \pm 1,97$).

Não houve diferença estatisticamente significativa da quantidade média dos megacariócitos entre os sexos masculino e feminino ($p=0,369$). Quando comparado os grupos de dengue e controle com relação aos megacariócitos, o aumento da população dos megacariócitos do grupo de dengue mostrou uma diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle ($p < 0,001$) (Gráfico 01). A densidade de megacariócitos entre os grupos dengue e controle mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) com um intervalo de confiança de 95%.

Gráfico 01 – Comparação entre população média de megacariócitos dos grupos dengue e controle.



Legenda: MK: megacariócitos; hpf: high power field (campos de alta potência) Vermelho: casos do grupo controle Azul: casos do grupo de dengue.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando fazemos a correlação entre as variáveis plaquetas, megacariócitos e idade não encontramos correlação significativa para nenhuma das correlações. Plaquetas e megacariócitos ($p=0,477$), plaquetas e idade ($p=0,325$) e megacariócitos e idade ($p=0,415$).

Com relação a hemorragia e trombose nos casos de dengue, 88,24% (30/34) dos casos que possuíam sinais clínicos de hemorragia também apresentavam contagem MK aumentada, 85,29% (29/34) dos casos que possuíam sinais de hemorragia na necropsia também apresentavam contagem MK aumentada e 91,18% (31/34) dos casos que possuíam sinais de trombose na necropsia também apresentavam contagem MK aumentada. Foi realizado teste de associação entre essas variáveis com aumento de megacariócitos pulmonares (até em média 2 megacariócitos/campo são considerados normais) (VALDIVIA-MAZEYRA *et al.*, 2021) também não foram encontradas associações estatisticamente significativas para nenhuma dessas variáveis ($p=0,850$, $p=0,453$ e $p=0,641$ respectivamente) (Tabela 10).

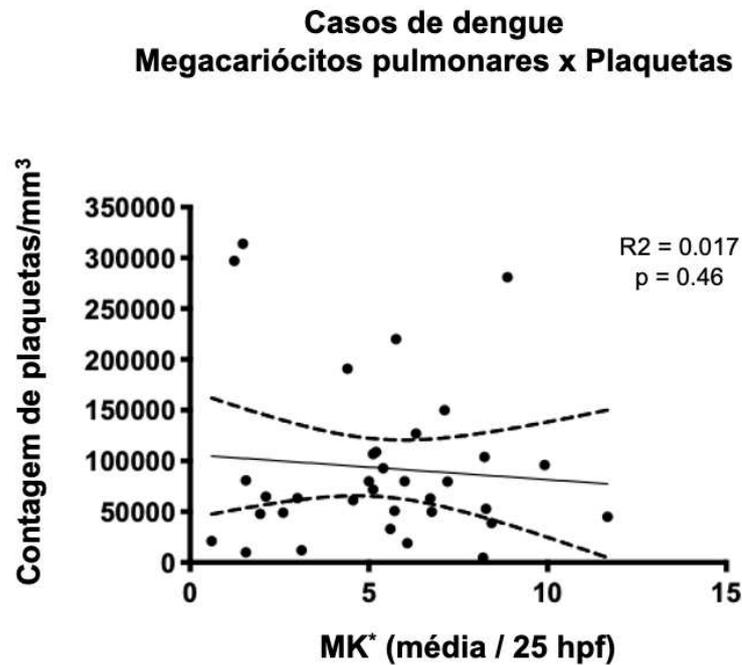
Tabela 10 – Teste de associação entre média de MK e dados de hemorragia e trombose.

Megacariócitos	MK			Sinais Clínicos os de Hemorragia		Sinais de Hemorragia na Necropsia		Sinais Trombose na Necropsia	
	N	%	Média	N	%	N	%	N	%
Normal*	6	17,6%	1,40	4	11,76%	5	14,71%	3	8,82%
Aumentado	28	82,4%	6,16	30	88,24%	29	85,29%	31	91,18%
	Teste de Fisher			$p=0,850$		$p=0,453$		$p=0,651$	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação a contagem de plaquetas e média de MK pulmonares, 71% (24/34) dos casos de dengue tinham em média de contagem plaquetas de 51.626 mm^3 e 29% (10/34) tinham média de contagem de plaquetas de 190.000 mm^3 . Não foi observada correlação entre a contagem de plaquetas e a média de megacariócitos pulmonares dos casos de dengue ($p=0,46$) mostrado no gráfico 02 abaixo.

Gráfico 02 – Correlação entre a contagem de plaquetas x megacariócitos pulmonares.

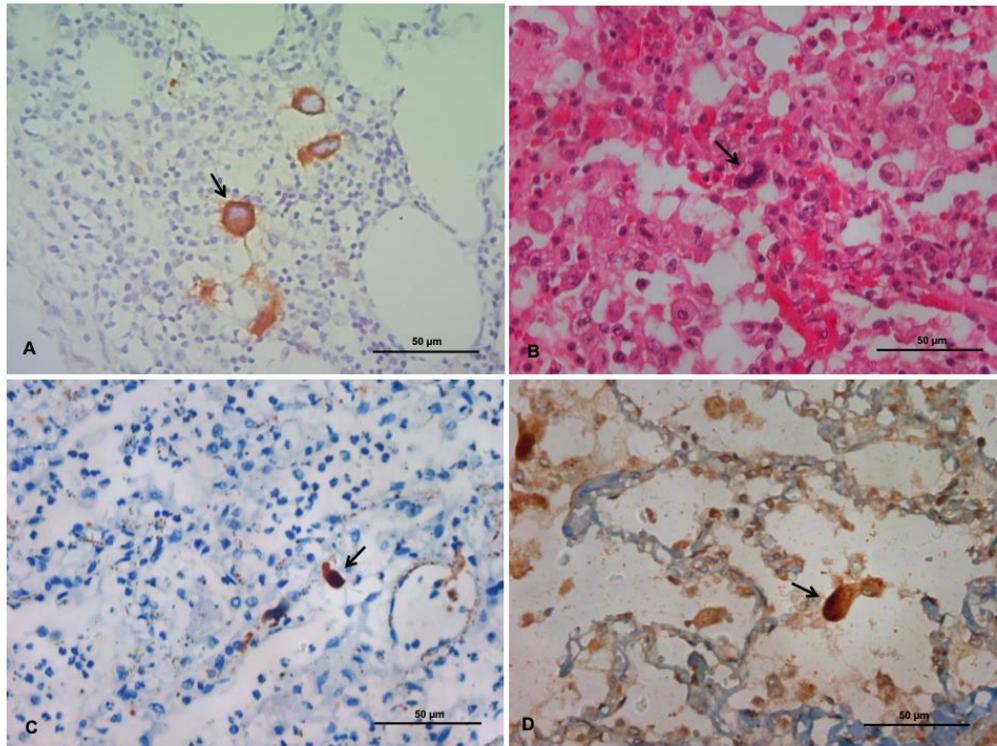


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6. Identificação de megacariócitos pulmonares marcados com anticorpo anti-NS3

Detectamos a NS3 em 55,88% (19/34) dos casos fatais de dengue analisados, no tecido pulmonar. No entanto analisando as lâminas em busca de MK pulmonares marcados, apenas 13 dos 34 casos (38,24%) tiveram mais de 01 megacariócito identificado pela morfologia que estavam marcados com anticorpo anti-NS3 na imuno-histoquímica do tecido pulmonar, porém não foram quantificados. Ou seja, 68,42% dos casos com confirmado o antígeno viral NS3 no tecido pulmonar tiveram megacariócitos que expressavam este antígeno viral (Figura 22).

