

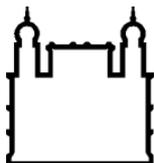
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ESTUDO DA IMUNOPATOLOGIA NO CÉREBRO/CEREBELO DE  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM DENV-2 POR VIA  
INTRAVENOSA E EM CASOS FATAIS: HISTOPATOLOGIA,  
DETECÇÃO VIRAL E CITOCINAS.

NATÁLIA GEDEÃO SALOMÃO

Rio de Janeiro  
Janeiro de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

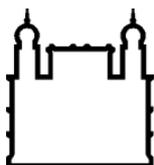
*NATÁLIA GEDEÃO SALOMÃO*

Estudo da imunopatologia no cérebro/cerebelo de camundongos infectados com DENV-2 por via intravenosa e em casos fatais: histopatologia, detecção viral e citocinas.

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

**Orientadores:** Dr<sup>a</sup> Flávia Barreto dos Santos  
Dr. Marciano Viana Paes

**RIO DE JANEIRO**  
Janeiro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTORA: NATÁLIA GEDEÃO SALOMÃO***

**ESTUDO DA IMUNOPATOLOGIA NO CÉREBRO/CEREBELO DE  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM DENGUE-2 POR VIA INTRAVENOSA  
E EM CASOS FATAIS: HISTOPATOLOGIA, DETECÇÃO VIRAL E  
CITOCINAS.**

**ORIENTADORES:** Dr<sup>a</sup> Flávia Barreto dos Santos  
Dr. Marciano Viana Paes

**Aprovada em: 18/01/2018**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marcelo Pelajo - Presidente (FIOCRUZ)**

**Profa. Dra. Flavia Regina Lima – Revisora/Suplente (UFRJ)**

**Prof. Dr. Jorge José de Carvalho - Membro (UERJ)**

**Profa. Dra. Andrea Henrique Pons – Membro (FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Filipe Anibal - Suplente (FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 18 de janeiro de 2018

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha saúde, pela paz do meu lar e pelas pessoas especiais que Ele coloca em meu caminho. Tudo isto contribui, e muito, para a leveza de cada dia e para o desenvolvimento de um trabalho como este.

À minha família: mãe, pai e irmã. Minha mãe, minha maior admiração. Mulher-maravilha, que é mãe, amiga, dona de casa e trabalhadora... muitas coisas em uma só pessoa. Meu pai, que deu um susto em nós neste final de mestrado, mas que graças a Deus está entre nós. Obrigada pela sua preocupação e amor. Minha irmã, minha chatinha preferida, que torce por mim a cada dia.

À extensão da minha família: meu noivo e meus sogros. Deus os colocou em meu caminho como um presente. Diogo, meu refúgio dos momentos de tensão. Sempre pronto pra dar amor e carinho, e me proporcionar momentos de alegria. Meus sogros, que são os pais postiços. Fazem de tudo pra agradar e facilitar qualquer coisa.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED), e a chefe Dra. Alda Maria, que receberam a mim e meu orientador de braços abertos.

Ao meu querido orientador, Dr. Marciano Viana. Agradeço pela nossa relação de trabalho e amizade, sempre tranquila e saudável. Desde 2013, ele é o grande responsável e incentivador de minhas conquistas. Obrigada pela dedicação ao nosso trabalho. Que venha a próxima etapa!

À Dra. Flavia Barreto, que possibilitou que este trabalho fosse realizado me adotando como uma de suas filhas biólogas rs.

Às doutorandas Kíssila e Priscila; alunas de iniciação científica Carol e Júlia e ao Dr. Edson. Pessoas que estiveram sempre dispostas a ajudar no andamento deste trabalho.

Ao Dr. Antônio Gonçalves do LIPMED pelas inoculações no experimento murino. À Dra. Simone Costa do LABIFIV pela produção da massa viral do DENV-2.

Aos profissionais do Hospital Gaffrée e Guinle (HUGG – UNIRIO). Geraldo, sempre salvando nas emergências para obtermos bons cortes de tecido. Ao Dr. Basílio de Oliveira pela boa receptividade em seu espaço.

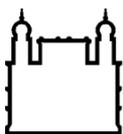
Aos integrantes do Laboratório de Biologia das Células Gliais (UFRJ): Dra. Flavia Lima, por auxiliar no andamento do trabalho e por ser a revisora desta dissertação. À Dra. Celina Garcia e ao doutorando Luiz Geraldo, pelo auxílio nos experimentos “*in vitro*”.

Ao curso de Pós-graduação de Medicina Tropical, por contribuir para minha formação. Sem esquecer a coordenadora e a secretária do curso: Dra. Martha Mutis e Livia Mangeon, sempre dispostas a resolver nossos problemas.

À banca examinadora, por ter aceitado o convite. É um momento muito importante na vida de um aluno, então agradeço pela presença e colaboração neste trabalho.

“Sucesso é questão de atitude.  
Quando você decidir fazer alguma coisa, faça o seu melhor e faça até o fim”

Surama Jurdi



Ministério da Saúde

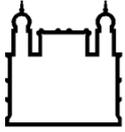
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**ESTUDO DA IMUNOPATOLOGIA NO CÉREBRO/CEREBELO DE CAMUNDONGOS  
INFECTADOS COM DENGUE-2 POR VIA INTRAVENOSA E EM CASOS FATAIS:  
HISTOPATOLOGIA, DETECÇÃO VIRAL E CITOCINAS**

**RESUMO (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL)  
NATÁLIA GEDEÃO SALOMÃO**

O vírus da dengue não é mais considerado um vírus não-neurotrópico, já que nas últimas epidemias, manifestações neurológicas estão se tornando cada vez mais comuns, como encefalopatias, encefalites, síndromes imuno-mediadas (mielite transversa aguda, encefalomielite aguda disseminada e síndrome de Guillain-Barré), disfunção muscular e desordens neuroftálmicas. Para avançar neste campo, alguns modelos animais estão sendo desenvolvidos, mesmo com a falta de um modelo animal imunocompetente para dengue que mimetize a doença como nos humanos. O objetivo deste trabalho foi comparar os achados do modelo murino com casos fatais de dengue, no que se refere à histopatologia, detecção de antígenos virais e citocinas envolvidas. Camundongos BALB/c foram infectados com DENV-2 não-neuroadaptado pela via intravenosa. Coloração histológica, microscopia eletrônica e imunohistoquímica foram realizadas no modelo murino para caracterizar os aspectos histopatológicos e ultraestruturais e detecção de antígenos virais e citocinas. Os animais infectados não exibiram sinais clínicos, mas a análise histopatológica do cérebro e cerebelo revelou principalmente áreas com infiltrados inflamatórios, gliose, hemorragia e edema. Células gliais (microglia e astrócitos) estavam alteradas em sua morfologia e quantidade, sugerindo ativação em decorrência da infecção. A replicação viral ocorreu em células endoteliais, microglia e neurônios dos animais infectados. A avaliação ultraestrutural mostrou neurônios, microglia e astrócitos com alterações indicativas de apoptose. Além disso, células CD8<sup>+</sup> e citocinas, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e RANTES, que podem estar envolvidas na neuropatogênese da dengue, também foram detectadas. Em experimentos "*in vitro*", culturas de células neurais mistas foram infectadas com DENV-2, e a evidência da replicação do vírus foi mostrada pela detecção da proteína NS3, uma proteína não-estrutural, que esteve presente em microglia. Além do modelo animal, os casos fatais de DENV-2 e DENV-3 foram investigados. A análise histopatológica mostrou dano tecidual e células neuronais alteradas, diferente do controle. O recrutamento de microglia, células CD8<sup>+</sup>, antígenos virais e citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e RANTES) também foram detectados. Ainda neste contexto, a barreira hematoencefálica foi caracterizada no modelo murino e em casos fatais, onde as células endoteliais foram detectadas em áreas com disfunção vascular. De uma maneira geral, estes achados irão contribuir para o melhor entendimento sobre os principais tecidos e células do sistema nervoso central, envolvidos na patogênese da dengue em correlação com os estudos de amostras de tecidos de casos fatais, contribuindo significativamente para o conhecimento da doença, novas vacinas e métodos terapêuticos contra a doença.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

STUDY OF IMMUNOPATHOLOGY IN THE BRAIN/CEREBELLUM OF DENGUE-2 INFECTED MICE BY INTRAVENOUS ROUTE AND IN FATAL CASES: HISTOPATHOLOGY, VIRAL DETECTION AND CYTOKINES

**ABSTRACT (MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL)**  
**NATÁLIA GEDEÃO SALOMÃO**

Dengue virus is not considered a non-neurotropic virus anymore, as in the last epidemics neurological manifestations are becoming more common, such as encephalopathy, encephalitis, immune-mediated syndromes (acute transverse myelitis, disseminated acute encephalomyelitis and Guillain-Barré syndrome), muscle dysfunction and neuro-ophthalmic disorders. To advance in this field, some animal models are being developed, even with the lack of an immunocompetent animal model for dengue mimicking the disease in humans. The objective of this work was to compare the findings of mouse model with fatal cases of dengue, with regard to histopathology, viral antigens and cytokines involved detections. BALB/c mice were infected with non-neuroadapted DENV-2 by intravenous route. Histological staining, electron microscopy and immunohistochemistry assay were performed in murine model to characterize histopathology and ultrastructural aspects, virus antigens and cytokines detection. The infected animals did not exhibit clinical signs, but the histopathological analysis of the brain and cerebellum revealed mainly inflammatory infiltrate, gliosis, hemorrhage and edema areas. Glial cells (microglia and astrocytes) were altered in morphology and quantity, suggesting their activation due to infection. The virus replication occurred in endothelial cells, microglia and neurons of the infected animals. Ultrastructural evaluation showed neurons, microglia and astrocytes with changes leading to apoptosis. In addition, CD8<sup>+</sup> cells and cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and RANTES, which may be involved in neuropathogenesis of dengue, were also detected. In “*in vitro*” experiments, mixed cell neural cultures were infected with DENV-2, and the evidence of virus replication was shown by NS3 protein detection, a non-structural protein, that were present in microglia. Besides the animal model, fatal cases of infection of DENV-2 and DENV-3 were investigated. The histopathological analysis showed tissue damage; and neuronal cells altered, different from the control. The recruitment of microglia, CD8<sup>+</sup> cells, viral antigens and cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and RANTES) were also detected. Still in this context, the blood-brain barrier was characterized in the murine model and in the fatal cases, where endothelial cells were detected in vascular dysfunction areas. In general, these findings will help in a better understanding about the main tissues and cells of the central nervous system involved in the pathogenesis of dengue in correlations with studies of tissue samples from fatal cases, thus contributing significantly to the knowledge of the disease, and to new vaccine or therapeutic approaches against the disease.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Dengue e epidemiologia.....	1
1.1.1 No mundo.....	1
1.1.2 No Brasil.....	2
1.2 O vírus.....	3
1.3 A infecção .....	4
1.4 Proteínas virais.....	6
1.4.1 Proteínas estruturais .....	6
1.4.2 Proteínas não estruturais .....	7
1.4.2.1 Proteína NS3 .....	8
1.5 A doença (manifestações clínicas).....	9
1.6 Patogênese e resposta imune em infecções por dengue.....	11
1.6.1 Neuropatogênese e resposta imune do SNC em infecção por dengue .....	14
1.7 Histologia .....	16
1.7.1 Cérebro e cerebelo.....	16
1.7.2 Hipocampo .....	18
1.8 Células da neuroglia.....	20
1.8.1 Microglia .....	20
1.8.2 Astrócitos.....	20
1.9 Barreira hematoencefálica (BHE).....	22
1.10 Modelos experimentais .....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral .....	27
3.2 Objetivos específicos .....	27

<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1 O vírus .....	28
4.2 Infecção experimental.....	28
4.3 Procedimentos éticos.....	29
4.4 Processamento do material histológico.....	29
4.5 Coloração Hematoxilina e Esosina (H.E.) .....	30
4.6 Análises histopatológicas .....	30
4.7 Imunohistoquímica.....	30
4.8 Infecção em cultura primária de células do sistema nervoso e imunocitoquímica.....	32
4.9 Microscopia eletrônica .....	33
4.10 Análises estatísticas .....	33
4.11 Descrição do controle humano utilizado e dos casos fatais de dengue .....	34
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
5.1 Avaliação histopatológica do cérebro de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v. ....	36
5.2 Avaliação histopatológica do cerebelo de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v. ....	38
5.3 Detecção de microglia e astrócitos no cérebro de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v. ....	39
5.4 Detecção da proteína NS3 no tecido cerebral e cerebelar de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v. ....	41
5.5 Avaliação ultraestrutural do cérebro de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v. ....	43
5.6 Avaliação ultraestrutural do cerebelo de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v. ....	45
5.7 Detecção de citocinas e marcação de célula endotelial em área vascular de barreira hematoencefálica no tecido cerebral de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v.....	47
5.8 Detecção da proteína NS3 em cultura primária de células neurais infectadas com DENV-2 .....	49
5.9 Avaliação histopatológica do tecido cerebral de casos fatais de dengue.....	49
5.10 Detecção de células da microglia no tecido cerebral de casos fatais.....	51

5.11 Detecção de astrócitos em tecido nervoso de casos fatais.....	52
5.12 Detecção de células TCD8 <sup>+</sup> e macrófagos em geral no tecido nervoso de casos fatais.....	54
5.13 Detecção dos antígenos 3H5 (DENV-2) e DENV-3 no tecido nervoso de casos fatais.....	55
5.14 Detecção da proteína NS3 em tecido nervoso de casos fatais.....	57
5.15 Detecção de citocinas pró-inflamatórias e região de barreira hematoencefálica no tecido nervoso dos casos fatais.....	59
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>93</b>
9.1 Documentação CEUA e CEP .....	93
9.2 Artigos publicados durante o mestrado .....	101

## ÍNDICE DAS FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Regiões do mundo com evidência de risco de infecção pelo vírus da dengue .....	2
<b>Figura 1.2:</b> Estrutura da partícula do vírus da dengue.....	3
<b>Figura 1.3:</b> Genoma do vírus dengue.....	4
<b>Figura 1.4:</b> Ciclo replicativo do vírus da dengue.....	6
<b>Figura 1.5:</b> Classificação clínica da Dengue.....	11
<b>Figura 1.6:</b> Esquema do córtex cerebral.....	17
<b>Figura 1.7:</b> Esquema do tecido cerebelar.....	18
<b>Figura 1.8:</b> Esquema do hipocampo.....	19
<b>Figura 1.9:</b> Esquema de células da neuroglia .....	21
<b>Figura 1.10:</b> Esquema da barreira hematoencefálica.....	23
<b>Figura 5.1:</b> Alterações histopatológicas no tecido cerebral dos camundongos infectados com DENV-2.....	37
<b>Figura 5.2:</b> Alterações histopatológicas no tecido cerebelar dos camundongos infectados com DENV-2.....	38
<b>Figura 5.3:</b> Caracterização e quantificação de células da microglia e astrócitos no tecido cerebral de camundongos <i>mock</i> e infectados.....	40
<b>Figura 5.4:</b> Detecção da proteína NS3 no tecido cerebral e cerebelar de camundongos infectados.....	42
<b>Figura 5.5:</b> Alterações ultraestruturais no cérebro de camundongos infectados.....	44
<b>Figura 5.6:</b> Alterações ultraestruturais no cerebelo de camundongos infectados.....	46
<b>Figura 5.7:</b> Detecção de citocinas e célula endotelial em área de BHE no tecido cerebral de camundongos infectados com DENV-2.....	48
<b>Figura 5.8:</b> Detecção da proteína NS3 em cultura de células neuronais mistas.....	49
<b>Figura 5.9:</b> Avaliação histopatológica do tecido cerebral de casos fatais de dengue.....	50
<b>Figura 5.10:</b> Detecção de células da microglia no tecido cerebral humano proveniente de casos fatais de dengue.....	51

<b>Figura 5.11:</b> Detecção de astrócitos no cérebro/cerebelo proveniente de casos fatais de dengue.....	53
<b>Figura 5.12:</b> Caracterização da região de barreira hematoencefálica nos casos fatais de dengue.....	54
<b>Figura 5.13:</b> Detecção dos antígenos 3H5 e DENV-3 nos casos fatais de dengue.....	56
<b>Figura 5.14:</b> Detecção da proteína NS3 em tecido nervoso humano proveniente de casos fatais de dengue.....	58
<b>Figura 5.15:</b> Detecção de células CD8 <sup>+</sup> e citocinas pró-inflamatórias em tecido cerebral de caso fatal de DENV-2 e DENV-3.....	60

## **ÍNDICE DAS TABELAS**

**Tabela 1.1:** Anticorpos utilizados em tecido murino.....31

**Tabela 1.2:** Anticorpos utilizados em tecido humano.....35

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	Aumento da replicação viral dependente de anticorpos (do inglês " <i>antibody dependente enchancement</i> ")
BBB	Barreira hematoencefálica (do inglês " <i>blood brain barrier</i> ")
BHE	Barreira hematoencefálica
CA1	Corno de Ammon 1
CA2	Corno de Ammon 2
CA3	Corno de Ammon 3
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
C5	Complemento 5
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol (do inglês, " <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> ")
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus da dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus da dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus da dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus da dengue sorotipo 4
d.p.i.	Dias pós infecção
FcγR	Receptores de Fc gama (do inglês, " <i>Fc gamma receptors</i> ")
FD	Febre do dengue
FDH	Febre do dengue hemorrágica
GFAP	Proteína glialfibrilar ácida (do inglês " <i>glial fibrillary acidic protein</i> ")
H.E.	Hematoxilina e eosina
HRP	Peroxidase de rábano (do inglês " <i>Horseradish Peroxidase</i> ")
IBA-1	Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (do inglês, " <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> ")
IL-6	Interleucina 6
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
kDa	Kilodalton

L-SIGN	Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de fígado/linfonodo (do inglês, “ <i>liver node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin</i> ”)
MCP-1	Proteína quimioatratora de monócitos (do inglês “ <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> ”)
MIF	Fator de inibição da migração de macrófagos (do inglês, “ <i>macrophage migration inhibitory factor</i> ”)
µL	Microlitro
mL	Mililitro
NTPase	Proteína nucleosídeotrifosfatase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês, “ <i>open-reading frame</i> ”)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, “ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
Proteína C	Proteína do capsídeo
Proteína E	Proteína do envelope
Proteína NS1	Proteína não estrutural 1
Proteína NS2A	Proteína não estrutural 2A
Proteína NS2B	Proteína não estrutural 2B
Proteína NS3	Proteína não estrutural 3
Proteína NS4A	Proteína não estrutural 4A
Proteína NS4B	Proteína não estrutural 4B
Proteína NS5	Proteína não estrutural 5
Proteína prM	Proteína precursora de membrana
RNA	Ácido ribonucleico
RTPase	RNA trifosfatases
SCD	Síndrome do choque do dengue
SNC	Sistema nervoso central
SPF	Livre de patógenos (do inglês, “ <i>specificpathogenfree</i> ”)