Figura 22 – Fotografias em microscópio eletrônico de megacariócitos em tecido pulmonar e medula óssea.



Fotomicrografias de medula óssea e megacariócitos pulmonares (MK). (A) Controle positivo de megacariócito de medula óssea humana (400x): corado com anticorpo anti-CD61 usando conjugado de peroxidase e cromógeno DAB. Observe que o citoplasma está corado de marrom e o núcleo azulado devido à contracoloração da hematoxilina. Essas células da medula óssea têm citoplasma abundante. (B)* Tecido pulmonar de pacientes fatais com dengue corado com hematoxilina e eosina (HE), 400x, e uma seta mostrando um megacariócito pulmonar. É uma célula multinucleada gigante e, ao contrário do megacariócito da medula óssea, o megacariócito pulmonar apresenta morfologia alongada e citoplasma escasso. (C) * Tecido pulmonar de dengue corado com anticorpo anti-CD61 usando conjugado de peroxidase e DAB cromógeno. A seta mostra um megacariócito pulmonar expressando CD61, aumento de 400x. (D*) Detecção da proteína NS3 por imunohistoquímica em tecido pulmonar de paciente com dengue indicando replicação viral nestas células.

*As amostras de tecido pulmonar são do mesmo paciente com dengue

Fotos do arquivo do projeto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6. DISCUSSÃO

A dengue é uma arbovirose transmitida por mosquito e com alta prevalência em regiões tropicais e subtropicais. A dengue possui um amplo espectro sintomático, desde assintomático a formas mais graves. Seu diagnóstico pode ser realizado por meio de isolamento viral, isolamento do seu material genético (RNA), detecção de antígenos virais ou através de testes sorológicos (FATIMA; WANG, 2015; GUZMAN *et al.*, 2010; PEELING *et al.*, 2010; SIMMONS *et al.*, 2012).

Geralmente o curso da dengue é de prognóstico bastante favorável durante a fase aguda, que dura em média de 2 a 7 dias. Na fase de defervescência é quando as vezes os sinais de gravidade começam a aparecer. Caso a dengue com sinais de gravidade (dengue hemorrágica ou choque da dengue) sejam detectados de forma precoce o tratamento para sinais de choque poderão ser iniciados precocemente, pois uma vez instalados a taxa de mortalidade é muito elevada variando dentre 12 a 44% (ALEJANDRIA, 2015). No Brasil, a dengue tem afetado mais adultos diferentemente do continente Asiático e dos outros países das Américas e os casos de dengue grave com complicações hemorrágicas vem aumentando drasticamente (BHAMARAPRAVATI; TUCHINDA; BOONYAPAKNAVIK, 1967; BURKE, 1968; GUILARDE *et al.*, 2008; GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2008).

Neste estudo, a confirmação do diagnóstico por RT-PCR foi de apenas 6 (17,65%) dos casos e isso pode ter ocorrido devido a conservação das amostras em formol não tamponado. A imuno-histoquímica no tecido hepático foi positiva em 29 (85,29%) e no tecido pulmonar 24 (70,59%) dos casos demonstrando que o pulmão também é um órgão muito acometido pelo vírus da dengue e seu ciclo de replicação e, conforme Póvoa e seu colaboradores, o pulmão foi um dos órgãos com maior número de células que apresentaram partículas virais o que mostra a importância deste órgão na patogênese da doença, especialmente naqueles casos mais graves (PÓVOA *et al.*, 2014).

Os pacientes do grupo controle eram em sua maioria do sexo masculino, com média de faixa etária de 59 anos o que é compatível por serem pacientes que tiveram morte súbita autopsiados no SVO-CE. Já no grupo de dengue, a média de idade foi de 48 anos e a frequência do sexo masculino discretamente maior. Com relação à média de idade, o presente estudo teve uma média de idade de $48 \pm 17,22$ anos e foi muito próxima a encontrada na literatura $42,6 \pm 20,3$ anos (AMÂNCIO *et al.*, 2015).

Já com relação ao sexo na literatura, Torres refere em seu livro que, mesmo que sem significância estatística, o sexo feminino teria mais propensão as formas graves da dengue

(TORRES, 2005) divergindo do encontrado do presente estudo. Já o estudo de Limonta e seus colaboradores obtiveram mais mortes no sexo masculino que do sexo feminino (2:1) e o óbito ocorreu aproximadamente 6,3 dias após o início da febre, muito próximo da encontrada na amostra deste estudo que foi de 5,41 dias desde o início dos sintomas. Todos os pacientes apresentaram febre e plaquetopenia muito precocemente. No presente estudo 70,6% dos pacientes tiveram plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$ e 85,3% tinham febre seguindo um padrão muito parecido com o encontrado por Limonta e seus colaboradores (LIMONTA *et al.*, 2007).

Neste estudo, 19 (55,88%) pacientes apresentaram sinais clínicos de sangramento, sendo a hematêmese (36,84%), melena (21,05%) e petéquias (21,05%) os mais frequentes entre os sinais de sangramento. De acordo com Amâncio e seus colaboradores, os sinais de sangramento ocorreram em 73,2% de seus casos sendo petéquias o sangramento mais frequente (23,7%) (AMÂNCIO *et al.*, 2015). Guilarde *et al.* encontraram aproximadamente em 70% dos pacientes com algum sinal de hemorragia e plaquetas $< 50.000/\text{mm}^3$ uma correlação negativa com a contagem de plaquetas ($p < 0,001$) (GUILARDE *et al.*, 2008). No presente trabalho não foi encontrada nenhuma associação entre essas duas variáveis ($p = 1,00$) e uma correlação muito fraca e ligeiramente inversa ($p = - 0,12$).

Como já demonstrado em alguns trabalhos, o vírus da dengue (DENV) infecta células da linhagem megacariocítica através da ligação com a glicoproteína Ib (GPIb), mas até o momento só foi visto *in vitro* ou em modelos animais de macaco Rhesus, sugerindo que o DENV pode infectar os megacariócitos maduros prejudicando, portanto, a produção plaquetária. Além disso, foi demonstrado *in vitro* que a sobrevivência do DENV se dá através de sua replicação nessas células, mas ainda não confirmado *in vivo* (ATTATIPPAHOLKUN *et al.*, 2018; RAADSEN *et al.*, 2021; NOISAKRAN *et al.*, 2012a, 2012b).

A queda do nível plaquetário é explicada pela destruição dos megacariócitos (MK) maduros que começa a ocorrer a partir do 1-2^o dia, pois o DENV não infecta os MK indiferenciados. Como o processo de diferenciação e maturação dos megacariócitos leva em torno de 3-5 dias os níveis plasmáticos de plaquetas volta a aumentar rapidamente a partir do 6^o dia de doença (ATTATIPPAHOLKUN *et al.*, 2018). No presente estudo 24 (70,59%) possuíam plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$ sendo dentre estes 10 (41,67%) com plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ e a menor contagem de plaquetas de $4.700/\text{mm}^3$.