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, " <i>tumoral necrosis fator-alpha</i> ")
UTR	Região não traduzida (do inglês " <i>untranslated region</i> ")
VCAM-1	Forma solúvel da molécula de adesão endotelial vascular (do inglês, " <i>soluble vascular cell adhesion molecule-1</i> ")

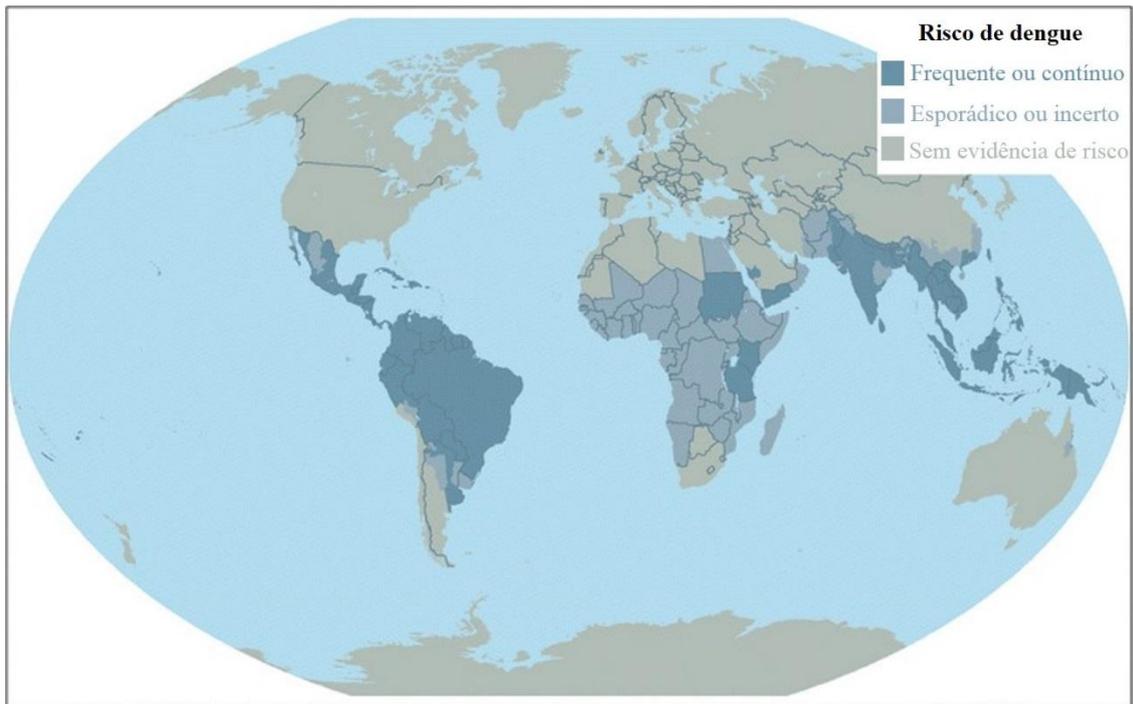
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Dengue e epidemiologia

### 1.1.1 No Mundo

A dengue é uma arbovirose que representa um grande problema de saúde pública; sendo transmitida pela picada de fêmeas infectadas do mosquito de gênero *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Gubler; 2002; Guzman *et al.*, 2010). Esta doença é endêmica das regiões tropicais da Ásia, América Latina e Pacífico, e circula por toda a África. Além de recentemente ter causado surtos locais nos EUA e partes da Europa (Bhatt *et al.*, 2013; Radke *et al.*, 2012; Schaffner *et al.*, 2014; Islam *et al.*, 2015).

Estimativas mostraram que em 2010, 3,6 milhões de pessoas viviam em áreas com risco de transmissão de dengue, e que 390 milhões de pessoas se infectavam anualmente pelo vírus em mais de 100 países (Grange *et al.*, 2014); com 96 milhões destas manifestando os sintomas da doença (Bhatt *et al.*, 2013; WHO, 2014). A globalização, a propagação do mosquito do gênero *Aedes*, a urbanização inadequada e a falta de uma vacina e tratamento terapêutico eficazes são alguns dos fatores que contribuem para o cenário epidemiológico atual (Simmons *et al.*, 2012). Atualmente, os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV) e os mosquitos vetores estão presentes nos trópicos e subtropicais do mundo todo (Fig. 1.1) (Messina *et al.*, 2014; Kraemer *et al.*, 2015).



**Figura 1.1:** Regiões do mundo com evidência de risco de infecção pelo vírus da dengue. (Figura adaptada de Sharp *et al.*, 2017).

### 1.1.2 No Brasil

Os primeiros registros de dengue no Brasil ocorreram no século XIX, na cidade do Rio de Janeiro (1846), no Estado de São Paulo (1851), em Valença (1886) e em Niterói no início do século XX (1922) (Schatzmayr & Cabral, 2009). O vetor *Aedes aegypti* foi controlado até os anos 70. Em 1976 o vetor foi reintroduzido e provocou epidemias em Boa Vista, Roraima em 1981 (DENV-1) e em 1982 (DENV-4) (Osanai *et al.*, 1983; Nogueira *et al.*, 2007; Claro *et al.*, 2004). A dengue passou a ser um problema de saúde pública no país, quando foi identificada no soro de pacientes em epidemia ocorrida no estado do Rio de Janeiro em 1986 (DENV-1) e em 2002 (DENV-3) (Schatzmayr *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1990; 2007; San Martín *et al.*, 2010). A introdução do DENV-2 se deu pelo estado do Rio de Janeiro em 1990 (Nogueira *et al.*, 1990) e retornou em 2007/2008 acarretando na maior epidemia em termos de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças e adolescentes (Teixeira *et al.*, 2008; San Martín *et al.*, 2010). Já o DENV-3 foi introduzido em 2000, causando uma das mais graves epidemias já reportadas no país, em 2002 (Nogueira *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2005). O DENV-4 foi o último sorotipo a

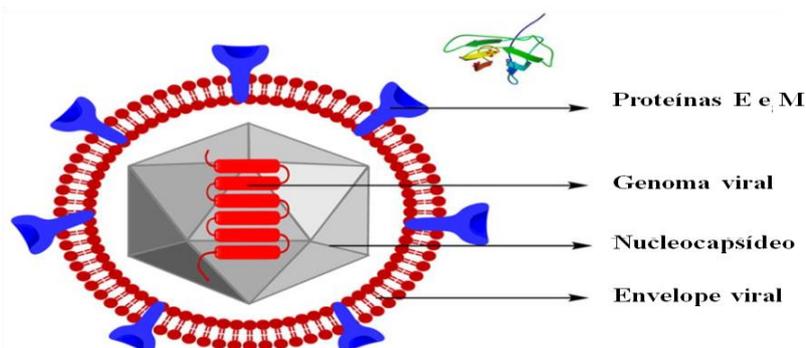
ser reintroduzido no país em 2010 no Estado de Roraima e no Amazonas, e em Niterói (RJ) no ano de 2011, gerando muitos casos graves e óbitos (Nogueira & Eppinghaus, 2011).

No Brasil, a transmissão da dengue vem ocorrendo de forma continuada desde 1986. Há sempre ocorrência de epidemias, que geralmente se associam à introdução de novos sorotipos em áreas que não eram afetadas anteriormente, ou alteração do sorotipo predominante. Atualmente, os quatro sorotipos da doença estão circulantes no Brasil. No ano de 2016, ano país foram identificados 1.500.535 casos de dengue com predomínio da região Sudeste, com 858.273 casos (SVS, 2017a). Neste mesmo ano, foram 176 óbitos por dengue com sinais de alarme e 466 por dengue grave (SVS, 2017b). Apesar de estas informações constarem na página da Secretaria de Vigilância Sanitária, é importante lembrar sobre a ocorrência de subnotificação de casos.

## 1.2 O vírus

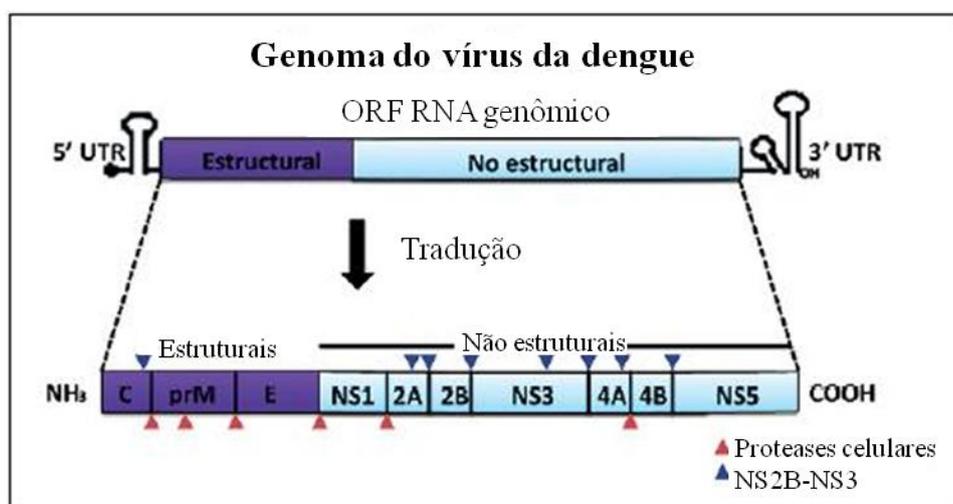
O agente etiológico da dengue é o vírus da dengue (DENV), pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* (Henchal & Putnak, 1990). O vírus possui quatro sorotipos antigenicamente distintos, porém geneticamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Murrell *et al.*, 2011).

O vírus possui um envelope lipídico, onde estão ancoradas as proteínas E e de membrana (prM/M) (Perera & Kuhn; 2008; revisado por Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). No seu interior está o nucleocapsídeo, compreendendo uma molécula de RNA de fita simples e a proteína do capsídeo (Fig. 1.2).



**Figura 1.2: Estrutura da partícula do vírus da dengue.** Partícula viral composta por proteínas E e M, genoma viral, nucleocapsídeo e envelope viral. (Gogineni *et al.*, 2016)

O seu genoma consiste em um RNA de fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 11 kb, contendo uma origem de replicação - ORF (do inglês “*open-reading frame*”). O RNA viral codifica uma poliproteína precursora, que é processada por proteases celulares e virais em três proteínas estruturais: capsídeo (proteína C), pré-membrana (proteína prM) e envelope (proteína E) que formam a partícula viral; e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), atuantes na replicação viral (Kato *et al.*, 2016) (Fig. 1.3).



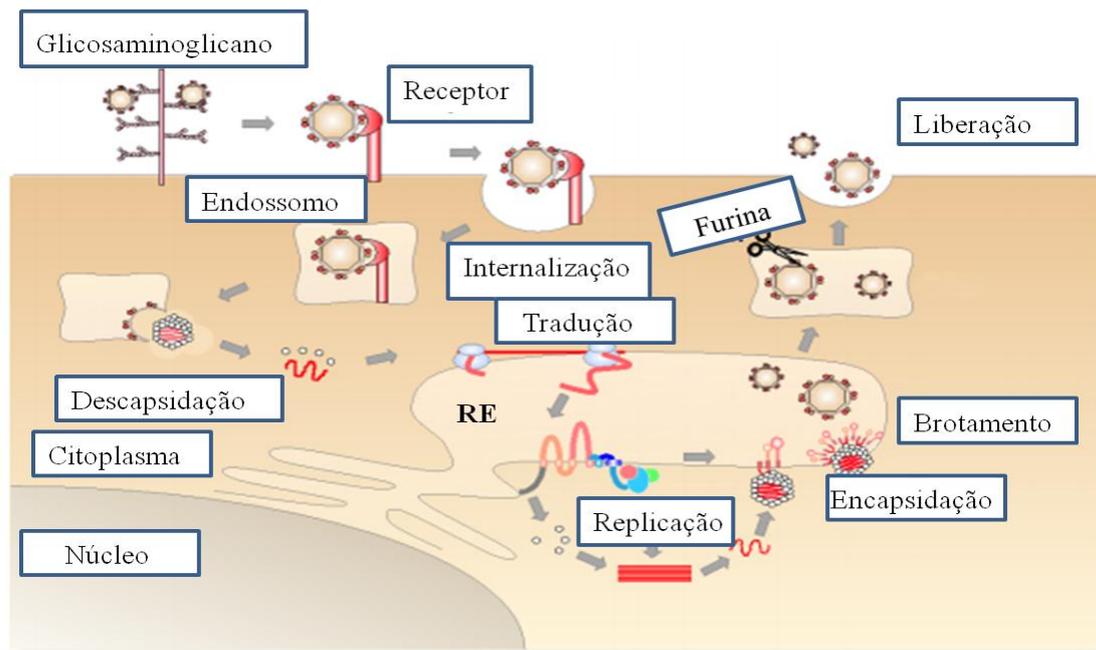
**Figura 1.3: Genoma do vírus da dengue.** Representação esquemática da estrutura genômica do vírus da dengue. Na parte superior: genoma viral, indicando as regiões não codificantes UTR e as extremidades 5' e 3', e região codificante ORF. Na parte inferior: poliproteína gerada após a tradução do RNA viral, e então, processada por proteases celulares e virais em três proteínas estruturais (C, prM, E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). (Figura adaptada de Martínez *et al.*, 2017)

### 1.3 A infecção

O vírus da dengue é transmitido aos humanos através do repasto sanguíneo da fêmea infectada. A proteína E é responsável pela ligação e entrada do vírus na célula hospedeira, através de alguns receptores. O receptor DC-SIGN facilita a infecção de células dendríticas (Pokidysheva *et al.*, 2006; Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2014) e seu homólogo, L-SIGN, é expresso em células endoteliais do fígado (Dejnirattisai *et al.*, 2011). Há também os receptores de manose (MR) que são expressos em macrófagos humanos (Miller *et al.*, 2008); heparan sulfato (HS), bastante abundante em proteoglicanos da membrana celular; proteínas de choque térmico (HSP70 e

HSP90), na superfície da membrana celular de mamíferos (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005; Chaves-Salinas *et al.*, 2008); e receptores transmembrana TIM e TAM, envolvidos na remoção dependente de fosfatidilserina de células que estão caminhando para apoptose (Meertens *et al.*, 2012, Green *et al.*, 2014; De La Guardia *et al.*, 2014).

O ciclo se inicia quando o DENV infecta como monócitos, macrófagos e células dendríticas, e sofre endocitose mediada por receptor de clatrina (Acosta *et al.*, 2008; van der Schaar *et al.*, 2008). Uma vez dentro da célula, o endossomo se acidifica e o vírion passa por alterações conformacionais que resultam em trimerização irreversível da proteína E. Ocorre então a fusão da membrana do envelope viral com a membrana do endossomo para o nucleocapsídeo ser liberado no citoplasma (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2014). Este nucleocapsídeo libera o RNA viral no citoplasma que é direcionado para o retículo endoplasmático, onde é traduzido em uma poliproteína. Esta, sofre clivagens por proteases virais e da célula hospedeira originando as proteínas estruturais e não estruturais que terão papel na composição da partícula e da replicação viral, respectivamente. Ocorre então a formação do complexo replicativo, e a síntese do RNA se inicia com a transcrição do RNA viral anti-senso seguido pela amplificação do RNA viral, que é empacotado no capsídeo e montado dentro de um vírion envelopado na superfície do retículo endoplasmático, coberto por proteínas de envelope e de membrana, formando vírions imaturos. Estes vírions imaturos são encaminhados para o complexo de Golgi para que as proteases da célula clivem as proteínas de membrana, gerando vírions maduros e parcialmente maduros que são secretados pela célula hospedeira (Green *et al.*, 2014; Sreaton *et al.*, 2015; Okamoto *et al.*, 2017) (Fig. 1.4).



**Figura 1.4:** Ciclo replicativo do vírus da dengue. O vírus da dengue se liga aos glicosaminoglicanos (GAG), e então a receptores específicos, entrando na célula por endocitose. O genoma do vírus é traduzido em uma poliproteína que dará origem às proteínas estruturais e não estruturais. Estas últimas formam o complexo replicativo que é responsável pela replicação do RNA viral no retículo endoplasmático. Moléculas de proteína do capsídeo incorporam a este RNA viral e os vírus imaturos saem do retículo endoplasmático, já com a pré-membrana e envelope em direção ao complexo de Golgi para serem processados. Partículas maduras são eliminadas por exocitose. (Figura adaptada de Okamoto *et al.*, 2017)

## 1.4 Proteínas virais

### 1.4.1 Proteínas estruturais

As proteínas estruturais são componentes essenciais para a formação do vírion. Além disso, também possuem papel importante em etapas como: entrada do vírus na célula, fusão com a célula hospedeira e montagem dos vírions (Silveira *et al.*, 2016).

A proteína C (11 kDa) faz parte do nucleocapsídeo que contém o RNA genômico. Sua região interna é composta de resíduos hidrofóbicos que interagem com membranas celulares dando a esta proteína papel na montagem dos vírions (Lindenbach & Rice, 2001; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

A proteína M (8 kDa) possui uma forma precursora, prM (21 kDa), antes de sofrer clivagem. Ela parece atuar como uma chaperonina para correta montagem da proteína E (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

A proteína E (53 kDa) está presente no envelope viral e possui três domínios na sua porção C-terminal. Esta proteína é capaz de atuar como proteína ligante interagindo com receptores presentes na superfície de células-alvo e mediando a endocitose da partícula viral. Ela também é responsável pela fusão do envelope do vírus à membrana do endossomo e participa da dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (Chang, 1997; Stiasny & Heinz, 2006). Além disso, a proteína E contém os principais epítomos que são reconhecidos por anticorpos neutralizantes, sendo assim um forte imunógeno (Lindenbach & Rice, 2001; Stiasny & Heinz, 2006).

#### **1.4.2 Proteínas não estruturais**

As proteínas não estruturais não possuem um papel completamente elucidado, porém estas proteínas têm sua importância na replicação do vírus e várias destas desempenham papéis importantes na evasão da resposta imune inata (Silveira *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017).

A proteína NS1 (48 kDa) é uma glicoproteína multifuncional que se encontra no citoplasma ou associada à membrana externa de células infectadas. Dentro do retículo endoplasmático, ela se dimeriza e é direcionada para três destinos: sítio de replicação viral, membrana plasmática e secretada para o compartimento extracelular sob forma de hexâmeros (Scaturro *et al.*, 2015; Bäck & Lundkvist, 2013). Os imunocomplexos formados pela NS1 secretada são capazes de ativar o sistema complemento que contribui para a patogênese da doença (Avirutnan *et al.*, 2006).

A proteína NS2A (22 kDa) tem característica hidrofóbica e faz parte do complexo replicativo do RNA viral (Xie *et al.*, 2013). Uma mutação na sua estrutura pode bloquear a replicação (Liu *et al.*, 2004). A proteína NS2B (8 kDa) possui um domínio hidrofílico que é essencial para a atividade de protease

(Falgout *et al.*, 1993). Ela atua como cofator do complexo NS2B-NS3 que é responsável por clivagens na poliproteína viral (Natarajan, 2010).

A proteína NS3 (70 kDa) possui diversas funções, como serino-protease, helicase, nucleosídeo-trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase (RTPase) (Assenberg *et al.*, 2009). Como a NS3 foi detectada como antígeno viral nas nossas amostras de tecidos, ela será descrita com mais detalhes no tópico 1.4.2.1

A proteína NS4A (16 kDa) é uma proteína com característica hidrofóbica e contém quatro segmentos transmembranares. Ela participa da resposta a proteínas malformadas, protegendo a célula de morte por estresse do retículo endoplasmático durante a replicação viral (McLean *et al.*, 2011; Guzman & Harris, 2015).

Já a proteína NS4B é uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático, conhecida por fazer parte da inibição da resposta de interferons do tipo 1 em células infectadas. Ela também pode se associar à proteína NS3, modulando a replicação viral (Lindenbach & Rice, 2001).

A proteína NS5 (103 kDa) é a maior e a mais conservada do gênero *Flavivirus* (Lindenbach & Rice, 2001). Na sua porção C-terminal tem a função de helicase, e na porção N-terminal, de metiltransferase (Natarajan, 2010). A atividade de RNA polimerase dependente de RNA é responsável pela síntese das fitas negativas e positivas do RNA viral (Potisopon *et al.*, 2014).

### **1.4.2.1 Proteína NS3**

A proteína NS3 (70 kDa) é uma proteína não estrutural multifuncional. Ela possui um domínio N-terminal com função de serino protease, a partir da formação do complexo NS2B-NS3, sendo responsável pela clivagem da poliproteína viral, contribuindo para a replicação do vírus (Bazan & Fletterick, 1989; Geiss *et al.*, 2009). O domínio C-terminal possui três atividades enzimáticas: RNA trifosfatase (RTPase), RNA helicase e nucleosídeo trifosfatase (NTPase), que possuem papel na replicação do RNA viral (Tom Linson *et al.*, 2009). A helicase é responsável pela dissociação da dupla fita de RNA, enquanto que a NTPase fornece energia para realização do processo de

replicação; e RTPase, que remove o grupamento fosfato da região 5' UTR (Natarajan, 2010). Além disso, a proteína NS3 também está envolvida na montagem do vírus, através de mecanismos que são independentes das atividades enzimáticas já descritas (Khromykh *et al.*, 2001; Patkar & Kuhn, 2008). Ela também possui papel na regulação viral do metabolismo lipídico celular, recrutando uma proteína responsável pela síntese de ácido graxos, que acaba por favorecer o aumento da replicação viral na célula infectada (Green *et al.*, 2014).

### **1.5 A doença (manifestações clínicas)**

O vírus é inoculado no hospedeiro durante a picada do mosquito infectado e aparentemente inicia sua replicação nas células de Langerhans (dendríticas subdermais) que se ativam e migram para os linfonodos, levando à infecção da linhagem monócito-macrófago (Bäck & Lundkvist, 2013). Acredita-se que a partir da viremia, monócitos circulantes se tornam infectados e disseminam o vírus para os órgãos. Alguns relatos demonstraram a presença de DENV em hepatócitos, pneumócitos, células endoteliais, musculares cardíacas e neuronais, tanto em casos fatais da doença quanto em modelos experimentais (Miagostovich *et al.*, 1997; Jessie *et al.*, 2004; Clyde *et al.*, 2006; Balsitis *et al.*, 2009; Paes *et al.*, 2009; Bäck & Lundkvist, 2013; Póvoa *et al.*, 2014).

O período de incubação da dengue dura em média de 4 a 7 dias. Em pacientes sintomáticos, os quatro sorotipos são capazes de causar doença febril aguda com manifestações clínicas de amplo espectro, com sintomas comuns a outras doenças virais, o que pode dificultar o diagnóstico (Ling *et al.*, 2007; Ross, 2010). Pela classificação antiga dividiam-se em: febre do dengue (FD), febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque do dengue (SCD) (WHO, 1997; Edelman & Hombach, 2008). Esta classificação foi baseada principalmente na experiência clínica de países asiáticos.

A FD é caracterizada pelo aparecimento de febre acompanhada por sinais não-específicos, como: dor de cabeça, dor retro-orbital, fotofobia, bradicardia, mialgia, artralgia, fraqueza, leucopenia, náuseas, vômitos, erupção cutânea e manifestações hemorrágicas (Srikiatkhachorn, 2009). Os pacientes

que desenvolvem a FHD apresentam febre, ocasionalmente bifásica, fragilidade capilar, geralmente mostrada pelo teste positivo do torniquete, petéquias, equimoses, hematoma, sangramento da mucosa e do trato gastrointestinal. Além disso, no hemograma observa-se trombocitopenia e hemoconcentração, que indica o extravasamento de plasma devido ao aumento da permeabilidade vascular (Gubler, 1998; Narvaez *et al.*, 2011). Se o extravasamento de plasma não se resolver de forma rápida e espontânea, pode levar à hipotensão que caracteriza a SCD e, a partir disso, levar o paciente a desenvolver insuficiência hepática e encefalopatia (Srikiatkachorn, 2009). É bastante frequente o paciente relatar dor abdominal um pouco antes de entrar em choque (Gubler, 1998). Há vários fatores que podem contribuir para o indivíduo evoluir para formas mais graves (FHD/DG), como idade, estado imunológico e nutricional, presença de doenças crônicas a constituição genética do hospedeiro; assim como a cepa e o sorotipo viral (Rothman, 2004; Whitehorn & Simmons, 2011; Simmons *et al.*, 2012).

Contudo, estudos adicionais revelaram a necessidade de parâmetros de gravidade alternativos mais específicos a realidades regionais (Harris *et al.*, 2015). Assim, para melhor identificação dos casos graves, a OMS, em 2009, organizou estudos que definissem parâmetros de gravidade (WHO, 2009), com base nos resultados do estudo multicêntrico DENCO (“*Dengue control*”) realizado em pacientes de todas as faixas etárias do Sudeste Asiático e da América Latina, dando origem a uma nova classificação: dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG) (Fig. 1.5).



**Figura 1.5: Classificação clínica da Dengue.** (Figura adaptada do Manual de Dengue WHO, 2009).

## 1.6 Patogênese e resposta imune em infecções por dengue

Ainda que a patogênese da dengue não esteja muito bem esclarecida, a maioria dos autores aponta mais para uma doença mediada pela resposta imune do hospedeiro do que propriamente pelo vírus (Guzman *et al.*, 2015; Rothman *et al.*, 2011). Sabe-se que as células dendríticas (monócitos e macrófagos) são as principais células-alvo de replicação do vírus da dengue. Nos últimos anos, muitos estudos demonstraram o fato de a infecção destes tipos celulares levar a uma ativação de eventos imunes, como a produção exacerbada de citocinas pró e anti-inflamatórias, o que poderia explicar, em parte, a ocorrência de casos de dengue grave (Pang *et al.*, 2007). O fenômeno conhecido como tempestade de citocinas (do inglês, “*cytokine storm*”) ocorre quando há altos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias circulantes que promovem ativação endotelial e aumento da permeabilidade vascular, podendo provocar extravasamento de plasma e fluidos, levando o indivíduo à hemoconcentração e outras desordens homeostáticas, que resultam em alterações vasculares, trombocitopenia, coagulopatia, hemorragia e choque (Green & Rothman, 2006; & Guabiraba & Ryffel, 2014).

Geralmente, citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 são encontradas elevadas na fase aguda. Na fase de recuperação, normalmente encontram-se elevadas as citocinas anti-inflamatórias, como por exemplo, IL-10, e quimiocinas como MIF e MCP-1, atuando na integridade do endotélio (Ferreira *et al.*, 2015). Todas estas citocinas já foram reportadas por estarem relacionadas aos casos de dengue grave. Além destas, a molécula de adesão VCAM-1 também parece ser um grande indicativo de severidade da doença, já que costuma ser encontrada mais rapidamente e mais elevada de forma persistente nos casos de dengue grave (Hober *et al.*, 1993; Liao *et al.*, 2015).

A RANTES (CCL5) é uma quimiocina, possuindo atividade quimiotática para eosinófilos, basófilos, monócitos, células NK e linfócitos. Ela se armazena nos grânulos das plaquetas e é secretada após a ativação plaquetária (Gear & Camerini, 2003; Rathakrishnan *et al.*, 2012). Contudo, nos casos de dengue é comum a ocorrência da queda de plaquetas, logo, quando isto acontece, os níveis de RANTES circulantes também diminuem (de Oliveira Pinto *et al.*, 2012). Como consequência, esta queda pode resultar no prolongamento da inflamação e aumento da permeabilidade (Singla *et al.*, 2016, Kuan-Meng *et al.*, 2017). O mesmo também ocorre quando células locais dos tecidos têm aumento da expressão de RANTES, como já foi visto em órgãos como fígado, pulmão e rins (de Oliveira Pinto *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2016).

Das citocinas mencionadas acima, as utilizadas neste trabalho foram TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida principalmente por macrófagos ativados. Há relatos na literatura que associam seus níveis às manifestações hemorrágicas e à gravidade da doença, já que é encontrado aumentado em pacientes com dengue grave (Hober *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1995; Azeredo *et al.*, 2001; Chakravati & Kumaria, 2006). Porém, outros grupos mostraram não haver uma correlação direta entre níveis elevados de TNF- $\alpha$  e a gravidade da doença, e sim uma associação com a trombocitopenia (Bethell *et al.*, 1998; Bozza *et al.*, 2008).

Já o IFN- $\gamma$  é uma das primeiras linhas de defesa antiviral, e também não há um consenso quanto à sua participação no agravamento da doença. Há trabalhos que o associam à gravidade, sendo encontrado em níveis mais

elevados em pacientes graves (Kurane *et al.*, 1994; Bozza *et al.*, 2008; Priyadarshini *et al.*, 2010), refletindo possivelmente uma ativação de células T CD8<sup>+</sup> com a produção de citocinas inflamatórias.

No caso de uma infecção secundária com um sorotipo heterólogo, a resposta imune adaptativa pode atuar favorecendo a infecção por uma teoria conhecida como facilitação dependente de anticorpo (ADE, do inglês “*antibody dependent enhancement*”). Esta teoria explica que anticorpos heterólogos pré-existentes gerados em resposta a uma infecção primária podem não ser suficientes para neutralizarem uma infecção secundária por um sorotipo diferente. Na verdade, eles formam imunocomplexos, que facilitam a entrada da partícula viral nas células, ao se ligarem a receptores FcγR, expressos em monócitos e macrófagos, que são os maiores alvos de replicação do DENV (Halstead *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2014). A resposta imune ocorre de forma inespecífica e exacerbada, produzida por linfócitos T de memória gerados durante a infecção primária, levando ao aparecimento de manifestações mais graves da doença.

As variações do genótipo e da cepa também podem contribuir para uma progressão mais grave ou mais branda da doença durante a infecção primária, apresentando diferentes graus de virulência (Seneviratne *et al.*, 2006).

Em casos de dengue ocorridos em humanos e em modelos experimentais, já se observou o tropismo do vírus para alguns órgãos. Dentre eles estão baço, fígado, linfonodos, rim, coração, pulmão, timo, medula óssea e cérebro (Burke, 1968; Rosen *et al.*, 1999; Jessie *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2005, 2009; Ling *et al.*, 2007; Martina *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014). Nos órgãos acometidos, são encontrados danos histopatológicos que podem ser atribuídos a uma resposta imune desregulada do hospedeiro, em função da ativação de linfócitos T com efeito citotóxico e/ou a exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias que causariam danos ao tecido (Guabiraba & Ryffel, 2014; Pagliari *et al.*, 2014; Póvoa *et al.*, 2016).

### **1.6.1 Neuropatogênese e resposta imune do SNC em infecção por dengue**

A primeira associação descrita entre dengue e manifestações neurológicas foi em 1976 (WHO, 2009). Durante muito tempo, o vírus da dengue foi considerado não-neurotrópico, porém nas últimas epidemias, têm acontecido muitos relatos de envolvimento neurológicos. Em 2009, para o melhor diagnóstico da dengue, a OMS criou uma nova classificação para a doença. A dengue foi classificada em dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave. Dentro desta última classe, o grave envolvimento de órgãos foi incorporado, incluindo o sistema nervoso central (Castellanos *et al.*, 2014; Osnaya-Romero *et al.*, 2017). Pacientes com o sistema nervoso central comprometido apresentavam complicações neurológicas como encefalopatia, encefalite, síndromes imunomediadas (mielite aguda transversa, encefalomielite aguda disseminada e síndrome de Guillain-Barré), disfunção muscular e desordens neuro-oftálmicas (Domingues *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2010). Os principais sorotipos causadores dessas manifestações são o 3 e 4, porém os sorotipos 1 e 2 já foram identificados em amostras biológicas de pacientes diagnosticados com encefalite e mielite (Ramos *et al.*, 1998).

Os mecanismos que podem estar envolvidos nos danos causados ao SNC são: desequilíbrio metabólico, distúrbios hemorrágicos (trombocitopenia), reação autoimune pós-infecção e infecção do SNC pelo vírus da dengue (Carod-Artal *et al.*, 2013; Puccioni-Sohler *et al.*, 2012, 2013, 2015). Em relação à invasão do vírus, há estudos em camundongos que sugerem que isto ocorra devido a uma disfunção da barreira hematoencefálica (BHE), que é uma barreira de difusão essencial para a função normal do sistema nervoso central, e composta por células endoteliais dos capilares sanguíneos cerebrais. A explicação é que durante a infecção há uma super expressão de citocinas que causam danos em componentes celulares, como as junções intercelulares (“*tight junction*”), levando a alterações de permeabilidade do endotélio (Chaturvedi *et al.*, 1991; Neal *et al.*, 2014; Velandia-Romero *et al.*, 2012). Na dengue, a disfunção da BHE está associada aos altos níveis de metaloproteinases no plasma que digerem a lâmina basal de unidades

neurovasculares, enfraquecendo as interações entre as células endoteliais e outros elementos que compõem os vasos. Uma vez dentro do cérebro, partículas virais podem infectar leucócitos e monócitos que expressam proteínas quimiotáticas de monócitos (no caso de infecção por DENV-2) (Lee *et al.*, 2006; Chaturvedi *et al.*, 1991). Há também a hipótese de que o vírus acesse o SNC atravessando as células endoteliais por transcitose, o que já foi demonstrado no caso de infecção pelo vírus do Oeste do Nilo (do inglês, *West Nile vírus*) (Liou *et al.*, 1998). O mesmo mecanismo parece ocorrer quando o vírus chega ao líquido cefalorraquidiano (LCR).

Além disso, já foram observadas alterações histopatológicas, como edema, congestão vascular, focos hemorrágicos e infiltrados linfocitários perivasculares, de acordo com a hipótese de neuroinvasão direta do vírus (Carod-Artal *et al.*, 2013). Foram verificadas também detecções de antígenos virais no tecido cerebral e de anticorpos específicos IgM no líquido cefalorraquidiano (Chimelli *et al.*, 1990; Bhoopat *et al.*, 1996; Miagostovit *et al.*, 1997; Janssen *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 2005; Balsitis *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2013; Hapuarachchi *et al.*, 2015). Nos modelos experimentais também foram relatadas alterações histopatológicas e detecção dos antígenos virais (Amaral *et al.*, 2011; Velandia-Romero *et al.*, 2012)

Como grande parte de nossos estudos se baseiam em análises histopatológicas no SNC (cérebro/cerebelo), abordaremos no item 1.7 um pouco sobre a histologia destes órgãos.

Sabe-se que as citocinas, em condições fisiológicas, possuem papel na ativação e regulação da resposta imune antiviral. Além disso, elas também atuam na proliferação, sobrevivência de neurônios e células da glia e proteção do SNC contra infecções virais. Porém, a produção exacerbada de citocinas pode contribuir para o desenvolvimento de neuropatologias (Sánchez-Burgos *et al.*, 2004).

As células da microglia, que são conhecidas como macrófagos residentes do cérebro, podem passar por processo de ativação, atuando como amplificadores para neuroinflamação. A neuroinflamação é a ativação de células gliais que ocorre quando não há quebra da barreira hematoencefálica e

infiltração de células sanguíneas. Porém, os mecanismos pelos quais isto ocorre não estão muito bem elucidados (Das Sarma *et al.*, 2014).

Bordignon e colaboradores desenvolveram um estudo em camundongos para analisar os efeitos da infecção pelo vírus da dengue no perfil de transcrição do SNC. Pelos resultados, eles sugerem que as principais vias moduladas pela infecção por DENV no SNC dos camundongos estão envolvidas na sinalização de IFN e na apresentação de antígeno (Bordignon *et al.*, 2008). As células da microglia expressam constitutivamente moléculas MHC II (Streit *et al.*, 1989), assim como macrófagos da meninge e do plexo coroide e células perivasculares. Além disso, citocinas, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , podem induzir a expressão destas moléculas na superfície de astrócitos (Vass & Lassmann, 1990), atuando no reconhecimento e apresentação de antígenos para o sistema imune.