Os megacariócitos foram visualizados na coloração de hematoxilina e eosina (HE) e com a marcação com o anticorpo anti-CD61 nas amostras pulmonares. Assim como Carsana e seus colaboradores, ao HE identificamos os megacariócitos como grandes células com citoplasma mais escasso do que aquelas visualizadas na medula óssea, núcleo bem alongado

para que esta célula pudesse se adaptar ao pequeno diâmetro dos capilares pulmonares (CARSANA *et al.*, 2020). No entanto, mesmo que o HE permita o reconhecimento dos MKs, sua identificação foi facilitada com a realização de imuno-histoquímica através da expressão do CD61, também expresso em plaquetas e trombos ricos em plaquetas (BURKE *et al.*, 2005). Essa marcação ajudou a localizarmos um número maior de células pois como elas tem tamanho variados e dependem do corte histológico.

A quantidade de megacariócitos pulmonares no grupo dengue foi significativamente superior ao grupo controle (Gráfico 01), porém, até o presente momento, não existem trabalhos que demonstrem megacariócitos pulmonares na dengue. No entanto, foi demonstrado que o COVID, doença também viral que acomete os pulmões, teve um aumento dos MK pulmonares ($7,61 \pm 5,59$ nos casos COVID e $1,14 \pm 0,86$ nos pulmões normais). e mostrou diferenças estatisticamente significativas dos megacariócitos pulmonares entre o grupo com COVID e o grupo controle com pulmão normal ($p < 0,05$) (VALDIVIA-MAZEYRA *et al.*, 2021). O desvio padrão grande dessas células pode ser explicado pela distribuição heterogênea dos megacariócitos que trafegam livremente no pulmão.

Outro ponto muito importante a ser ressaltado é que os pulmões têm sido cada vez mais considerados um local de megacariopoiese extramedular e como os megacariócitos são as células precursoras das plaquetas alguns eventos trombóticos também podem estar associados. Uma vez as plaquetas sendo ativadas toda uma cascata de resposta inflamatória será iniciada causando agregação e consumo das plaquetas, o que também pode explicar a plaquetopenia na dengue e os eventos trombóticos tanto pulmonares como também em outros órgãos que sejam afetados pelo DENV.

A morfometria da imuno-marcação dos megacariócitos pulmonares dos casos de exibiu uma média quase que o dobro ($5,32 \pm 2,73$) que os casos controle ($2,61 \pm 1,97$) e demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Gráfico 01).

Em alguns estudos foram detectados antígenos do vírus da dengue, NS3, em uma variedade de células indicando sua replicação nestas células. Foram descritas expressões do antígeno viral NS3 em macrófagos alveolares, hepatócitos, pneumócitos tipo II, cardiomiócitos e células endoteliais (AYE *et al.*, 2014; BALSITIS *et al.*, 2009; JESSIE *et al.*, 2004; MORAGAS, 2020; PÓVOA *et al.*, 2014; SOUSA, 2017).

Embora Póvoa e seus colaboradores tenham isolado megacariócitos e plaquetas em seus casos fatais de dengue, estes não expressavam o antígeno viral NS3 ficando imunomarcadas. As partículas virais (NS3) só foram identificadas no tecido pulmonar em células endoteliais, pneumócitos tipo II, e macrófagos (PÓVOA *et al.*, 2014). Mais

recentemente Vogt e seus colaboradores demonstraram a infecção e replicação do DENV em células de linhagem megacariocítica em 3 tipos de modelos: *in vitro* utilizando células megacariocítica humanas, *ex vivo* com células megacariocítica humanas e modelo animal com camundongos humanizados (VOGT *et al.*, 2019). No entanto, até o momento não há registros de identificação de infecção e replicação do DENV em megacariócitos pulmonares isolados de amostras *in vivo* de pulmão humano embora já tenha sido descrito que as plaquetas (fragmentos de células derivadas dos megacariócitos) servem de centro de replicação viral (ASSINGER, 2014; CLARK *et al.*, 2012; HOTTZ *et al.*, 2014; NOISAKRAN *et al.*, 2009; PRYZDIAL; SUTHERLAND; SIMON, 2017; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015) piorando a trombocitopenia em pacientes com dengue pois a ativação plaquetária induz a apoptose (HOTTZ *et al.*, 2013; OJHA *et al.*, 2017).

Hsu demonstrou que células CD61+ da medula óssea oriundas de pacientes com dengue e em macacos Rhesus demonstraram vesículas que sugeriam ser o vírus da dengue (HSU *et al.*, 2015). O mesmo demonstrado por Noisakran que identificou células marcadas tanto para antígenos virais do DENV como para anti-CD41 que sugeriu que megacariócitos imaturos são jogados na corrente sanguínea em resultado da infecção viral pelo DENV (NOISAKRAN *et al.*, 2012a).

Como demonstrado em alguns artigos, os megacariócitos e as plaquetas possuem receptores que permitem a internalização de alguns vírus facilitando a sua replicação como no caso dos lentivirus (BOUKOUR *et al.*, 2006).

Como Noisakran reforçou, as células de linhagem megacariocítica e plaquetas são vitais para manter a hemostasia. Seu defeito poderia explicar os achados clínicos de sangramento e trombose estando envolvidas no processo de infecção e replicação viral que foi demonstrado em seus estudos *in vitro* de células megacariocítica da medula óssea (NOISAKRAN *et al.*, 2010).

No presente trabalho, identificamos a expressão do antígeno NS3 (38,24% dos casos de dengue), que indica replicação viral intracelular em megacariócitos pulmonares, pois os pulmões são uns dos principais sítios de megacariopoiese extramedular (figura 22). Como os megacariócitos são células de distribuição muito heterogênea devido serem raras e de baixa densidade e alta mobilidade explicaria não ter sido encontrada em todos os casos. No entanto, ainda sugere sua importância na doença e indica que o pulmão como possível órgão para suprir a megacariopoiese da medula óssea durante a infecção aguda pelo DENV.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os megacariócitos pulmonares em casos graves e fatais de dengue em pacientes adultos, comparar as manifestações clínicas e anatomopatológicas de hemorragia e sinais anatomopatológicos de trombose com a contagem de plaquetas das últimas 24h que antecedeu o óbito e a média dos megacariócitos pulmonares. Além disso, demonstrou a identificação da presença de NS3 em megacariócitos pulmonares *in vitro*, pela primeira vez em literatura, como sinal indireto da replicação do DENV nessas células que são importantes para o processo de homeostase sanguínea.

Para isso foram utilizadas imunomarcações dos tecidos pulmonares com CD61 para identificação dos megacariócitos por serem células de rara identificação fora da medula óssea, e NS3 (proteína não estrutural do DENV) que não é liberada na corrente sanguínea, mas se faz presente nas células infectadas pelo vírus da dengue. A identificação e quantificação das células marcadas com imunohistoquímica com anticorpo anti-CD61 e anti-NS3 foi realizada por microscopia eletrônica com captura de imagens dos parênquimas pulmonares realizadas na magnificação de 400x.

Foi observado que a dengue grave e fatal em adultos acomete principalmente a faixa etária entre 3-59 anos, com uma discreta predominância entre o sexo masculino e tem um tempo médio de evolução para o óbito de 5-6dias.

Dentre os órgãos mais acometidos pela doença está o pulmão sendo acometido e mais de 70% dos casos fatais sendo o desconforto respiratório o principal sintoma descrito e a febre presente em mais de 85% dos casos.