## **1.7 Histologia**

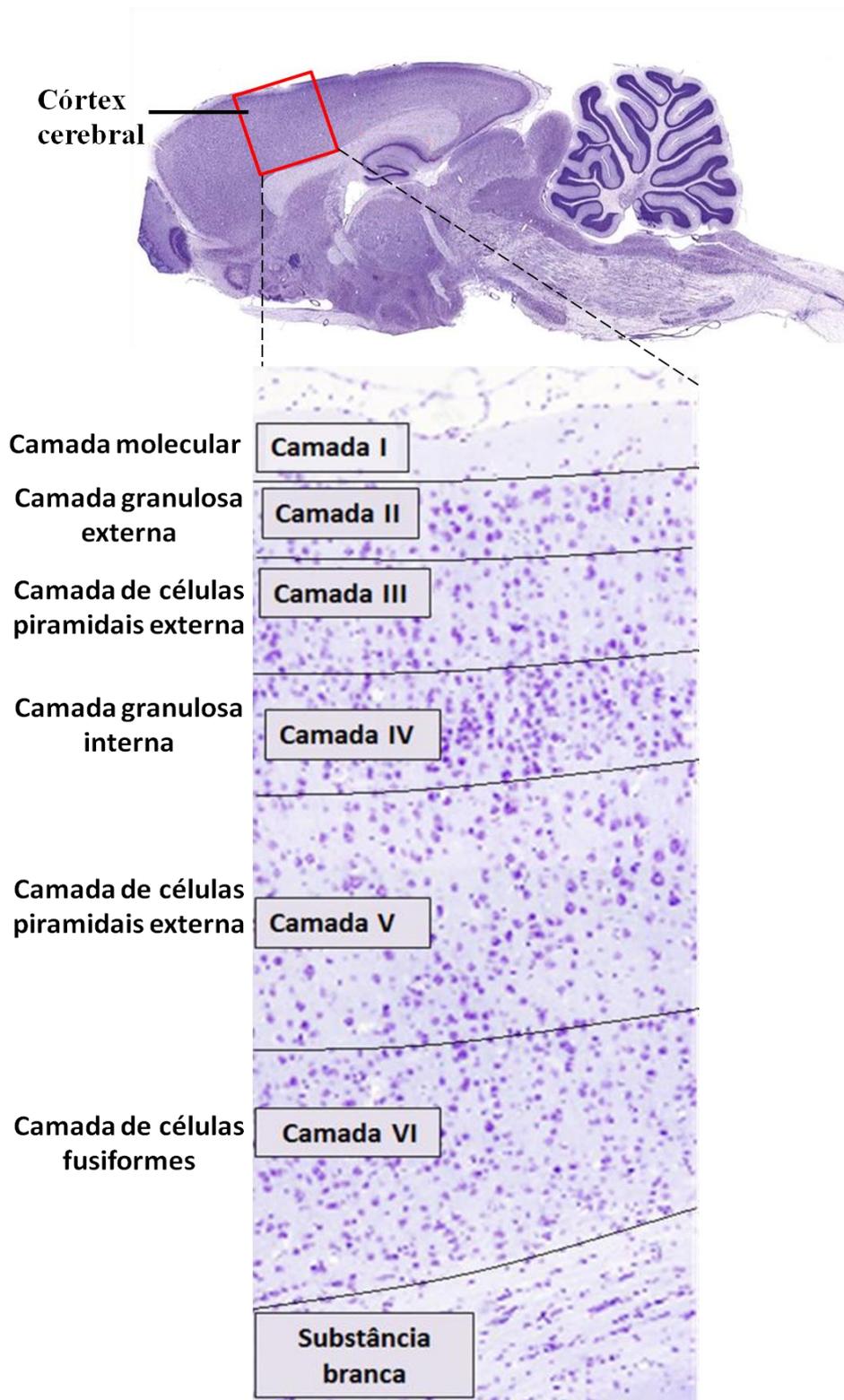
### **1.7.1 Cérebro e cerebelo**

O sistema nervoso central é composto por células que estão divididas em duas categorias principais: células de origem neuroectodermal (neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e endotélio) e células de origem mesenquimal (meninges, vasos sanguíneos e microglia) (Garman, 2011).

As meninges são formadas de tecido conjuntivo e possuem a função de revestir o encéfalo. Há três destas: dura-máter, pia-máter e aracnoide. Sendo a dura máter a mais externa, pia máter mais interna e a aracnoide entre estas duas. A pia-máter possui vasos sanguíneos e se estende até o terceiro e quarto ventrículo, formando o plexo coroide, única estrutura do cérebro que forma uma interface entre o sangue periférico e o fluido cerebrospinal (produzido principalmente por este local) (Garman, 2011; Quintela *et al.*, 2015).

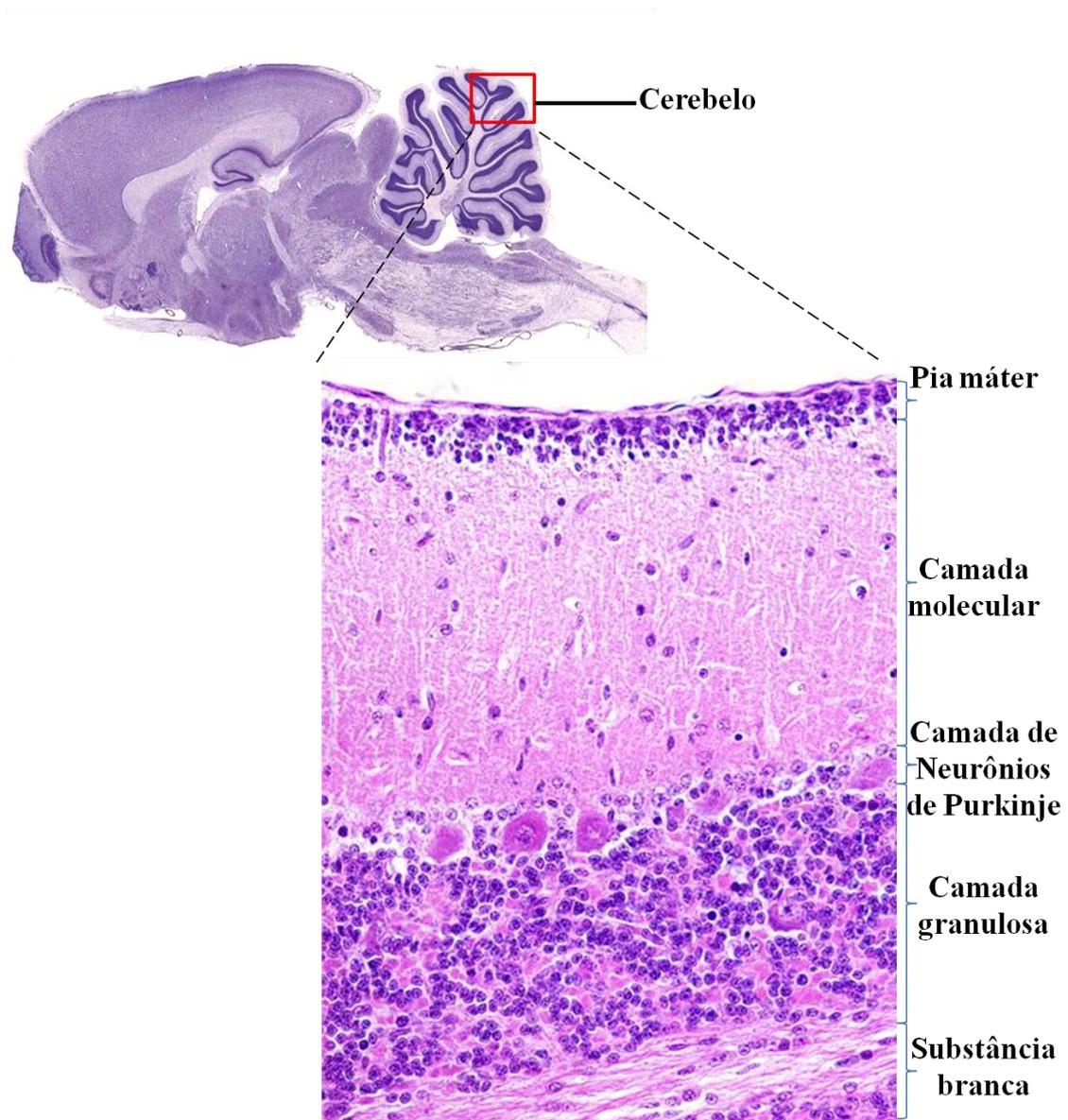
No tecido cerebral há duas regiões: substâncias cinzenta e branca. A substância cinzenta está dividida em 6 camadas: camada molecular (maior parte formada por fibras neuronais e células da neuroglia), granular externa, piramidal externa, granular interna, piramidal interna, e fusiforme, que possuem

neurônios que vão desde formatos piramidais, estrelados a fusiformes, variando também em seu tamanho (Fig. 1.6).



**Figura 1.6:** Esquema do córtex cerebral. (Figura adaptada de Mikula *et al.*, 2007; Pacheco *et al.*, 2014)

No cerebelo, a substância cinzenta está dividida em camada molecular (com células em formato de cesto e estreladas), camada de neurônios de Purkinje e camada granulosa. Estes neurônios de Purkinje são piriformes, e possuem um axônio e numerosos dendritos que se ramificam na camada molecular. Já a substância branca do cérebro e cerebelo é composta por axônios de neurônios e células da neuroglia (Gartner & Hiatt, 1999) (Fig. 1.7).



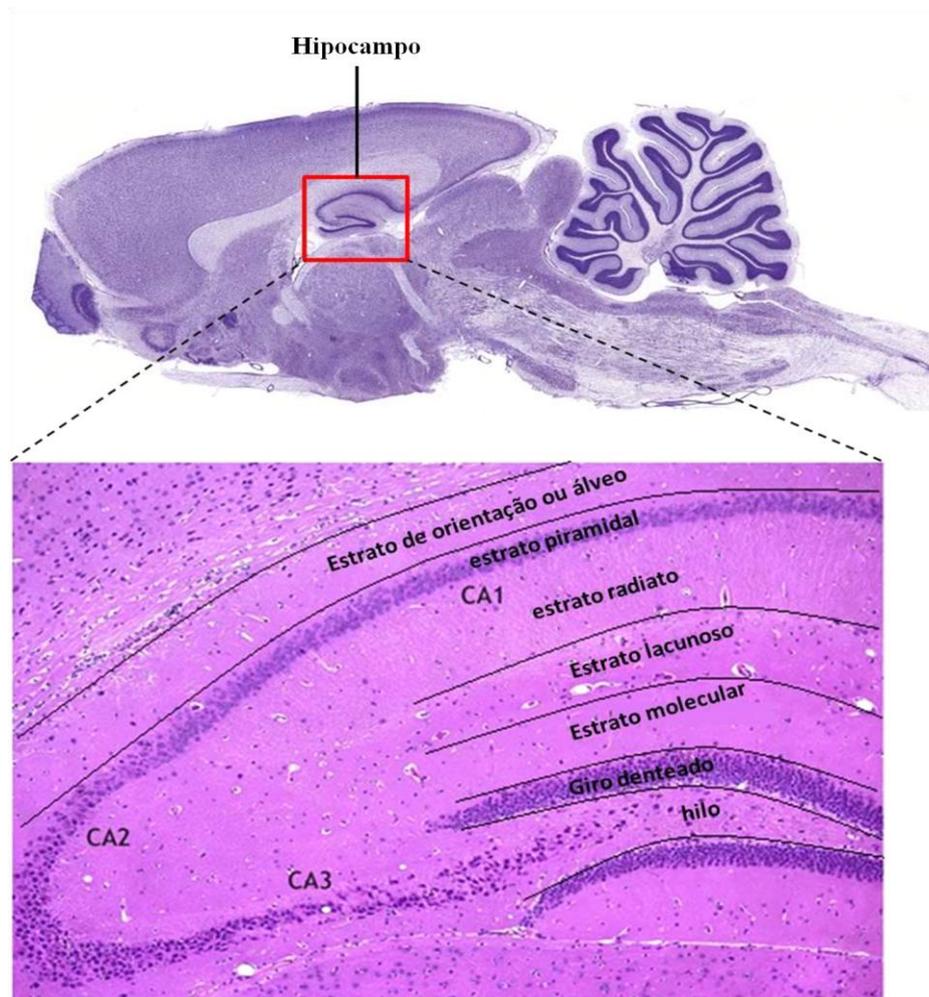
**Figura 1.7:** Esquema do tecido cerebelar. (Figura adaptada de Microscopia Online – USP)

### 1.7.2 Hipocampo

O hipocampo se localiza na região lobo-temporal do cérebro, e está envolvido em mecanismos relativos à aprendizagem e memória. Ele está

dividido em giro denteado, corno de *Ammon* (subdividido em regiões CA1, CA2 e CA3, em camundongos) e região subicular; além de possuir alguns estratos, como estrato de orientação ou alvéolo, piramidal, radiato, lacunoso e molecular que possuem dendritos basais de células piramidais e interneurônios e algumas fibras. No giro denteado, que é trilaminar, há principalmente células granulares que têm seus dendritos se estendendo até o estrato molecular (Deltagen, 2006).

A maior região é a CA3, que possui células piramidais. Estas células se conectam com o hilo do giro denteado a partir de axônios que saem dele para esta região. A região CA2 também possui células piramidais, porém é mais compacta. Já a região CA1 é a mais complexa variando ao longo da estrutura (Mikula *et al.*, 2007) (Fig. 1.8).



**Figura 1.8: Esquema do hipocampo.** Em um aumento maior é possível identificar as regiões CA1, CA2 e CA3 do corno de *Ammon*, o giro denteado e estratos. (Figura adaptada de Deltagen; Mikula *et al.*, 2007).

## **1.8 Células da neuroglia**

Uma das etapas deste trabalho foi analisar as principais células da neuroglia que possuem função de defesa e sustentação do tecido nervoso, como microglia e astrócitos, respectivamente. Nos dois subtópicos abaixo, estão descritas algumas características destas células.

### **1.8.1 Microglia**

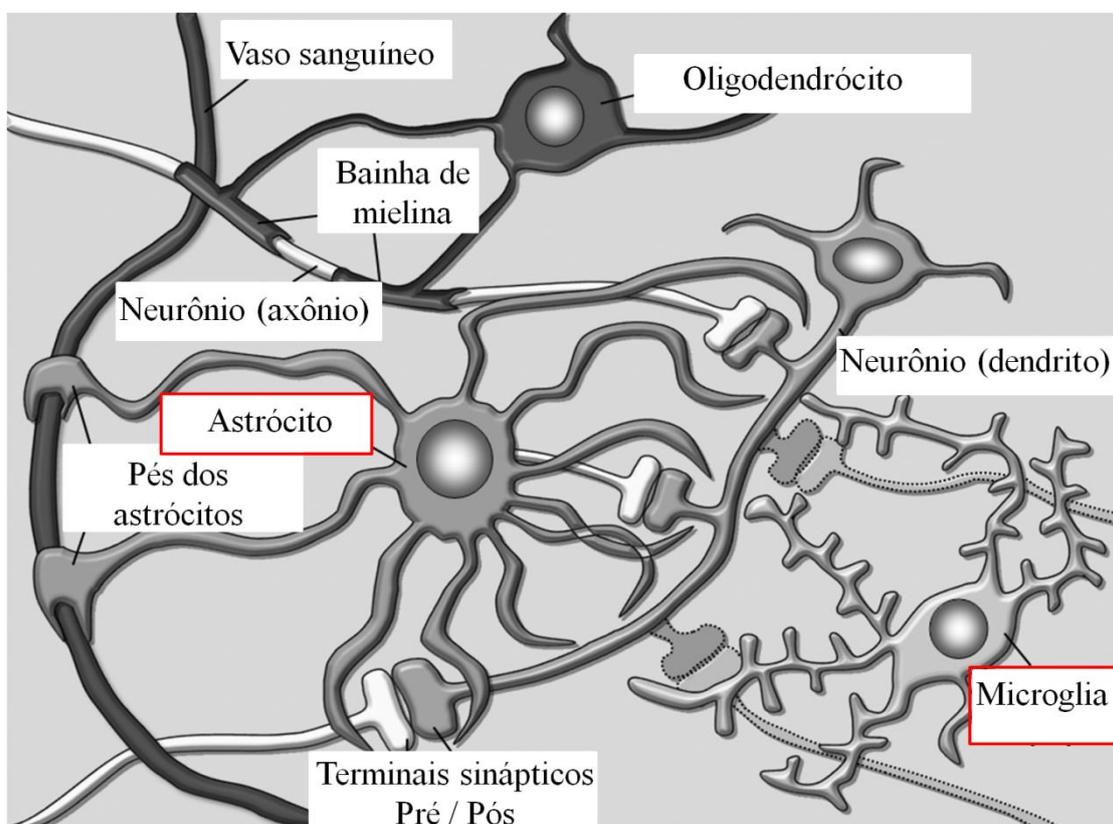
As células da microglia são geralmente derivadas do saco vitelínico e se direcionam para o SNC durante a embriogênese (Ginhoux *et al.*, 2010). São conhecidas como “macrófagos do cérebro”, atuando como as primeiras células que respondem frente à infecção de um patógeno, mas também têm papel importante no desenvolvimento, função e reparo do SNC (Diego Gomez-Nicola & Hugh Perry, 2015). Elas possuem prolongamentos ramificados que emergem do seu corpo celular e “escaneam” o ambiente, se comunicando com neurônios e outras células da glia que estão ao redor (Fitzner *et al* 2011; Kettenmann *et al* 2013; Paolicelli *et al* 2011). Quando ativadas, elas costumam apresentar um fenótipo ameboide, com retração das suas ramificações (Kirkley *et al.*, 2017); além de produzirem mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico que contribuem para a eliminação do patógeno e resolução da infecção. Contudo, sua proliferação e ativação exacerbada e prolongada podem ter consequências neurotóxicas, gerando danos ao tecido nervoso (Frank-Cannon *et al.*, 2009).

### **1.8.2 Astrócitos**

Os astrócitos são as células neurogliais predominantes no SNC, sendo importantes para o seu desenvolvimento e homeostase. São responsáveis por promover nutrientes metabolicamente otimizados aos neurônios, seus dendritos e sinapses; além de manter o equilíbrio iônico no espaço extracelular, removendo água e aminoácidos excitotóxicos (Tsacopoulos *et al.*, 1996). Eles formam fronteiras estruturalmente proeminentes (glia limitante) que alinham todas as interfaces entre o parênquima neural do SNC e células não neurais

(células meníngeas, endoteliais, pericitos, células de linhagem de fibroblastos, etc.) ao longo de todos os vasos sanguíneos e superfícies meníngeas (Sofroniew, 2015). Frente a uma lesão, uma das respostas do SNC é a ocorrência de alterações nos astrócitos: inchaço, divisão e proliferação dessas células (gliose reativa), astrócitos gemistocísticos, acúmulo de fibras gliais, aumento da síntese e expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Castejón, 2015).

Na figura a seguir, consta um esquema dessas células na arquitetura do SNC (Fig. 1.9).



**Figura 1.9: Esquema de células da neuroglia.** Os astrócitos contribuem para a regulação da neurotransmissão através de seus prolongamentos celulares envolvendo as regiões de sinapse, assim como na modulação da barreira hematoencefálica, e do fluxo sanguíneo cerebral através dos seus pés ao redor dos vasos sanguíneos. As células da microglia representam as células imunes residentes do SNC e são fundamentais para perceber o meio ambiente mantendo a homeostasia do local. Os oligodendrócitos fazem parte da neuroglia, tendo papel na formação da bainha de mielina ao redor de axônios para garantir a condução elétrica. Em vermelho, estão as células em estudo nesta Dissertação (Figura adaptada de Di Benedetto & Rupprecht, 2013).

## 1.9 Barreira hematoencefálica (BHE)

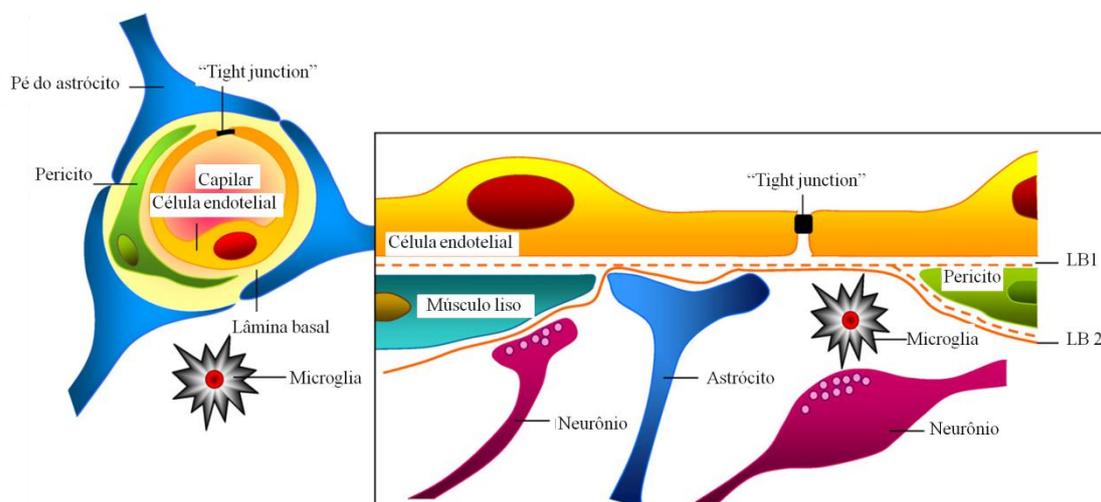
O sistema nervoso central, por muito tempo, ficou conhecido por ser um local imuno privilegiado, devido a uma estrutura chamada de barreira hematoencefálica. Sua diferenciação de endotélio em barreira tem início durante a angiogênese embrionária (Abott *et al.*, 2010) e é composta por astrócitos, microglia, pericitos, neurônios e células endoteliais que juntos são responsáveis por controlar seletivamente o que passa dos capilares para o parênquima cerebral e vice-versa (Abott *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2007). As células endoteliais cerebrais e os pericitos são acompanhados pela membrana basal local que forma uma matriz extracelular perivascular (lâmina basal 1 - LB1) e uma matriz extracelular composta de células gliais que delimitam o parênquima cerebral (lâmina basal 2 – LB2). Os pés dos astrócitos formam uma rede complexa que envolvem os capilares, sendo importantes na indução e manutenção das propriedades de barreira. As projeções dos neurônios no músculo liso, produzem neurotransmissores e peptídeos vasoativos que regulam o fluxo de sangue no local, pela permeabilidade.

As principais funções da BHE são: manutenção da homeostasia do SNC, proteção do cérebro contra o meio extracelular, constante suprimento de nutrientes por sistema de transporte específico, além de favorecer entrada de células inflamatórias para atuar em resposta a mudanças no local (Cardoso *et al.*, 2010).

Mesmo com toda esta arquitetura de proteção, há relatos na literatura que mostram esta barreira com sua funcionalidade comprometida. Os vírus do tipo HIV, herpes, vírus do Oeste do Nilo e vírus da encefalite japonesa podem infectar células endoteliais, ocasionando alteração da permeabilidade e seletividade (Basu *et al.*, 2008; Dalrymple *et al.*, 2012). Como consequência pode ocorrer extravasamento de plasma e a entrada de vírus ou células infectadas no parênquima cerebral e por fim, a propagação do vírus (Splinder *et al.*, 2012).

A infecção pelo vírus da dengue e sua propagação em diferentes tecidos pode ocorrer a partir da infecção e replicação do vírus em células endoteliais, em direção a órgãos como fígado, pulmão, trato urinário, intestino e cérebro (Jessie *et al.*, 2004; Dalrymple *et al.*, 2011). Alguns grupos já mostraram a

infecção pelo vírus da dengue no SNC através da BHE por infecção direta ou resposta imune que afeta a função da barreira tanto em experimentos “*in vivo*” em humanos (Hapuarachchi *et al.*, 2015) e modelo murino (Chaturvedi *et al.*, 1991; Velandia-Romero *et al.*, 2012), quanto em experimentos “*in vitro*” (Velandia-Romero *et al.*, 2016).



**Figura 1.10:** Esquema da barreira hematoencefálica. (Figura adaptada de Abott *et al.*, 2009)  
LB – Lâmina basal.

### 1.10 Modelos experimentais

Estudos sobre a patogênese e os mecanismos imunológicos envolvidos na progressão ou proteção da dengue encontram alguns obstáculos e um deles é a falta de um modelo experimental que reproduza claramente os efeitos da doença em humanos, já que o vírus da dengue não infecta naturalmente espécies não humanas (Yauch & Shresta, 2008). Diante deste problema, muitos pesquisadores têm realizado estudos para tentar desenvolver modelos experimentais “*in vivo*” a fim de compreender melhor sobre a patogênese desta doença. Alguns dos modelos utilizados são: primatas não-humanos, camundongos imunocompetentes, imunodeficientes e humanizados (Zompi & Harris, 2012; Zellweger & Shresta, 2014).

Os primatas não humanos são os mais próximos evolutivamente dos humanos. Por isso, são bastante utilizados em testes finais de imunogenicidade, eficácia protetora e segurança de vacinas; ainda que existam muitos obstáculos do ponto de vista financeiro e ético (Halstead *et al.*, 1979).

Apesar de apresentarem viremia, estes animais geralmente não exibem sinais clínicos. Eles conseguem manter a replicação viral em células e desenvolver uma resposta de anticorpos neutralizantes semelhante aos humanos (Bente & Rico-Hesse, 2006; Yauch & Shresta, 2008). Há estudos utilizando macacos *rhesus*, inoculando DENV pelas vias de inoculação como a subcutânea (s.c.) e intravenosa (i.v.). No uso da via s.c., os macacos apresentaram leucopenia após a infecção primária e trombocitopenia após sofrer infecção secundária com um sorotipo heterólogo do vírus e houve detecção de viremia transiente de 3 a 6 dias (Halstead *et al*, 1973), enquanto que pela via i.v., apresentaram sinais hemorrágicos e de coagulopatia (Onlamoon *et al*, 2010).

Camundongos imunocompetentes são conhecidos por sua resistência à infecção pelo vírus da dengue devido à habilidade de o sistema imune deles responder eficientemente contra a infecção. Na literatura há relatos de camundongos C57BL/6 inoculados com altas doses de DENV-2 via i.c., que desenvolveram sinais neurológicos e paralisia (Raut *et al.*, 1996), e pela via intradermal, hemorragia sistêmica e foram a óbito (Chen *et al.*, 2007). Pela via i.v., estes camundongos apresentaram disfunção hepática 3 dias após a infecção (Chen *et al.*, 2004), e 7 dias após a infecção em camundongos BALB/c que também tiveram os níveis das enzimas hepáticas AST/ALT aumentadas (Paes *et al.*, 2009). Alterações histopatológicas no fígado e aumento do nível de enzimas hepáticas no soro também foram relatadas em camundongos BALB/c inoculados pela via i.p. (Paes *et al.*, 2005). Há também grupos que utilizaram vírus adaptados ao hospedeiro, levando tanto camundongos jovens quanto adultos a apresentarem sinais clínicos, como ocorre em humanos (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Fagundes *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012; Guabiraba & Ryffel, 2014; Oliveira *et al.*, 2016). Cada vez mais este tipo de camundongo está sendo utilizado para estudos da patogênese da dengue.

Camundongos imunodeficientes são conhecidos por não possuírem o sistema imune completo, não sendo muito recomendados para uso em testes de vacinas ou drogas terapêuticas. Como exemplo, os camundongos A/J não possuem o complemento 5 (C5) do sistema imune, e já houve relatos de que quando infectados com altas doses da cepa DENV-2 PL046, apresentam viremia poucos dias após a infecção, e trombocitopenia transiente em

momentos mais tardios (Huang *et al.*, 2000). Já os camundongos AG129, não possuem os receptores de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , sendo mais susceptíveis a baixas doses do vírus (Shresta *et al.*, 2004; Bente & Rico-Hesse, 2006; Balsitis *et al.*, 2009). Eles são bastante usados em testes de proteção de vacinas contra DENV e para estudos relacionados ao ADE (Kyle *et al.*, 2008; Zompi & Harris, 2012; Brewoo *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014). Entretanto, há uma limitação deste modelo no que se refere à ausência de sinalização e produção de IFN pelos camundongos. Isso impossibilita, em parte, a análise da resposta imune celular do hospedeiro contra o DENV, comprometendo os estudos de resposta gerada por vacinas contra o vírus (Zellweger & Shresta, 2014).

Os camundongos humanizados não possuem as respostas imune humoral e celular eficazes, logo possuem imunodeficiência severa combinada (SCID). Isto se deve à deficiência no desenvolvimento de células B e T, porém podem ser enxertados com células de diferentes origens para melhorar o desempenho da infecção por DENV e assim, serem capazes de reproduzir a doença (Zompi & Harris, 2012). O DENV é capaz de infectar camundongos SCID enxertados com linhagens celulares humanas como: K562, Huh7 ou HepG2. Ele replica, principalmente, em células tumorais enxertadas e posteriormente no cérebro destes camundongos (Yauch & Shresta, 2008; Smith *et al.*, 2014). Por conta destas características, não é um modelo indicado para estudos de patologia da dengue, mas sim, para testes de atenuação de vacinas vivas (Bäck & Lundkvist, 2013; Yauch & Shresta, 2014). Esses camundongos também podem ser enxertados com células humanas hematopoiéticas, porém não é muito eficiente, visto que eles possuem resposta imune inata. Por isso utilizam camundongos diabéticos não obesos NOD/SCID/IL2R $\gamma$ KO, que possuem resposta humoral, hemolítica do complemento e das células NK, T e B deficientes (Bente & Rico-Hesse, 2006). A desvantagem é que dependendo da linhagem celular utilizada no enxerto, a sintomatologia pode variar, e o fato de apresentarem uma deficiência severa do sistema imune gera algumas dificuldades para estudar a patogênese da doença (Yauch & Shresta, 2008).

Como o objetivo principal deste trabalho foi buscar uma melhor compreensão sobre a neuropatogênese da dengue, uso de camundongos imunocompetentes do tipo BALB/c foi o mais adequado e viável para nossos estudos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O estabelecimento de modelos animais para estudos de infecção e doença causada pelos DENV é de grande relevância para as diversas áreas de pesquisa em dengue, incluindo patogênese, imunidade, desenvolvimento de fármacos e teste de vacinas. No entanto, esta necessidade tem sido um desafio, uma vez que os vírus epidêmicos circulantes não infectam naturalmente espécies não-humanas (Zompi & Harris, 2012). Nesse contexto, propomos neste trabalho, a caracterização das alterações histopatológicas no sistema nervoso central (cérebro/cerebelo), principalmente no estudo relacionado aos danos causados nas células da neuroglia, investigando suas principais alterações ultraestruturais, detecção da proteína NS3 e citocinas no modelo murino suscetível aos DENV. Também investigamos os mesmos marcadores no tecido nervoso humano de casos fatais de dengue. A partir destes achados, confirmamos o tropismo do DENV no sistema nervoso central no modelo murino e em casos fatais, bem como o esclarecimento sobre as lesões envolvidas na neuropatogênese da dengue.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar os efeitos ocorridos no sistema nervoso central de camundongos BALB/c infectados com DENV-2 e comparar com os danos observados em casos fatais de dengue ocorridos em humanos.

#### **3.2 Específicos**

1. Analisar a susceptibilidade dos camundongos BALB/c ao DENV-2 não-neuroadaptado pela via intravenosa (i.v.);
2. Analisar as alterações histopatológicas no cérebro e cerebelo dos camundongos infectados e de casos fatais por dengue em humanos;
3. Caracterizar as populações de células da neuroglia (astrócito/microglia) no cérebro e cerebelo dos camundongos infectados e de casos fatais por dengue em humanos;
4. Analisar as principais alterações ultraestruturais de células do tecido cerebral e cerebelar dos camundongos infectados;
5. Avaliar replicação viral através da detecção do antígeno NS3 de dengue no cérebro e cerebelo dos camundongos infectados e nos casos fatais humanos;
6. Avaliar a resposta imune através da detecção de citocinas, células TCD8<sup>+</sup>, e caracterizar a região de barreira hematoencefálica no cérebro dos camundongos infectados com DENV-2 e nos casos fatais de dengue em humanos.
7. Avaliar a susceptibilidade de cultura primária composta por células do córtex cerebral de camundongos neonatos ao DENV-2 não-neuroadaptado;
8. Avaliar tropismo e replicação do vírus DENV-2 em células da microglia em cultura de córtex de camundongos neonatos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 O vírus

O vírus utilizado neste trabalho para infecção dos animais foi o sorotipo 2 do vírus da dengue (DENV-2), isolado do soro de paciente durante epidemia no estado do Rio de Janeiro entre 1990 e 1991 (Nogueira *et al.*, 1993) e cedido pela Dra. Rita Nogueira do Laboratório de Flavivírus/IOC/Fiocruz/RJ. O vírus não sofreu passagens no cérebro de camundongos, sendo um vírus não neuroadaptado a camundongos. A propagação do vírus foi feita em células C6/36 de mosquitos do tipo *Aedes albopictus*, utilizando o meio L-15 (Sigma, USA) suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de triptose fosfato e 10% de soro fetal bovino durante 15 dias à 28°C. Sua identificação foi realizada pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo monoclonal específico para DENV-2 (3H5) e, posteriormente titulado em células C6/36 pelo método de Reed & Muench (1938).

### 4.2 Infecção experimental

Foram utilizados camundongos machos BALB/c e SPF (do inglês “*specific pathogen free*”) com cerca de dois meses de idade, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB, Campinas/SP). Estes camundongos (n=12; 4: *mock*, 4: 2º d.p.i, 4: 7º d.p.i) foram inoculados com 20 µl DENV-2 pela via intravenosa (i.v.) (titulação=  $10^{11}$  TCID<sub>50</sub> / 0.02 mL; diluição=  $10^2$  TCID<sub>50</sub> / 0.02 mL), na veia caudal e eutanasiados no 2º e 7º dias pós-infecção (d.p.i.). Para inoculação do vírus e do meio L-15, os camundongos foram primeiramente sedados com uma solução anestésica de cloridrato de quetamina (100 mg/kg animal) (Cristália) e cloridrato de xilazina (10mg/kg animal) (Syntec) diluídos em tampão fosfato salino estéril que foi aplicada via intramuscular (Erhardt *et al.* 1984). Os camundongos utilizados como controle negativo foram inoculados somente com o meio L-15, sendo identificados como *mock*.

### **4.3 Procedimentos éticos**

Lembrando que todo o procedimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, CEUA-FIOCRUZ (P-12/11-3).

Além disso, neste trabalho também foram utilizados tecidos humanos provenientes de quatro casos fatais de dengue, obtidos durante a epidemia de DENV-3 em 2002 e de DENV-2 nos anos 2008 e 2010 no Rio de Janeiro. O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FIOCRUZ, sob o número CAAE: 47525115.3.0000.5248.

### **4.4 Processamento do material histológico**

Para a coleta de cérebro e cerebelo, os camundongos foram eutanasiados com uma dose maior da solução anestésica, cloridrato de xilazina (30 mg/kg animal) e de cloridrato de ketamina (400 mg/kg animal). O material coletado foi submetido a um processamento histológico, como descrito adiante. Primeiramente, cérebro e cerebelo foram fixados por imersão em formalina tamponada (100 mL de formol 40%, 4,0 g de fosfato de sódio monobásico, 4,5 g de fosfato de sódio bifásico em 900 mL de água destilada). Após a etapa de fixação, que teve duração de aproximadamente 48 horas, o material foi clivado de forma longitudinal em fragmentos menores. Esses fragmentos foram submetidos a lavagens em água corrente por 1 hora e desidratados ao sofrerem passagens em concentrações crescentes de etanol de 70%, 90%, 95% e 100%. Após esta etapa, o material foi clarificado em xilol, utilizando três passagens por 30 minutos cada, e infiltrados em parafina (Histostec Pastilhas, Merck) por 2 horas no inclusor Tissue Embedding Center (TISSUE-TEC II). Após a parafinização, os fragmentos foram retirados do suporte para serem emblocados em parafina, para a realização de cortes com 5 µm de espessura no micrótomo LEICA RM2235, em lâminas de vidro.

#### **4.5 Coloração Hematoxilina e Eosina (H.E.)**

Para realizar a coloração em hematoxilina e eosina (H.E.), as lâminas contendo os cortes, passaram pela etapa de desparafinização na estufa à 60°C por 30 minutos. Para dar continuidade ao processo, sofreram passagens em três banhos de xilol, três de etanol (concentrações decrescentes – absoluto, 90% e 70%) e em água destilada, para a coloração com hematoxilina de Harris (5 g de hematoxilina, 50 mL de etanol 95%, 2,5 g de óxido de mercúrio, 100 mL de alúmen de potássio e 4 mL de ácido glacial) por 50 segundos. Posteriormente, os cortes sofreram lavagens de água corrente e foram corados com Eosina-Floxina (10 mL de Floxina 1%, 100 mL de Eosina 1%, 760 mL de etanol 95%, 4 mL de ácido acético glacial) por 40 segundos. Por fim, após as etapas de água corrente e três banhos de concentrações crescentes de etanol e três de xilol, as lâminas foram montadas com resina Entelan (Merk) e lamínulas de vidro.