A infecção da dengue grave e fatal envolve distúrbios da homeostase (hemorragia e trombose) e a plaquetopenia (contagem de plaquetas $< 100.000\text{mm}^3$) está presente em 70% dos casos graves que evoluíram para o óbito demonstrando a importância das plaquetas e dos megacariócitos na patogênese da dengue grave. Dentre os achados clínico-anatomopatológicos de hemorragia o pulmão foi o órgão mais afetado (58% dos casos) e também mostrou ser o sítio com mais sinais de trombose nas necrópsias. Portanto, o envolvimento pulmonar nas formas graves de dengue é importante para o desfecho fatal desta doença e muitas vezes a sintomatologia clínica descrita de desconforto respiratório se correlaciona com achados anatomopatológicos de sinais de hemorragia e extravasamento vascular pulmonar e trombose com as alterações encontradas entre a contagem de plaquetas e aumento de megacariócitos pulmonares.

A identificação de megacariócitos pulmonares marcados com NS3 pela 1ª vez em humanos é importante por apontar um indício indireto de que o DENV também replica nestas células tão importantes na produção de plaquetas, que por sua vez são de fundamental importância para garantir a homeostase.

Com isso o presente trabalho além de trazer uma importante contribuição identificando a replicação do DENV nos megacariócitos (células tão importantes para homeostase), tem também o objetivo de fornecer subsídios para que outros estudos sejam realizados com objetivo de buscar a melhoria de diagnóstico, seguimento e tratamento dos pacientes com dengue para minimizar a evolução para o desfecho mais temido, o óbito.

Embora não tenha encontrada, neste estudo, uma correlação significativa entre os dados clínicos de hemorragia e dados anatomopatológicos de hemorragia e trombose e a contagem megacariócitos, sugere-se que outros estudos sejam realizados e testados com uma amostra maior.

Até o presente momento, não nada foi descrito sobre quantificação de megacariócitos pulmonares *in vivo* em casos de dengue nem a demonstração da presença de NS3 em megacariócitos pulmonares como demonstrado e descrito neste trabalho. Portanto, os megacariócitos podem ser uma célula-alvo para a replicação do DENV, contribuindo para a trombocitopenia.

No entanto, até agora, este estudo pode ser o primeiro estudo de autópsia que quantifica megacariócitos pulmonares em casos fatais de dengue e mostra megacariócitos em tecido pulmonar humano expressando o antígeno NS3 do vírus DENV *in vivo*, indicando sua replicação no interior destas células, antes apenas documentadas em macrófagos, células endoteliais, células linfóides reativas no baço, pneumócitos tipo II, túbulos renais, hepatócitos, cardiomiócitos e plaquetas.

REFERÊNCIAS

- ABADIE, Y. et al. Decreased VEGF concentration in lung tissue and vascular injury during ARDS. **European Respiratory Journal**, v. 25, n. 1, p. 139–146, 2005.
- ALEJANDRIA, M. M. Dengue haemorrhagic fever or dengue shock syndrome in children. **BMJ clinical evidence**, v. 2015, n. March 2014, p. 1–15, 2015.
- AMÂNCIO, F. F. et al. Clinical profiles and factors associated with death in adults with dengue admitted to intensive care units, Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.
- APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 9, n. 2, p. 134–142, dez. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.09.020>
- ARAÚJO, F. M. C. et al. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods**, v. 177, n. 1, p. 128–131, 2011. DOI: [10.1016/j.jviromet.2011.07.003](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.07.003)
- ASSINGER, A. Platelets and infection - An emerging role of platelets in viral infection. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. DEC, p. 10–12, 2014. DOI: [10.3389/fimmu.2014.00649](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00649)
- ATTATIPPAHOLKUN, N. et al. Selective Tropism of Dengue Virus for Human Glycoprotein Ib. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: [10.1038/s41598-018-20914-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-20914-z)
- AVIRUTNAN, P *et al.* Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 161, n. 11, p. 6338–6346, 1998.
- AYE, K. S. et al. Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. **Human Pathology**, v. 45, n. 6, p. 1221–1233, jun. 2014. DOI: [10.1016/j.humpath.2014.01.022](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.01.022)
- AZEREDO, E. L. DE; MONTEIRO, R. Q.; DE-OLIVEIRA PINTO, L. M. Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–16, 2015. DOI: [10.1155/2015/313842](https://doi.org/10.1155/2015/313842)
- BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, n. 1, p. 19839, 30 jan. 2013. DOI: [10.3402/iee.v3i0.19839](https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839)
- BAKKER, A. B. H. et al. Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 17, p. 9792–9796, 1999.
- BALSITIS, S. J. et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 416–424, 2009.

BARCAT, J. A. Megacariocitos, plaquetas y una nueva función pulmonar. **MEDICINA (Buenos Aires)**, v. 77, n. 4, p. 344–346, 2017. ISSN: 1669-9106.tese

BARROSO, F. C. **Perfil Histopatológico e Molecular do Envolvimento Pulmonar nas Formas Fatais de Dengue**. FIOCRUZ, 2017.

BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, C. A. et al. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 341–347, 2005. DOI: 10.1590/S1413-86702005000400012.

BEATTY, P. Robert *et al.* Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 304, 2015. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa3787.

BHAMARAPRAVATI, N.; TUCHINDA, P.; BOONYAPAKNAVIK, V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 61, n. 4, p. 500–510, 15 dez. 1967.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 7 abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12060>

BOILARD, E.; FLAMAND, L. The role of the megakaryocyte in immunity has gone viral. **Blood**, v. 133, n. 19, p. 2001–2002, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2019-02-900787>.

BOUKOUR, S. et al. Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 2, p. 426–435, 2006.

BRAGA, D. N. DE M. **Aspectos laboratoriais e anatomopatológicos no diagnóstico da dengue no Ceará em 2011 e 2012: papel do serviço de verificação de óbitos de Fortaleza**. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Ceará - Faculdade de Medicina, 2014.

BRESTOVAC, B. et al. Primary acute dengue and the deletion in chemokine receptor 5 (CCR5δ32). **Microbes and Infection**, v. 16, n. 6, p. 518–521, 2014. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.02.007.

BRICKS, L. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatria**, v. 26, n. 4, p. 268–281, 2004.

BURKE, A. P. et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura causing rapid unexpected death: Value of CD61 immunohistochemical staining in diagnosis. **Cardiovascular Pathology**, v. 14, n. 3, p. 150–155, 2005.

BURKE, T. Dengue haemorrhagic fever: A pathological study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 5, p. 682–692, jan. 1968.

CAHILL, M. E. et al. Identification of genetic variants associated with dengue or West Nile virus disease: A systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2018. DOI: 10.1186/s12879-018-3186-6.

CÂMARA MUNICIPAL DE FORTALEZA. **Boletim Epidemiológico da SMS mostra redução dos casos de dengue, chikungunya e zika em relação ao mesmo período de 2021**.

Disponível em: <<https://www.cmfor.ce.gov.br/2022/02/08/boletim-epidemiologico-da-sms-mostra-reducao-dos-casos-de-dengue-chikungunya-e-zika-em-relacao-ao-mesmo-periodo-de-2021/>>.

CARSANA, L. et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1135–1140, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30434-5.

CECCHETTI, L. et al. Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: A mechanism for regulating synthetic events. **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1903–1911, 18 ago. 2011. DOI: 10.1182/blood-2010-12-324517.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Dengue Virus Antigen Detection**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/healthcare-providers/testing/antigen-detection.html>. Acesso em: 10 set. 2023.

CHAKRAVARTI, A. et al. Improved detection of dengue virus serotypes from serum samples - Evaluation of single-tube multiplex RT-PCR with cell culture. **Dengue Bulletin**, v. 30, p. 133–140, 2006.

CHAKRAVARTI, A.; KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factor- α & interferon- γ in patients with dengue and dengue haemorrhagic fever during an outbreak. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 1, p. 25–30, 2006.

CHEN, R.-F. et al. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 11, p. 1106–1113, nov. 2007.

CHEN, S. T. et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 672–676, 2008.

CHUANG, Y.-C. et al. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 1, p. 42, 2013. DOI: 10.1186/1423-0127-20-42.

CLARK, K. B. et al. Multiploid CD61+ Cells Are the Pre-Dominant Cell Lineage Infected during Acute Dengue Virus Infection in Bone Marrow. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0052902.

CLARK, Kristina Barger. **Dengue Virus Targets and Efficiently Replicates in Megakaryocytes**. 2016. 272 f. - Emory University, 2016. Disponível em: <<https://search.proquest.com/docview/1841897836?accountid=27931>>. Acesso em: 21 fev 2022.

CLARK, K. B. et al. Characterization of dengue virus 2 growth in megakaryocyte–erythrocyte progenitor cells. **Virology**, v. 493, n. 1, p. 162–172, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.virol.2016.03.024.

CODECO, Claudia T *et al.* Fast expansion of dengue in Brazil. **The Lancet Regional Health - Americas**, [s. l.], v. 12, p. 100274, 2022. DOI: 10.1016/j.lana.2022.100274.

CUNIN, P.; NIGROVIC, P. A. Megakaryocytes as immune cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 105, n. 6, p. 1111–1121, 2019. DOI: 10.1002/JLB.MR0718-261RR.

DA COSTA, E. C. B. **Caracterização termodinâmica e funcional da proteína não estrutural 3 (NS3) do vírus da dengue do tipo 2**. UFRJ, 2009.

DE GÓES CAVALCANTI, L. P. et al. Trinta anos de dengue no Ceará: história, contribuições para ciência e desafios no cenário atual com tripla circulação de arbovírus. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 65, 2017. DOI: 10.12662/2317-3076jhbs.v6i1.1415.p65-82.2018.

DEUTSCH, V. R.; TOMER, A. Megakaryocyte development and platelet production. **British Journal of Haematology**, v. 134, n. 5, p. 453–466, set. 2006.

DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. **Cell Press**, v. 162 (3), p. 488-492. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.005

DO CARMO, R. F. et al. Spatiotemporal dynamics, risk areas and social determinants of dengue in Northeastern Brazil, 2014–2017: an ecological study. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1186/s40249-020-00772-6.

DOS SANTOS, C. N. D. et al. Determinants in the Envelope E Protein and Viral RNA Helicase NS3 That Influence the Induction of Apoptosis in Response to Infection with Dengue Type 1 Virus. **Virology**, v. 274, n. 2, p. 292–308, 1 set. 2000.

ELLWANGER, J. H. et al. Beyond HIV infection: Neglected and varied impacts of CCR5 and CCR5Δ32 on viral diseases. **Virus Research**, v. 286, n. January, p. 198040, set. 2020. DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198040.

ELONG NGONO, A.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 279–308, 2018. DOI: 0.1146/annurev-immunol-042617-053142.

FATIMA, A.; WANG, J. Review: progress in the diagnosis of dengue virus infections and importance of point of care test: a review. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 271–280, 2015.

FERREIRA, G. L. C. Global dengue epidemiology trends. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 54, n. SUPPL.18, p. 5–6, 2012.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia Das Infecções Pelos Vírus Do Dengue. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 32, n. 1, p. 15, 1999.

FIOCRUZ MINAS. **Dengue**. Disponível em: <<http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/dengue/>>. Acesso em: 16 fev. 2021.

FRYDMAN, G. et al. 1686: Megakaryocytes are Functional Innate Immune Cells and May Play a Role in Sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 48, n. 1, p. 818, jan. 2020. DOI: 10.1097/01.ccm.0000648644.90541.2a.

FRYDMAN, G. H. et al. Megakaryocytes Display Innate Immune Cell Functions and Respond during Sepsis. **bioRxiv**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/742676>.

GANDINI, M. **DENGUE E IMUNOLOGIA INATA: ESTUDO DOS FATORES ANTIVIRAIS E CITOTÓXICOS** MARIANA GANDINI Rio de Janeiro Junho de 2014. Tese de Doutorado - Instituto Oswaldo Cruz, 2014.

GREEN, Sharone; ROTHMAN, Alan. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 429–436, 2006.

GRIFONI, Alba *et al.* Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 91, n. 24, 2017. DOI: 10.1128/JVI.01469-17.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55–57, jun. 1995.

GUIDACCI, M. DE F. R. C. **Doenças Imunopreviníveis: Dengue**. Disponível em: <<http://alergovaccine.com.br/mundo-das-doencas/dengue/>>. Acesso em: 26 mar. 2021.

GUILARDE, A. O. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: Clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 6, p. 817–824, 2008.

GUZMÁN, M. G. *et al.* Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 118–124, 2002.

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

GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16055, 22 dez. 2016. DOI: 10.1038/nrdp.2016.55.

GUZMÁN, M. G.; GARCÍA, G.; KOURÍ, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: A worldwide health problem. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 60, n. 1, p. 5–16, 2008.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet (London, England)**, v. 385, n. 9966, p. 453–65, 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9.

GUZMÁN, M G; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 33–42, 2002. DOI: 10.1016/s1473-3099(01)00171-2.

HALSTEAD, S. B. et al. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25–27 June 2003, Vienna, Austria. **Vaccine**, v. 23, n. 7, p. 849–856, jan. 2005.

HALSTEAD, S. B. Immune enhancement of viral infection. *In*: **Progress in Allergy**, v. 31, p. 301–364, 1982.

HALSTEAD, S. B.; COHEN, S. N. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 281–291, 2015. DOI: 10.1128/MMBR.00009-15.

HORSTICK, O. et al. WHO Dengue Case Classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 1, p. 19–25, 2015. DOI: 10.1179/2047773215Y.0000000003.

HOSANGADI, D. **The Global Rise of Dengue Infections**. Disponível em: <<https://www.outbreakobservatory.org/outbreakthursday-1/3/21/2019/the-global-rise-of-dengue-infections>>. Acesso em: 18 jan. 2021.

HOTTZ, E. D. et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 5, p. 951–962, 2013. DOI: 10.1111/jth.12178.

HOTTZ, E. D. et al. Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 4, p. 1864–1872, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1400091.

HOWELL, W. H. Observations upon the occurrence, structure, and function of the giant cells of the marrow. **Journal of Morphology**, v. 4, n. 1, p. 117–130, 1890.

HOWELL, W. H.; DONAHUE, D. D. The production of blood platelets in the lungs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 2, p. 177–204, 1937. DOI: 10.1084/jem.65.2.177.

HSU, A. Y. H. et al. Infectious dengue vesicles derived from CD61+ cells in acute patient plasma exhibited a diaphanous appearance. **Scientific Reports**, v. 5, n. July, p. 1–8, 2015. DOI: 10.1038/srep17990.

HUGHES, K. T.; BEASLEY, M. B. Pulmonary manifestations of acute lung injury more than just diffuse alveolar damage. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 7, p. 916–922, 2017. DOI: 10.5858/arpa.2016-0342-RA.