#### **4.6 Análises histopatológicas**

As lâminas foram analisadas com auxílio do Microscópio de Epifluorescência Olympus BX 53 para observação em microscopia óptica de campo claro. A captura das imagens foi realizada a partir de uma câmara fotográfica (Olympus DP72) acoplada.

#### **4.7 Imunohistoquímica**

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, cérebro e cerebelo emblocados em parafina, foram cortados em 5 µm de espessura e transferidos para lâminas silanizadas (3-aminopropiltriétoxi-silane, Sigma), para garantir a adesão do corte à lâmina. As lâminas foram desparafinizadas na estufa à 60°C por 1 hora, passadas em três banhos de xilol, três de etanol 95% e lavadas em água destilada. A recuperação antigênica foi feita em Tampão Citrato pH 6,0. Posteriormente, foram feitas lavagens em água destilada e três vezes com tampão Tris-HCl (3,8 mL de HCl 1N; 0,6 g de Trizma® base – Sigma; 8 g de NaCl e 1 L de H<sub>2</sub>O destilada; pH 7,4) por 3 min cada lavagem. Foram

incubadas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e metanol (diluição 1:1) durante 10 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos, foi utilizado bloqueador de proteínas (Protein Block – Spring Bioscience) sobre os cortes durante 10 minutos e então Tris-HCl, para incubá-los com os anticorpos primários listados na tabela a seguir, “overnight” à 4°C.

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Origem/Marca</b>	<b>Diluição</b>	<b>Deteção</b>
Anti-NS3	Coelho/produzido no Instituto de Biofísica (UFRJ) - expresso em <i>Escherichia coli</i> , purificado e inoculado em camundongos BALB/c	1:100	Proteína NS3
Anti-IBA-1	Coelho/Wako	1:200	Microglia
Anti-F4/80	AbDSerotec	1:200	Microglia
Anti-GFAP	Camundongo/Sigma	1:200	Astrócitos
Anti-TNF- $\alpha$	Coelho/Abcam	1:200	TNF- $\alpha$
Anti-IFN- $\gamma$	Coelho/Abbiotec	1:100	Interferon- $\gamma$
Anti-RANTES	Coelho/Abcam	1:300	RANTES
Anti-BBB	Camundongo/Sigma	1:100	Barreira-hematoencefálica

**Tabela 1.1:** Anticorpos utilizados em tecido murino. Informações de anticorpos primários, origem/marca, diluição utilizada e deteção.

No segundo dia, os cortes permaneceram 20 minutos à temperatura ambiente e sofreram três lavagens em Tris-HCl e uma em água destilada. Posteriormente, foram aplicados o reagente complemento (Complement: Cat # DCMT-XXX; Spring Bioscience), que é um anticorpo secundário de coelho anti-camundongo por 10 minutos. Em seguida foi aplicado seu conjugado (HRP Conjugate: Cat # DHRR-XXX; Spring Bioscience), que é um anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado ao HRP por 15 minutos. Foram feitas lavagens com Tris-HCl e água destilada, e a revelação foi feita utilizando o substrato para peroxidase, diaminobenzidina (DAB) (Kit DAB – Diagnostic Biosystems). Os cortes passaram por lavagens em água destilada e água corrente (5 minutos) e foram contrastados com Hematoxilina de Mayer (Sigma) por 1 minuto. Por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente e passadas em três banhos de etanol 95%, três de xilol e montadas com Entelan (Merk).

O material foi analisado em Microscópio de Epifluorescência Olympus BX 53 com câmara fotográfica Olympus DP72 acoplada. Para os anticorpos anti-IBA-1 e anti-GFAP, foram capturadas 50 imagens aleatórias na objetiva de 100x pelo programa Image Pro versão 4.5. Após a captura das imagens, foi feita a quantificação do número de células positivas para tais anticorpos dividindo-se por 50 (número de imagens), para a determinação do número de células positivas por campo em cada tempo da cinética analisado.

#### **4.8 Infecção em cultura primária de células do sistema nervoso central e imunocitoquímica**

Foram realizadas culturas gliais mistas, a partir do protocolo adaptado de Lima *et al.*, 2001. Resumidamente, camundongos neonatos foram sacrificados para retirada dos cérebros, dissecação e dissociação mecânica do córtex cerebral. As células (basicamente neurônios e células da glia) foram então plaqueadas em lâminas Labtec de vidro previamente revestidas com polilissina (aproximadamente 90.000 células por poço) em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e incubadas à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar atmosférico por 7 dias. Posteriormente houve troca do meio e, no

12º dia, a cultura foi infectada com 20 µl de DENV-2 e fixada com paraformaldeído 4% após 48 horas.

Em seguida, prosseguiu-se com o bloqueio das lâminas com PBS-BSA 5% por 30 minutos à temperatura ambiente para realização da imunocitoquímica para detecção da proteína NS3 (coelho, anti-NS3, 1:100 em PBS-BSA 1%, *overnight* à 4°C) e de células da microglia (rato, anti-F4/80, 1:200 em PBS-BSA 1%, *overnight* à 4°C). Foram utilizados anticorpos secundários Alexa Fluor cabra anti-camundongo 488 e Alexa Fluor cabra anti-rato 546 (1:400 em PBS-BSA 1%, 1h à 37°C) e os núcleos foram corados com DAPI.

#### **4.9 Microscopia eletrônica**

Para a realização desta técnica, os fragmentos do sistema nervoso central (cérebro e cerebelo) dos camundongos foram previamente fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,2 M, lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, novamente lavados em tampão cacodilato, desidratados em concentrações crescentes de acetona, embebidos em Epon (Electron microscopy) de dureza média (A/B 3:1) e polimerizados à 60º C por 3 dias. O material foi processado para cortes histológicos ultrafinos para observação em microscopia eletrônica de transmissão. Para análises ultraestruturais das secções ultrafinas, os blocos foram clivados com espessura de 50 à 70 nm, utilizando ultramicrótomo (Zeiss), e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963).

#### **4.10 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com apoio do *software GraphPad Prism 5* (La Jolla, CA, USA), versão 4.03. As diferenças estatísticas foram definidas pelo teste *U Mann Whitney* para avaliar as diferenças entre os grupos de camundongos. Lembrando que foram considerados valores significativos  $P < 0,05$ . Foram analisadas as células da microglia e astrócitos no tecido cerebral dos camundongos controle *mock* e os infectados no 2º e 7º d.p.i.

#### 4.11 Descrição do controle humano e dos casos fatais de dengue:

- **Controle:** Homem, 70 anos. Paciente negativo para dengue. O paciente apresentou broncopneumonia, nefroesclerose, hemorragia digestiva alta, úlcera duodenal, cardiopatia hipertensiva, sem manifestações neurológicas.
  
- **Caso 1:** Homem, 24 anos. Paciente deu entrada na emergência do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) com suspeita de dengue. Necropsia mostrou choque com hemorragia pulmonar bilateral multifocal e broncopneumonia bilateral, com derrame pleural bilateral discreto. Linfadenomegalia mesentérica pericortical. Apresentando hepatoesplenomegalia, com esteatose e colestase. Além de hiperemia da mucosa gástrica.
  
- **Caso 2:** Mulher, 21 anos. Febre, mialgia, dor de cabeça por 8 dias, metrorragia, náuseas, vômito e diarreia. Antes de ser hospitalizada foi examinada por outro serviço de saúde com diagnóstico hipotético de dengue devido à severa leucopenia e trombocitopenia (plaquetas: 10.000 /mm<sup>3</sup>). A paciente foi admitida na UTI do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) com falha respiratória, evoluindo para falha de outros órgãos e choque. Parâmetros bioquímicos avaliados: aspartato aminotransferase 149 UI/L; alanina aminotransferase 66 UI/L; glicose 158 mg/dL; creatinina 1,10 mg/dL e ureia 9,0 mg/dL.
  
- **Caso 3:** Mulher, 41 anos. Deu entrada no hospital Miguel Couto, relatando fraqueza, desmaio, sudorese, dor epigástrica, febre há 2 dias, dor abdominal e corrimento amarelado. Relato de fraqueza, desmaio, sudorese, dor epigástrica e abdominal. Hematócrito 48%, leucocitose. Ultrassom mostrou fluido na cavidade abdominal. A paciente apresentou encefalite de provável etiologia viral. Paciente morreu com diagnóstico de dengue hemorrágica causando edema pulmonar agudo.
  
- **Caso 4:** Mulher, 61 anos. Hospitalizada no hospital Miguel Couto, com sintomas suspeitos de dengue (febre, mialgia, vômito e diarreia). Parâmetros bioquímicos avaliados do soro: creatinina 1,07 mg/dL; ureia 22,9 mg/dL; glicose

104 mg/dL. A paciente apresentou edema cerebral discreto e faleceu devido a um edema pulmonar agudo e parada cardíaca súbita.

Fragmentos do cérebro/cerebelo proveniente de casos fatais de dengue foram submetidos ao processamento histológico, da mesma forma que o tecido murino, para observação das principais alterações histopatológicas. Foram realizadas técnicas de coloração para H.E. e de imunohistoquímica utilizando os marcadores citados na tabela a seguir:

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Origem/Marca</b>	<b>Diluição</b>	<b>Detecção</b>
Anti-IBA-1	Coelho/Wako	1:200	Microglia
Anti-GFAP	Camundongo/Sigma	1:200	Astrócitos
Anti-NS3	Coelho/produzido no Instituto de Biofísica (UFRJ) - expresso em <i>Escherichia coli</i> , purificado e inoculado em camundongos BALB/c	1:300	Proteína NS3
Anti-3H5	Camundongo/Merck	1:100	DENV-2
Anti-DENV-3	Produzido em rato suíço inoculado com DENV-3	1:300	DENV-3
Anti-CD8	Camundongo/Dako	1:100	Células T CD8 <sup>+</sup>
Anti-CD68	Camundongo/Santa Cruz	1:100	Macrófagos
Anti-TNF- $\alpha$	Coelho/Abcam	1:200	Tnf- $\alpha$
Anti-IFN- $\gamma$	Coelho/Santa Cruz	1:100	Interferon- $\gamma$
Anti-RANTES	Coelho/Abcam	1:300	RANTES

**Tabela 1.2:** Anticorpos utilizados em tecido humano. Informações de anticorpos primários, origem/marca, diluição utilizada e detecção.

## 5 RESULTADOS

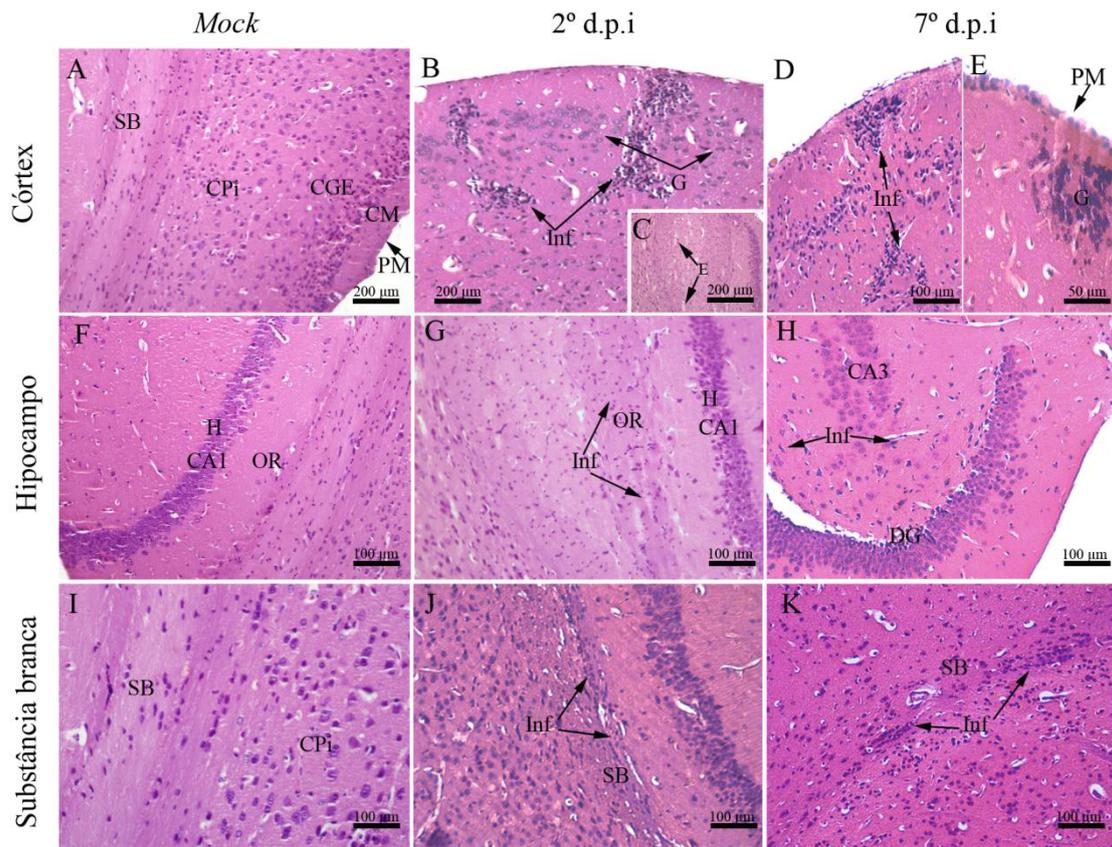
Camundongos BALB/c foram inoculados pela via i.v. com uma amostra de DENV-2 isolado de paciente e não adaptado a camundongos. Todos os animais sobreviveram à infecção e aparentemente não apresentaram sinais clínicos. Entretanto, foram realizadas análises histopatológicas do tecido nervoso (cérebro e cerebelo) destes animais, demonstrando efeitos da infecção viral.

### 5.1 Avaliação histopatológica do cérebro de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v.

Ao avaliar as principais alterações histopatológicas no córtex cerebral de camundongos BALB/c inoculados com DENV-2 pela via i.v., foi observado que os camundongos infectados no 2º d.p.i. apresentaram alterações perceptíveis no parênquima cerebral, como áreas focais de infiltrado inflamatório (Fig. 1B), e edema na substância branca (Fig. 1C). Nos camundongos infectados no 7º d.p.i., o infiltrado se mostrou de forma mais difusa em regiões perivasculares (Fig. 1D). Além disso, também foi observado espessamento da camada da pia máter (Fig. 1E); assim como o aumento de células gliais, sugerindo gliose reacional (Fig. 1D/1E). Em contrapartida, não foram observadas nenhuma destas alterações no tecido cerebral de camundongos inoculados somente com o meio L-15, que foram utilizados como controle “*mock*” (Fig. 1A).

Na região do hipocampo dos camundongos infectados no 2º d.p.i., foi possível observar infiltrado focal de células da microglia na região do estrato de orientação da região CA1 (Fig. 1H), que se mostrou mais difuso nos camundongos no 7º d.p.i., principalmente na região CA3 (Fig. 1G). A área hipocampal não se mostrou alterada nos camundongos “*mock*” (Fig. 1F).

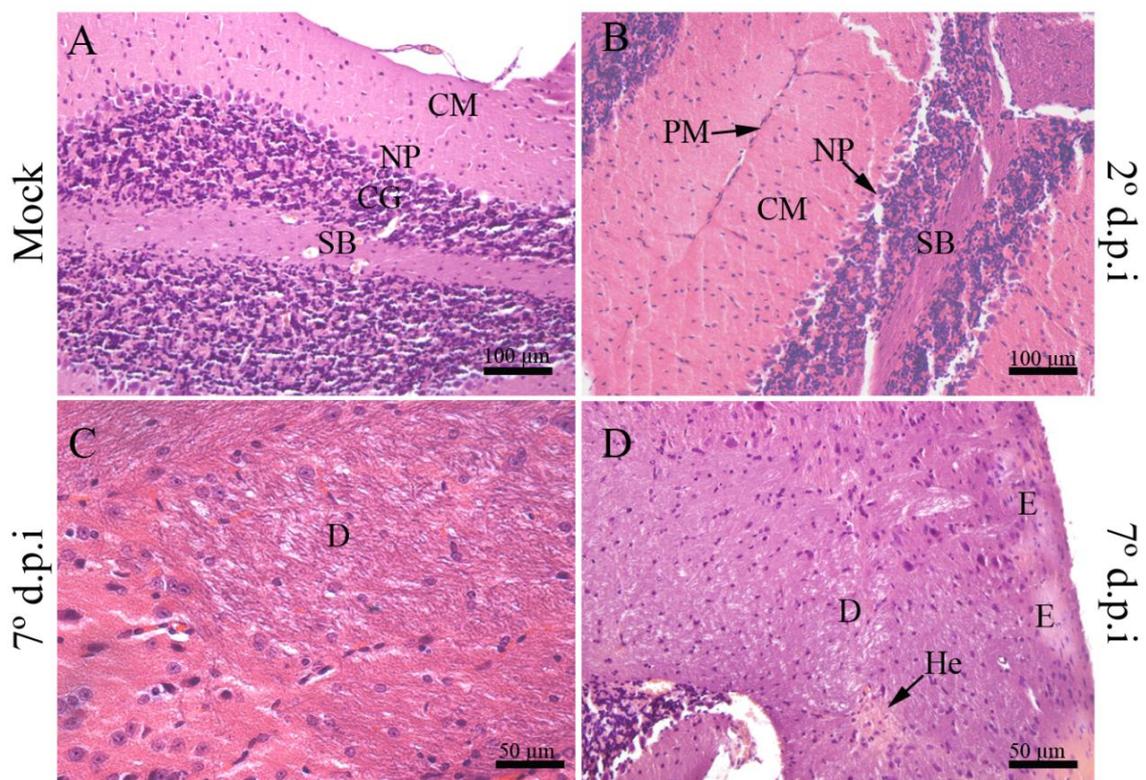
Na região da substância branca foi observada a mesma tendência de aumento de infiltrado de células da microglia dos camundongos infectados no 2º d.p.i. (Fig. 1J), e no 7º d.p.i. houve um aumento dessas células principalmente nas regiões perivasculares (Fig. 1K), enquanto que nos camundongos “*mock*”, esta região se mostrou inalterada (Fig. 1I).