INFODENGUE. **INFO Dengue Ceará**. Disponível em: <<https://info.dengue.mat.br/alerta/CE/dengue>>. Acesso em: 10 set. 2023.

JESSIE, K. et al. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 2004. DOI: 10.1086/383043.

KAPTEIN, S. J. F. et al. A pan-serotype dengue virus inhibitor targeting the NS3–NS4B interaction. **Nature**, v. 598, n. 7881, p. 504–509, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03990-6.

KAUFMAN, R. M. et al. Circulating Megakaryocytes and Platelet Release in the Lung. **Blood**, v. 26, n. 6, p. 720–731, 1965a.

KAUFMAN, R. M. et al. Origin of Pulmonary Megakaryocytes. **Blood**, v. 25, n. 5, p. 767–775, 1 maio 1965b.

KAUR, J. et al. Title: Megakaryopoiesis in Dengue virus infected K562 cell promotes viral replication which inhibits 1 endomitosis and accumulation of ROS associated with differentiation 2. **bioRxiv**, 26 jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.06.25.172544>.

- KAUR, J. et al. Replication of Dengue Virus in K562-Megakaryocytes Induces Suppression in the Accumulation of Reactive Oxygen Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 11 jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.784070>
- KE, P. Y. The multifaceted roles of autophagy in flavivirus-host interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018. DOI: 10.3390/ijms19123940.
- KOUPENOVA, M.; LIVADA, A. C.; MORRELL, C. N. Platelet and Megakaryocyte Roles in Innate and Adaptive Immunity. **Circulation Research**, vol. 130 (2), p. 288-308, 2022. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319821.
- LAUGHLIN, C. A. et al. Dengue Research Opportunities in the Americas. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 7, p. 1121–1127, 1 out. 2012. DOI: 10.1093/infdis/jis351.
- LEFRANÇAIS, E. et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. **Nature**, v. 544, n. 7648, p. 105–109, 22 abr. 2017. DOI: 10.1038/nature21706.
- LEI, H. Y. et al. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **Journal of Biomedical Science**, v. 8, n. 5, p. 377–388, 2001.
- LEONG, A. S.-Y. et al. The pathology of dengue hemorrhagic fever. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 24, n. 4, p. 227–236, nov. 2007.
- LIBRATY, D. H. et al. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, 15 out. 2002.
- LIMONTA, D. et al. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. **Journal of Clinical Virology**, v. 40, n. 1, p. 50–54, 2007. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.04.024
- LIMONTA, D. et al. Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. **Infection**, v. 40, n. 6, p. 689–694, 2012. DOI: 0.1007/s15010-012-0260-7.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 2–3, 2019. DOI: 10.1099/jgv.0.000672.
- LINDENBACH, Brett D.; RICE, Charles M. **The Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution**. San Diego, California: Advances in Virus Research, v. 59, 2003.
- LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. Em: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 5th Editio ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007. p. 1101–1152.
- MALAVIGE, G N. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 948, p. 588–601, 2004.
- MANOKARAN, Gayathri *et al.* Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. **Science**, v. 350, n. 6257, p. 217–221, 2015. DOI: 10.1126/science.aab3369

MARQUES, R. E. et al. Dengue virus requires the CC-chemokine receptor CCR5 for replication and infection development. **Immunology**, v. 145, n. 4, p. 583–596, 2015. DOI: 10.1111/imm.12476.

MESSINA, J. P. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 10 set. 2019. DOI: 10.1038/s41564-019-0476-8.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clinical neuropathology**, v. 16, n. 4, p. 204–8, 22 jun. 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre Hemorrágica da Dengue e Apresentações Graves: Definição e Rotina de Investigação**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=1030-febre-hemorragica-da-dengue-e-apresentacoes-graves-definicao-e-rotina-investigacao-0&category_slug=dengue-964&Itemid=965>. Acesso em: 28 mar. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. **Dengue : diagnóstico e manejo clínico : adulto e criança [recurso eletrônico]**. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/dengue-manejo-adulto-crianca-5d.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde alerta para aumento de 149% dos casos de dengue no país. **Ministério da Saúde, Brasil**, [s. l.], p. 2020, 2019. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45257-ministerio-da-saude-alerta-para-aumento-de-149-dos-casos-de-dengue-no-pais>>. Acesso em 13 set. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 34. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil**, v. 50, n. 22, p. 1–11, 2019.

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

MORAGAS, L. J. **ESTUDO DA IMUNOPATOGENESE EM MÚLTIPLOS ÓRGÃOS DE CASOS FATAIS DE DENGUE EM CRIANÇAS: DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL, PERFIL DE CITOCINAS E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**. Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical—Rio de Janeiro : Fundação e Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), fev. 2020.

NACHER, M. et al. Simultaneous dengue and COVID-19 epidemics: Difficult days ahead? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008426, 14 ago. 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008426.

NANAWARE, N. et al. Dengue virus infection: A tale of viral exploitations and host responses. **Viruses**, vol. 13 (10), p. 1967, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13101967>

NASCIMENTO, C. S. et al. Impactos no perfil epidemiológico da Dengue em meio a Pandemia da COVID-19 em Sergipe. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e3610514544, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14544>.

- NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virology Journal**, v. 6, p. 1–7, 2009. DOI: 10.1186/1743-422X-6-211.
- NOETZLI, L. J.; FRENCH, S. L.; MACHLUS, K. R. New insights into the differentiation of megakaryocytes from hematopoietic progenitors. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 7, p. 1288–1300, 2019. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312129.
- NOISAKRAN, S. et al. A potential role of platelets in maturation of dengue virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2009.
- NOISAKRAN, S. et al. Cells in Dengue Virus Infection In Vivo. **Advances in Virology**, v. 2010, p. 1–15, 2010.
- NOISAKRAN, S. et al. Infection of bone marrow cells by dengue virus invivo. **Experimental Hematology**, v. 40, n. 3, p. 250–259, 2012a.
- NOISAKRAN, S. et al. Role of CD61+ cells in thrombocytopenia of dengue patients. **International Journal of Hematology**, v. 96, n. 5, p. 600–610, 2012b. DOI: 10.1007/s12185-012-1175-x.
- BRAGA, D. E. M. N. **Aspectos laboratoriais e anatomopatológicos no diagnóstico da dengue no Ceará em 2011 e 2012: papel do serviço de verificação de óbitos de Fortaleza UFC – Faculdade de Medicina**, 2014.
- NUNES, P. C. G. et al. Detection of dengue NS1 and NS3 proteins in placenta and umbilical cord in fetal and maternal death. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 8, p. 1448–1452, ago. 2016. DOI: 10.1002/jmv.24479.
- OJHA, A. et al. Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. August 2016, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1038/srep41697.
- OPAS/OMS, **Dengue Info**. [S. l.], 2023. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/dengue#info>>. Acesso em: 10 set. 2023.
- PACHECO, M. R. et al. Morfologia da megacariocitopoiese esplênica em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, no final da gestação e pós-natal. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 25, n. 1, 17 abr. 2003. DOI: 10.4025/actascianimsci.v25i1.2126.
- PACKARD, R. M. The Fielding H. Garrison Lecture: “Break-Bone” Fever in Philadelphia, 1780: Reflections on the History of Disease. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 90, n. 2, p. 193–221, 2016. DOI: 10.1353/bhm.2016.0041.
- PATEL, S. R.; HARTWIG, J. H.; ITALIANO, J. E. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. **Journal of Clinical Investigation**, dez. 2005. DOI: 10.1172/JCI26891.
- PATRO, A. R. K. et al. Cytokine Signature Associated with Disease Severity in Dengue. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 34, 8 jan. 2019. DOI: 10.3390/v11010034.
- PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. S12, p. S30–S37, dez. 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2459.

PINHO, A. C. O. **Diagnóstico E Caracterização Molecular Do Vírus Dengue Circulante na Cidade De Salvador, Bahia, Brasil**. Dissertação de Mestrado—Universidade Federal da Bahia, 2013.

POLIZEL, J.R. *et al.* Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 559–562, 2004

PÓVOA, T. F. *et al.* The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: Histopathology, ultrastructure and virus replication. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0083386.

PRYZDIAL, E. L. G.; LIN, B. H.; SUTHERLAND, M. R. Virus–Platelet Associations. **Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders**, p. 1085–1102, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-47462-5_72.

PRYZDIAL, E. L. G.; SUTHERLAND, M. R.; SIMON, A. Y. Dengue virus replication by platelets. **Blood**, v. 126 (3), p. 378-385, 2017. DOI: 10.1182/blood-2014-09-598029.

QI, R.; ZHANG, L.; CHI, C. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, n. 2, p. 91–101, fev. 2008.

RAADSEN, M. *et al.* Thrombocytopenia in Virus Infections. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 4, p. 877, 2021. DOI: 10.3390/jcm10040877.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, 6 ago. 2010. DOI: 10.1007/s00018-010-0357-z.

ROTHMAN, A. L. Dengue: Defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 946–951, 2004. DOI: 10.1172/JCI21512.

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

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, MARIA TERESA VILLELA; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3. Ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SANYAOLU, A. Global Epidemiology of Dengue Hemorrhagic Fever: An Update. **Journal of Human Virology & Retrovirology**, v. 5, n. 6, 24 out. 2017. DOI: 10.15406/jhvr.2017.05.00179.

SCHNETTLER, E. *et al.* Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13486–13500, 2012. DOI: 10.1128/JVI.01104-12.

SCHULZE, H.; SHIVDASANI, R. A. Molecular Mechanisms of Megakaryocyte Differentiation. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, vol. 30 (4), 389-398, 2004.

SERUFO, J. C. *et al.* Dengue: uma nova abordagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 465–476, 2000.

SHAFEE, N.; ABUBAKAR, S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 8, p. 2191–2195, 2003.

SHARMA, G. K.; TALBOT, I. C. Pulmonary megakaryocytes: “missing link” between cardiovascular and respiratory disease? **Journal of Clinical Pathology**, v. 39, p. 969–976, 1986.

SILVEIRA, P. A. A. et al. Megakaryocyte. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 2, p. 247–248, 2011.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423–1432, 2012.

SIMON, A. Y.; SUTHERLAND, M. R.; PRYZDIAL, E. L. G. Dengue virus binding and replication by platelets. **Blood**, v. 126, n. 3, p. 378–385, 16 jul. 2015. DOI: 10.1182/blood-2014-09-598029.

SINGH, S. K. R. et al. A study on the bleeding tendencies in patients diagnosed with dengue fever in a tertiary care hospital of southern bihar. **International Journal of Health and Clinical Research** v. 4 (6), p. 300–304, 2021.

SOTCHEFF, S.; ROUTH, A. Understanding flavivirus capsid protein functions: The tip of the iceberg. **Pathogens**, vol. 9 (1), p.42, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9010042.

SOUSA, E. T. DE. **Alterações histopatológicas e imuno-histoquímicas miocárdicas em 117 casos fatais de dengue**. Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

SRIKIATKHACHORN, A.; KELLEY, J. F. Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever. **Antiviral Research**, v. 109, n. 1, p. 160–170, set. 2014.

ST. JOHN, A. L. Influence of Mast Cells on Dengue Protective Immunity and Immune Pathology. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1–4, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003783>.

ST. JOHN, A. L.; RATHORE, A. P. S. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 4, p. 218–230, 2019. DOI: 10.1038/s41577-019-0123-x.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 10, p. 2755–2766, 1 out. 2006.

SUZANA MONT’ALVERNE. **Ceará reduz notificação de arboviroses em 66% e SESA reforça medidas de prevenção**. Disponível em: <https://www.ceara.gov.br/2021/03/09/prevencao-contradengue-zika-e-chikungunya-reduz-fluxo-nas-unidades-de-saude/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

SZALAI, G.; LARUE, A. C.; WATSON, D. K. Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 21, p. 2460–2476, 2006.

TANG, W. W.; GREWAL, R.; SHRESTA, S. Influence of antibodies and T cells on dengue disease outcome: insights from interferon receptor-deficient mouse models. **Current Opinion in Virology**, v. 13, p. 61–66, ago. 2015. DOI: 10.1016/j.coviro.2015.04.007.

TARANTINO, D. et al. Targeting flavivirus RNA dependent RNA polymerase through a pyridobenzothiazole inhibitor. **Antiviral Research**, v. 134, p. 226–235, out. 2016. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.09.007.

TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000-2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013. DOI 10.1371/journal.pntd.0002520.

THACHIL, J. The lung megakaryocytes and pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. **Medical Hypotheses**, v. 72, n. 3, p. 291–293, 2009. DOI: 10.1016/j.mehy.2008.09.045.

THACHIL, J.; LISMAN, T. Pulmonary Megakaryocytes in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Roles in Thrombi and Fibrosis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 46, n. 7, p. 831–834, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0040-1714274>.

THEIN, S. et al. Risk Factors in Dengue Shock Syndrome. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 5, p. 566–572, 1997.

TORRES, E. M. **Dengue**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.

TROWBRIDGE, A.; SLATER, D.; MARTIN, J. Letters to the Editor: Link between pulmonary megakaryocytes and cardiovascular and respiratory disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 468–469, 1 abr. 1987.

TISONCIK, Jennifer R. *et al.* Into the Eye of the Cytokine Storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 16–32, 2012. DOI: 10.1128/MMBR.05015-11.

VALDIVIA-MAZEYRA, M. F. et al. Increased number of pulmonary megakaryocytes in COVID-19 patients with diffuse alveolar damage: an autopsy study with clinical correlation and review of the literature. **Virchows Archiv**, v. 478, n. 3, p. 487–496, 2021. DOI: 10.1007/s00428-020-02926-1.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Dengue epidemic in a Northeastern Brazil: Random epidemiological serum survey. **Revista de Saude Publica**, v. 32, n. 5, p. 447–454, 1998.

VOGT, M. B. et al. Dengue viruses infect human megakaryocytes, with probable clinical consequences. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007837.

WELSCH, S. et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 4, p. 365–375, 2009. DOI: 10.1016/j.chom.2009.03.007.

WIWANITKIT, V. Lung Disease in Dengue. **J. of Respiratory Res.** v. 1 (1), p. 7–9, 2015. DOI: 10.17554/j.issn.2412-2424.2015.01.1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DENGUE: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New Edition**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <www.who.int/tdr>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue Key facts Global burden of dengue Distribution and outbreaks of dengue Disease characteristics (signs and symptoms)

Vaccination against dengue. n. March, p. 2020, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 12 fev. 2022.