**Figura 5.1:** Alterações histopatológicas no tecido cerebral dos camundongos infectados com DENV-2. Córtex cerebral e região de substância branca de camundongo controle inoculado somente com meio L-15 (*mock*) (A); Infiltrados focais de células inflamatórias e de células gliais (B) e edema na região da substância branca no 2º d.p.i. (C); Infiltrado perivascular (D) e espessamento da região da pia máter e gliose reacional (E); Região hipocampal de camundongo *mock* (F); Infiltrado focal de células de microglia no hipocampo de camundongos infectados no 2º d.p.i. (G); Infiltrado difuso no hipocampo de camundongos infectados no 7º d.p.i. (H); Substância branca de camundongo *mock* (I); Substância branca com infiltrado inflamatório focal no 2º d.p.i. (J) e difuso em áreas perivasculares no 7º d.p.i. (K). PM – Pia máter; CM – Camada molecular; CGE – Camada granulosa externa; CPi – Camada de neurônios piramidais. H – Hipocampo; CA1 – Região CA1 do hipocampo; CA3 – Região CA3 do hipocampo; OR – Estrato de orientação; SB – Substância branca; Inf – Infiltrado; G – Gliose; E – Edema.

## 5.2 Avaliação histopatológica do cerebelo de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v.

No tecido cerebelar, também foram observadas algumas alterações, como aumento do infiltrado de células inflamatórias da região da pia mãe de camundongos infectados no 2º d.p.i., assim como a camada de neurônios de Purkinje apresentando suas células com degeneração (Fig. 2B). Houve também a ocorrência de desmielinização na substância branca (Fig. 2C) e no núcleo interno do cerebelo, assim como hemorragia e edema no 7º d.p.i. (Fig. 2D).



**Figura 5.2:** Alterações histopatológicas no tecido cerebelar dos camundongos infectados com DENV-2. Tecido cerebelar de camundongo controle inoculado somente com meio L-15 (*mock*) (A); Infiltrado de células inflamatórias na região da pia mãe no 2º d.p.i., e neurônios de Purkinje com início de degeneração (B); Substância branca exibindo desmielinização (C); Região do núcleo cerebelar com desmielinização, hemorragia e edema no 7ºd.p.i (D). PM – Pia-máter; CM – Camada molecular; NP – Neurônios de Purkinje CG – Camada da granulosa; SB – Substância branca; D – Desmielinização; He – Hemorragia; E – Edema.

### 5.3 Detecção de microglia e astrócitos no cérebro de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v.

Diante das alterações histopatológicas observadas no tecido cerebral e cerebelar, células da neuroglia, como microglia e astrócitos foram caracterizadas através da fenotipagem por marcadores específicos, onde estas apresentam importante papel no funcionamento e manutenção do tecido nervoso. A partir da técnica de imunohistoquímica, foi feita a detecção e caracterização dessas células.

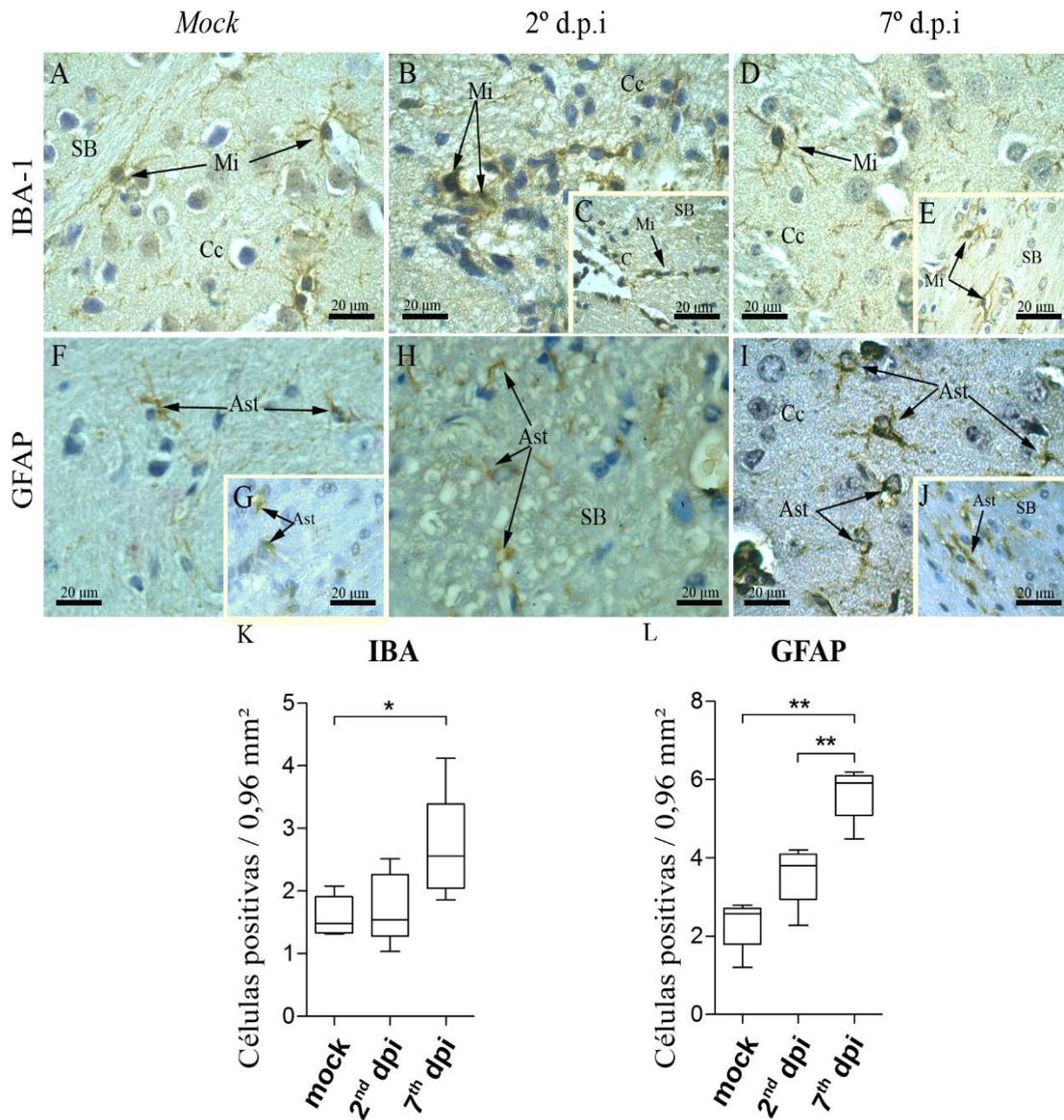
Foi observado que nos camundongos *mock*, as células da microglia se apresentaram em formato ramificado, com finos e extensos prolongamentos, tanto no córtex como na substância branca (Fig. 3A). Já nos camundongos infectados no 2º d.p.i., estas células sofreram retração de seus prolongamentos, adquirindo um formato ameboide tanto no córtex (Fig. 3B), quanto ao redor dos capilares na substância branca (Fig. 3C). Estas características morfológicas remetem à ativação destas células. Nos camundongos infectados no 7º d.p.i., algumas células pareciam voltar a adotar seu formato ramificado, de células não ativadas; no córtex (Fig. 3D) e na região da substância branca (Fig. 3E).

Em relação aos astrócitos, estes se apresentaram com prolongamentos finos nos camundongos *mock*, tanto na região cortical (Fig. 3F), quanto na substância branca (Fig. 3G). Enquanto isso, nos camundongos infectados, estas células apresentaram prolongamentos mais grosseiros com aspecto de atrofia, tanto no 2º (Fig. 3H) quanto no 7º d.p.i. (Figs. 3I/3J).

Após a análise da morfologia, foi realizada uma quantificação das células positivas para o anticorpo anti-IBA-1 e para o anticorpo anti-GFAP, nos camundongos *mock*, e nos infectados (2º e 7º d.p.i.). O anticorpo anti-IBA-1 se liga à molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado, presente nas células da microglia; enquanto que o anticorpo anti-GFAP, se liga à proteína ácida fibrilar glial, uma proteína de filamento intermediária expressa em células gliais, como os astrócitos.

Ao realizar a análise estatística das células positivas para IBA-1, a partir do teste U Mann Whitney foi observada diferença estatisticamente significativa

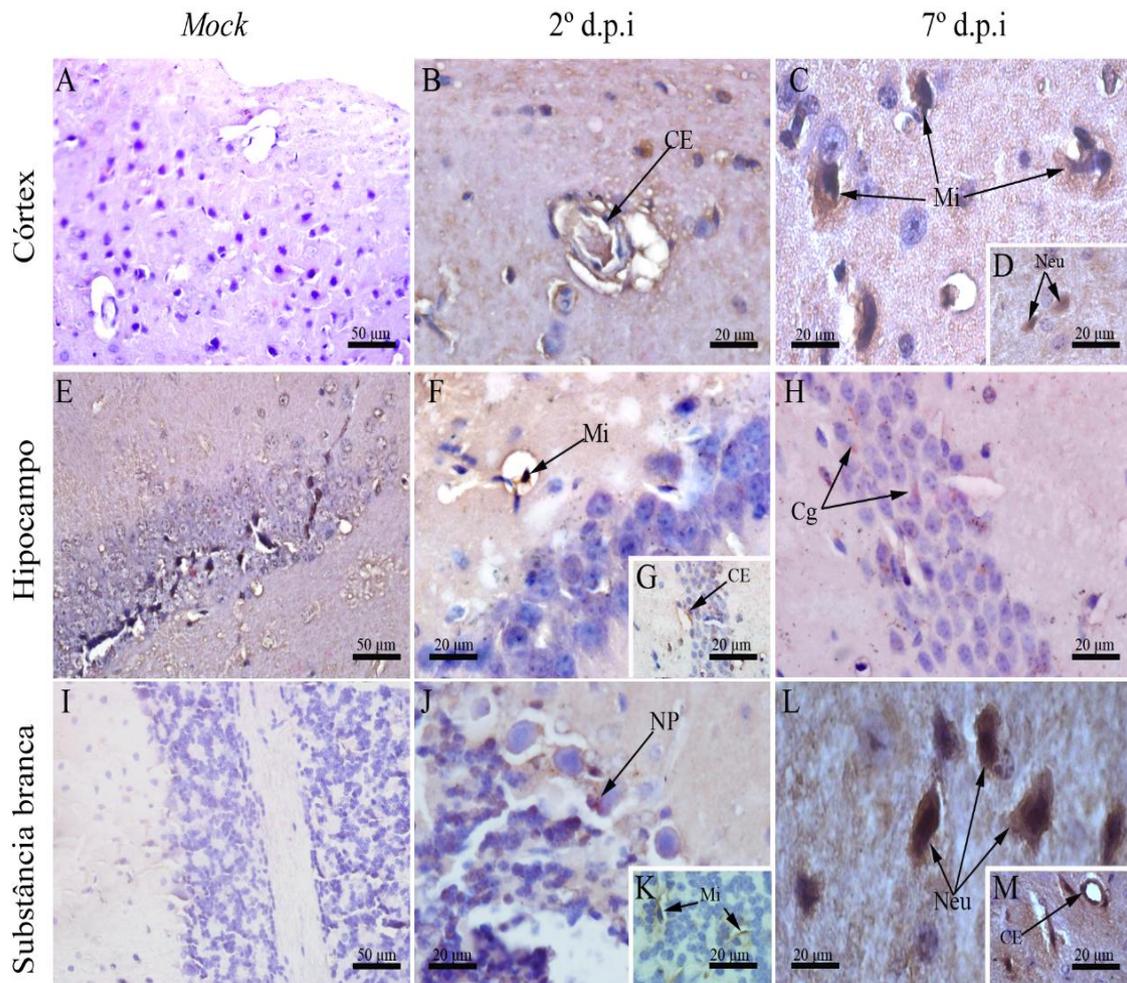
entre os grupos *mock* e infectados no 7º d.p.i. Já para as células positivas para GFAP, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos *mock* e 7ºd.p.i. (Fig. 3K) e entre 2º d.p.i. e 7º d.p.i. (Fig. 3L).



**Figura 5.3: Fotomicrografias e quantificação de células da microglia e astrócitos no tecido cerebral de camundongos *mock* e infectados.** Detecção de microglia no córtex cerebral e na substância branca de camundongos *mock* (A); Detecção de microglia ao redor de capilares no córtex (B) e na substância branca (C) dos camundongos infectados no 2º d.p.i.; Detecção de microglia no córtex (D) e na substância branca (E) dos camundongos infectados no 7º d.p.i., Detecção de astrócitos em camundongos *mock* na área cortical (F) e na substância branca (G); Detecção de astrócitos na substância branca de camundongos infectados no 2º d.p.i. (H), e no 7º d.p.i., no córtex (I) e na substância branca (J); Quantificação de células positivas para IBA (K); e GFAP (L). Cc – córtex cerebral; SB – Substância branca; Mi – Microglia; Ast – Astrócitos; C – Capilares.

#### **5.4 Detecção da proteína NS3 no tecido cerebral e cerebelar de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v.**

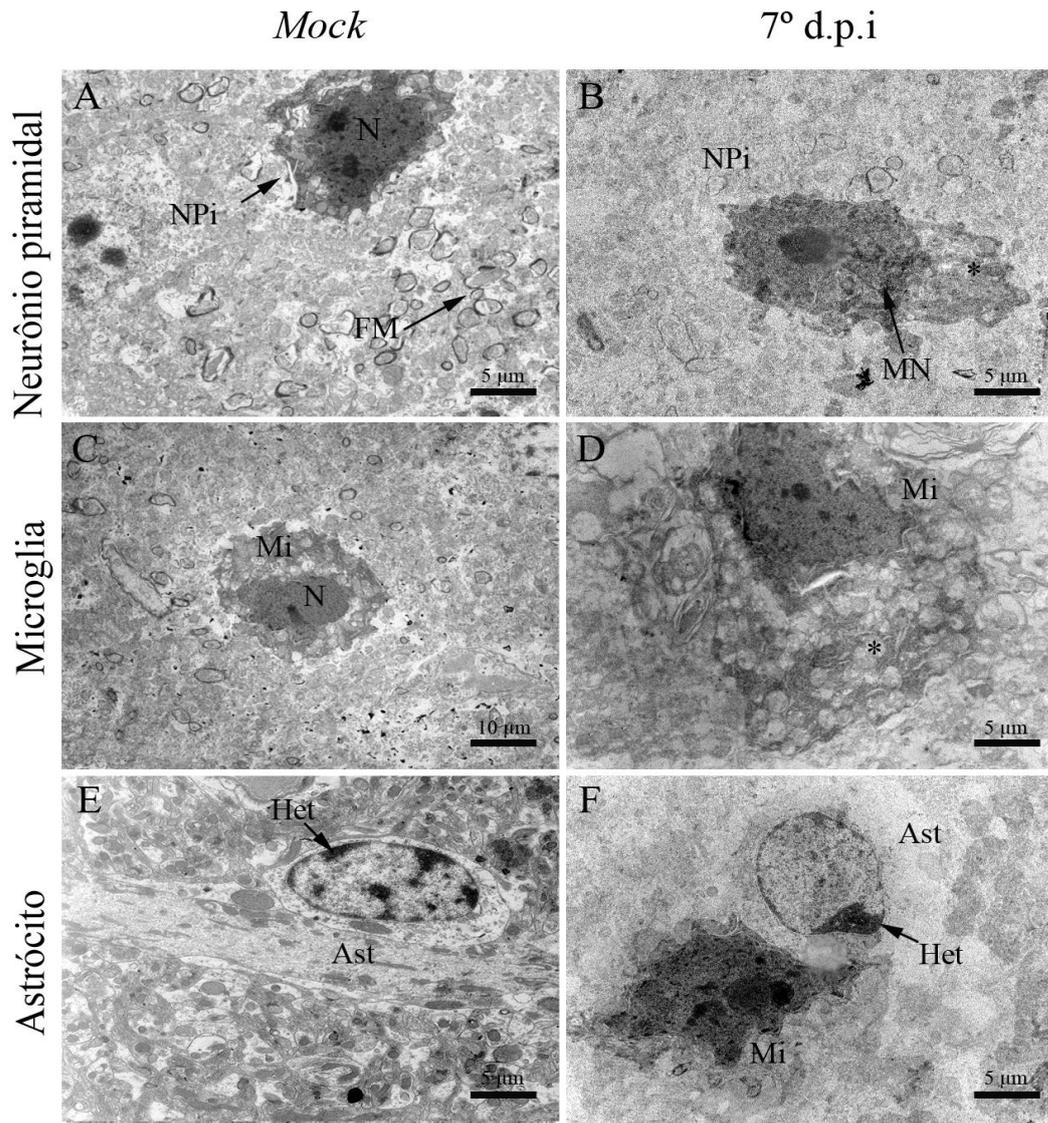
Após observar estas alterações teciduais e celulares, foi feita a investigação dos antígenos virais, para saber se estava havendo replicação do vírus ou não. Como a proteína NS3 é uma proteína não estrutural que participa ativamente do processo de replicação do vírus, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para identificar esta proteína, a fim de analisar se o vírus foi capaz de replicar e em quais células. Foi possível detectar a proteína NS3 em células endoteliais de capilares cerebrais de camundongos infectados no 2º d.p.i. (Fig. 4B); em microglia (Fig. 4C) e em neurônios no 7º d.p.i. (Fig. 4D). Na região do hipocampo, a proteína NS3 foi detectada em microglia (Fig. 4F) e em células endoteliais de camundongos infectados no 2º d.p.i. (Fig. 4G); e em células granulares do hipocampo no 7º d.p.i. (Fig. 4H). Já na região cerebelar, os neurônios de Purkinje se mostraram positivos para esta proteína (Fig. 4J), assim como a microglia no 2º d.p.i. (Fig. 4K). Nesta região, no 7º d.p.i., observou-se também marcação para NS3 em neurônios (Fig. 4L) e em células endoteliais (Fig. 4M).



**Figura 5.4:** Fotomicrografias da detecção da proteína NS3 no tecido cerebral e cerebelar dos camundongos infectados. Córtex cerebral (A), hipocampo (E) e cerebelo de camundongo *mock* (I). Detecção da proteína NS3 em célula endotelial de capilar de camundongos infectados no 2º d.p.i. (B). Detecção da proteína NS3 em microglia (C) e neurônios de camundongos infectados no 7º d.p.i. (D). Detecção da proteína NS3 na região hipocampal em microglia (F) e células endoteliais no 2º d.p.i. (G); e em células granulosas no hipocampo no 7º d.p.i. (H). Detecção da proteína NS3 em neurônios de Purkinje (J) e microglia no 2º d.p.i. (K); e em neurônios (L) e célula endotelial no 7º d.p.i (M). CE – Célula endotelial; Cg – Célula granulosa; Mi – Microglia; Neu – Neurônios; NP – Neurônios de Purkinje.