WORLD MOSQUITO PROGRAM. **Dengue Fact Sheet**. Disponível em: <<https://www.worldmosquitoprogram.org/en/learn/mosquito-borne-diseases/dengue>>. Acesso em: 16 fev. 2021.

WRAMMERT, J. et al. Rapid and Massive Virus-Specific Plasmablast Responses during Acute Dengue Virus Infection in Humans. **Journal of Virology**, v. 86, n. 6, p. 2911–2918, 15 mar. 2012. DOI: 10.1128/JVI.06075-11.

ZENG, Z. et al. Global, regional, and national dengue burden from 1990 to 2017: A systematic analysis based on the global burden of disease study 2017. **EClinicalMedicine**, v. 000, n. 2020, p. 100712, 2021. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100712.

ZHANG, W. et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 10, n. 11, p. 907–912, 2003.

ZUBAIR, M. et al. Dengue viral infections in Pakistan and other Asian countries: a comprehensive review. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 66, n. 7, p. 884–8, jul. 2016.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: QUANTIFICAÇÃO DE MEGACARIÓCITOS E IDENTIFICAÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL DA DENGUE NO PULMÃO DE ADULTOS NOS CASOS FATAIS DE DENGUE

Pesquisador: RENATA LIMA LOPES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34438320.8.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.144.913

Apresentação do Projeto:

A dengue é uma doença viral que vem crescendo mundialmente de forma preocupante nas últimas décadas, cerca de 15 vezes mais, sendo o ano de 2019 o de maior número de registro de casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Esse crescente número de casos indica que a dengue continua sendo negligenciada e permanecendo como uma grande ameaça a saúde pública mundial, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais (Qi; ZHANG; CHI, 2008).

Este projeto tem como finalidade a quantificação dos megacariócitos e a identificação da proteína não estrutural (NS3) em casos fatais de dengue grave para se obter um maior entendimento da fisiopatologia desta arbovirose tropical.

Objetivo da Pesquisa:

Geral

-Avaliar a presença e a quantidade de megacariócitos pulmonares nos casos fatais de dengue, o índice de replicação de vírus da dengue nos megacariócitos pulmonares, e relação laboratorial e clínico-patológicas.

4.2. Objetivos Específicos

1. Quantificar os megacariócitos nos pulmões dos pacientes com dengue e nos controles;

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

CEP: 80.430-275

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.144.913

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 09 de Julho de 2020

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 4.144.913

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Enviar o relatório final ao concluir a pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1524994.pdf	01/07/2020 08:32:33		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	10_PROJETO_MESTRADO_RENATA_CEP.pdf	01/07/2020 08:30:07	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Outros	5_TERMOS_DE_COMPROMISSO_PARA_UTILIZACAO_DE_DADOS_Assinado.pdf	01/07/2020 08:29:36	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Outros	7_Declaracao_de_fiel_depositario_ASSINADO.pdf	01/07/2020 08:27:47	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Outros	6_Autorizacao_do_SVO_ASSINADO.pdf	01/07/2020 08:25:39	RENATA LIMA LOPES	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_SOLICITACAO_DE_DISPENSA_DE_TCLE_Assinado.pdf	01/07/2020 08:23:40	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	2_CARTA_DE_SOLICITACAO_DE_APROVACAO_CEP_PROPESQ_Assinado.pdf	01/07/2020 08:22:56	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Parecer Anterior	11_PARECER_DO_PROJETO_ANTERIOR.pdf	01/07/2020 08:19:49	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Orçamento	9_ORCAMENTO_Assinado.pdf	01/07/2020 08:15:12	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Declaração de concordância	3_DECLARACAO_DE_CONCORDANCIA_DOS_PARTICIPANTES_Assinado.pdf	01/07/2020 08:14:22	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Cronograma	8_CRONOGRAMA_Assinado.pdf	01/07/2020 08:11:42	RENATA LIMA LOPES	Acelto
Folha de Rosto	1_FOLHA_DE_ROSTO_PLATAFORMA_BRASIL_ASSINADA.pdf	01/07/2020 08:04:18	RENATA LIMA LOPES	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 4.144.913

2. Relacionar a presença megacariócitos com o número plaquetas do sangue;
3. Identificar sinais e sintomas de hemorragia dos pacientes relacionando-os com quantidade de plaquetas no sangue e a população de megacariócitos pulmonares (infetados ou não) e os achados clínico-patológicos da dengue grave (Relação histomorfometria dos megacariócitos x plaquetas x controle);
4. Identificar a proteína não estrutural 3 (NS3) nos megacariócitos pulmonares - indicativo de replicação viral do vírus da dengue nos megacariócitos (Relação Histomorfometria megacariócitos x NS3 x controle)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

-Como o dano ao cadáver por ser de qualquer natureza há necessidade de reconhecer que devemos estar em constante vigilância e buscando alternativas para corrigi-los e comunicar ao CEP qualquer problema ou alteração da pesquisa que se faça necessário.

Benefícios:

Considerando que a hemorragia é um dos principais problemas da dengue severa, inclusive podendo levar a morte, o melhor esclarecimento do mecanismo envolvido nesta patologia poderá contribuir para uma melhor condução clínica dos pacientes com dengue

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto em questão está bem escrito, de boa leitura e entendimento. Está incluído desenho do estudo, introdução, revisão, objetivos, metodologia, cronograma de atividades, orçamento e outros. A documentação exigida pela RESOLUÇÃO 466/2012/CNS/MS que regulamenta os estudos aplicados aos seres humanos está incluída.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação do trabalho estão coerentes com o tema abordado e o rigor da ética em pesquisa.

Recomendações:

O projeto de pesquisa está devidamente instruído para que o mesmo seja executado. Portanto o parecer é favorável à sua APROVAÇÃO.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO

The image shows two screenshots of a web browser displaying the ARCHIVES of Pathology & Laboratory Medicine website. The top screenshot shows the homepage with a warning message and a 'Home' link. The bottom screenshot shows the 'Detailed Status Information' for a specific manuscript.

ARCHIVES of Pathology & Laboratory Medicine
ONLINE MANUSCRIPT SUBMISSION & PEER REVIEW

Please do not click the "Back" button. If you click the "Back" button, your data may be lost. You may click the "Home" link at any time to return to your Home Page.

[Home](#)

Live Manuscripts
[Check Status # 2022-0504-OA 1 days](#)

For assistance, please contact the editorial office. E-mail: archivesofpathology@cap.org

eJournalPress
© 2022 eJournalPress.
[Terms of Service](#)
Licensed under Patent #US 7,620,555B1

Detailed Status Information

Manuscript #	2022-0504-OA
Current Revision #	0
Submission Date	2022-12-02 11:42:58
Current Stage	Initial QC Started
Title	Nonstructural protein 3 expression in human pulmonary megakaryocytes in fatal dengue cases.
Running Title	NS3 expression in human pulmonary megakaryocytes
Manuscript Type	Original Article
Special Section	N/A
Manuscript Comment	The article is a part of a Masters project. There are 2 figures for the article. One containing graphics and another with electron microscopy pictures with stains and immunohistochemistry.
Corresponding Author	Dr. Renata Lopes (Universidade Federal do Ceará)
Contributing Authors	Dr. Fernanda Barroso, Dr. Margarida Pompeu, Ms. Priscila Nunes, Dr. Joel Borges Filho, Ms. Maria Silveira, Prof. Romélia Lemes, Dr. José Queiroz