## **5.5 Avaliação ultraestrutural das células do cérebro de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v.**

A fim de obter uma análise mais detalhada das alterações celulares, foi realizada a análise ultraestrutural do cérebro pela técnica de microscopia eletrônica. Neurônios piramidais (Fig. 5B) e microglia (Fig. 5D) exibiram citoplasma expansivo, mitocôndrias tumefeitas e membrana nuclear irregular no 7<sup>o</sup> d.p.i, o que não foi observado nos camundongos controle *mock* (Figs. 5A/5C). Já os astrócitos apresentaram sua heterocromatina depositada em um pólo da célula (Fig. 5F), e não de forma distribuída como nos camundongos *mock* (Fig. 5E).

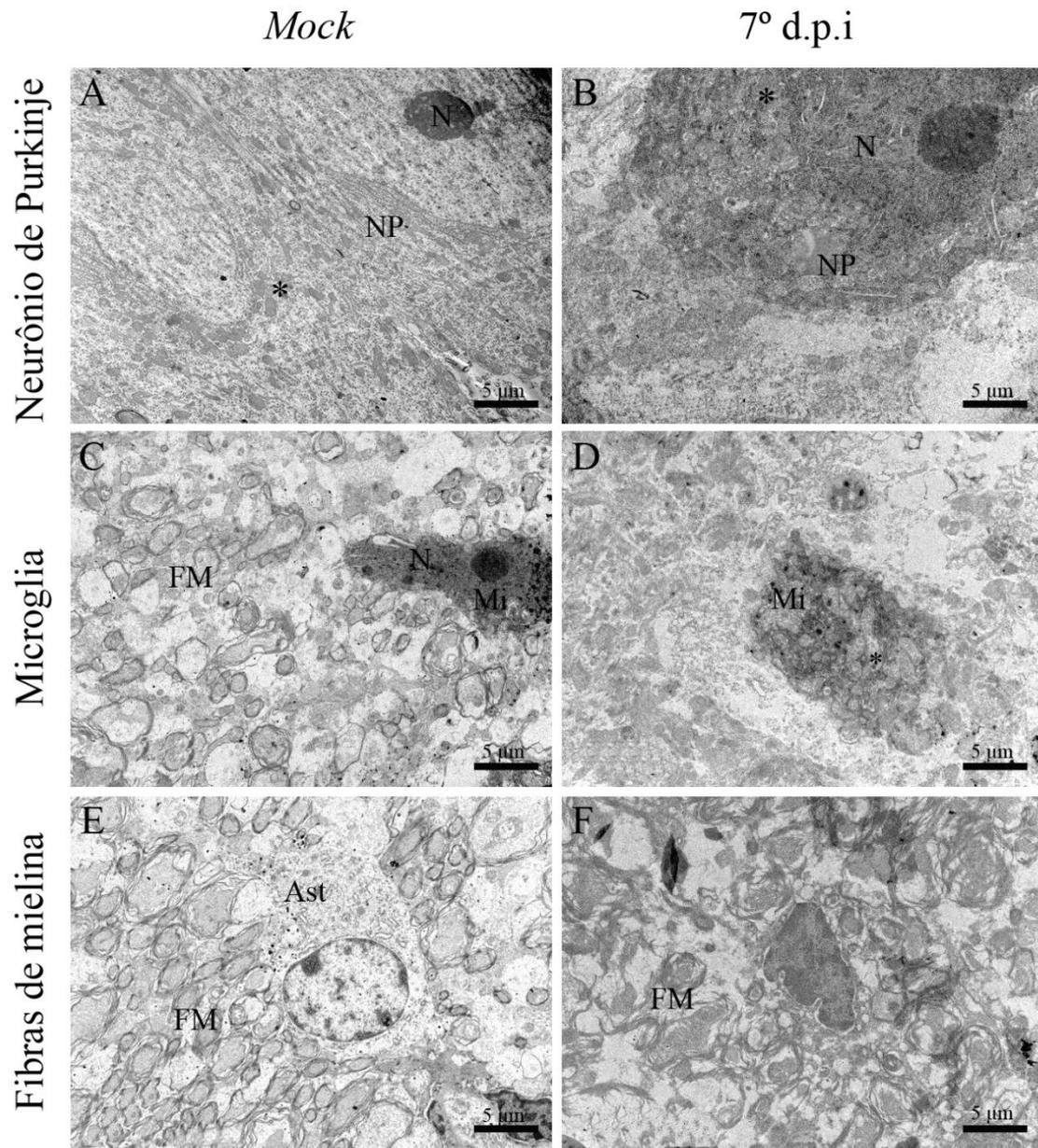


**Figura 5.5:** Alterações ultraestruturais no cérebro de camundongos infectados. Neurônio piramidal (A), microglia (C) e astrócitos em camundongo *mock* (E). Neurônio piramidal com membrana nuclear irregular (B), microglia com mitocôndrias tumefeitas (D) e astrócitos com deposição de heterocromatina em camundongos infectados no 7° d.p.i. (F). NPi – Neurônio piramidal; \* - Mitocôndrias; MN – Membrana nuclear; N – Núcleo; Mi – Microglia; Ast – Astrócitos; Het – Heterocromatina; FM – Fibras de mielina.

## **5.6 Avaliação ultraestrutural das células do cerebelo de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v.**

No cerebelo, os neurônios de Purkinje (Fig. 6B) e células da microglia (Fig. 6D) exibiram o mesmo padrão de alteração celular observada no tecido cerebral dos camundongos infectados. Tanto neurônio de Purkinje quanto microglia não tiveram alterações nos camundongos *mock*. Os astrócitos não apresentaram alterações significativas no tecido cerebelar. Na substância branca foi observada desorganização das fibras, sugerindo que as fibras de axônios mielinizados estivessem sofrendo processo de desmielinização nos camundongos infectados (Fig. 6F), o que não houve nos camundongos *mock* (Fig. 6E), confirmando os resultados encontrados na avaliação histopatológica.

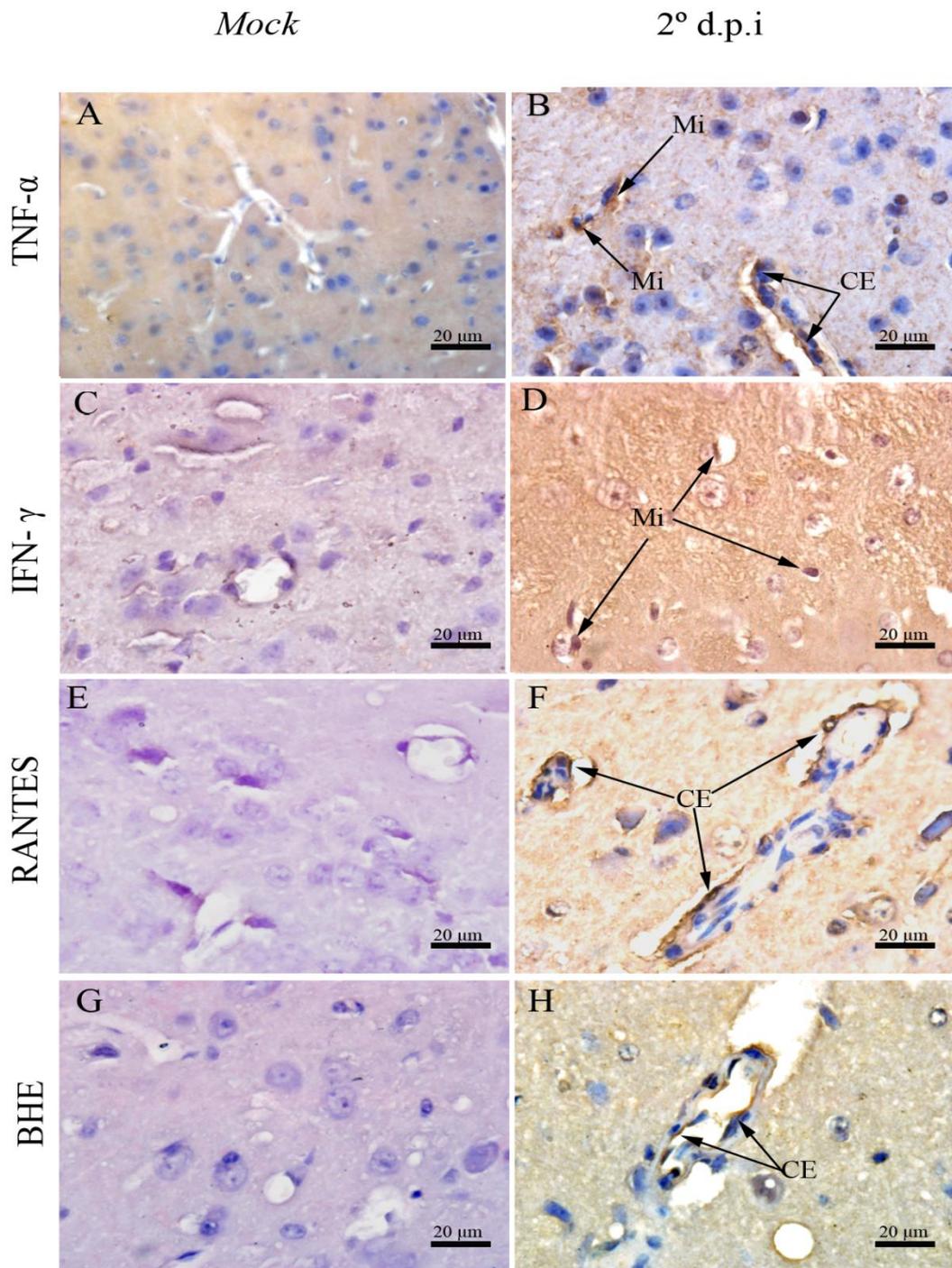
As alterações ultraestruturais foram mais visíveis e significativas nos camundongos infectados no 7<sup>o</sup> d.p.i.



**Figura 5.6:** Alterações ultraestruturais no cerebelo de camundongos infectados. Neurônio de Purkinje (A), microglia (C), e astrócitos em camundongo *mock* (E); Neurônio de Purkinje com mitocôndrias tumefeitas (B), microglia (D), e fibras de mielina com aspecto irregular no cerebelo de camundongos infectados no 7° d.p.i. (F). NP – Neurônio de Purkinje; Mi – Microglia; N – Núcleo; Ast – Astrócitos; FM – Fibras de mielina.

### **5.7 Detecção de citocinas e marcação de célula endotelial em área vascular de barreira hematoencefálica no tecido cerebral de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v.**

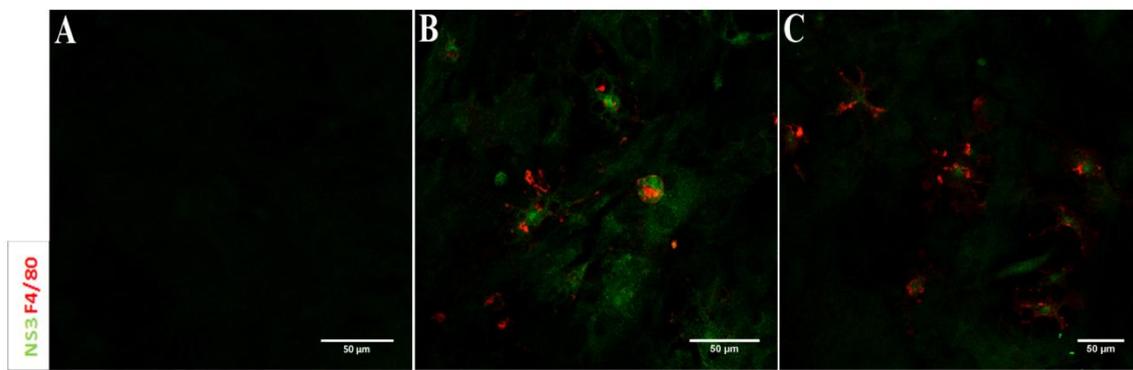
Após observar o predomínio de infiltrados inflamatórios nos camundongos infectados no 2º d.p.i., foi realizada a detecção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e RANTES, com o objetivo de elucidar os principais mediadores envolvidos na patogênese da dengue. Foi observada a detecção de TNF- $\alpha$  em microglia e células endoteliais (Fig. 7B), IFN- $\gamma$  em células da microglia (Fig. 7D), e RANTES, que indica alteração de permeabilidade vascular, em células endoteliais (Fig. 7F). Além disso, foi detectada a marcação em células endoteliais, com o anticorpo anti-*blood brain barrier*, caracterizando a região de barreira hematoencefálica, associada a infiltrado perivascular (Fig. 7H).



**Figura 5.7: Detecção de citocinas e célula endotelial em área de BHE no tecido cerebral de camundongos infectados com DENV-2.** Tecido cerebral de camundongo *mock* (A/C/E/G); Detecção de TNF- $\alpha$  em células da microglia e células endoteliais em camundongos infectados com DENV-2 no 2° d.p.i. (B). Detecção de IFN- $\gamma$  em células da microglia em camundongos infectados com DENV-2 no 2° d.p.i. (D). Detecção de RANTES em células endoteliais em camundongos infectados no 2° d.p.i. (F). Detecção de célula endotelial que compõe a barreira hematoencefálica em camundongos infectados no 2° d.p.i. (H). Mi – Microglia; CE – Célula endotelial.

## 5.8 Detecção da proteína NS3 em cultura primária de células corticais murinas infectadas com DENV-2

Após os resultados obtidos com o modelo “*in vivo*”, foi realizado experimentos “*in vitro*” utilizando culturas primárias de células corticais do cérebro de camundongos neonatos. Detectou-se a presença da proteína NS3 (verde) em células corticais. Particularmente, microglia marcada com F4/80 (vermelho), típico marcador de células microgliais ativadas, também marcou para NS3 (Fig. 8B e 8C).



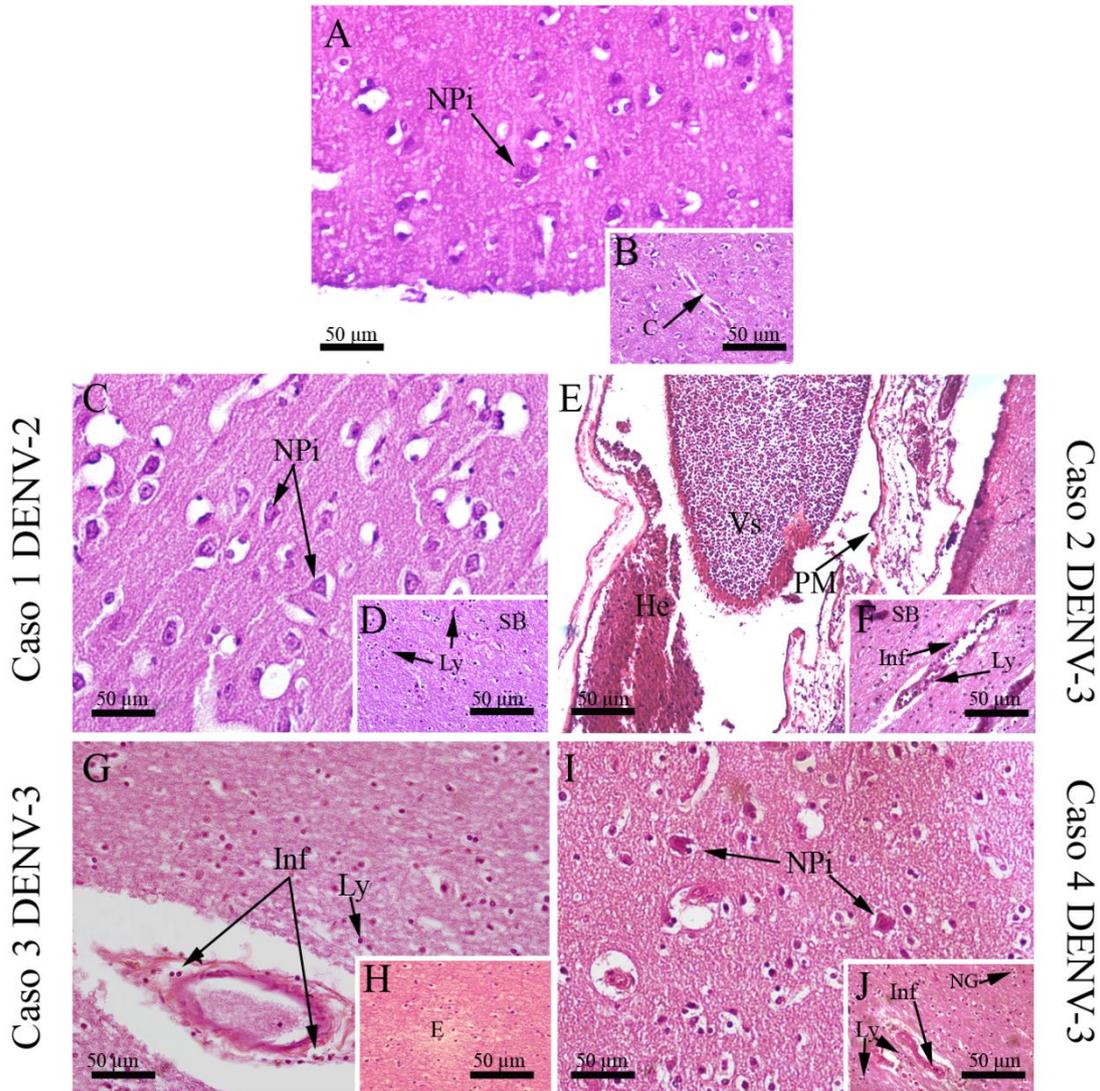
**Figura 5.8:** Detecção da proteína NS3 em cultura de células corticais murinas. Cultura mista não infectada (A) Detecção da proteína NS3 (verde) em cultura primária mista infectada com DENV-2 e marcação para F4/80 (vermelho) em células microgliais (B/C).

## 5.9 Avaliação histopatológica do tecido cerebral de casos fatais de dengue.

No tecido cerebral humano, primeiramente foi feita a avaliação histopatológica pela coloração de H.E. No tecido cerebral do paciente controle, os neurônios piramidais (Fig. 9A) e os capilares (Fig. 9B) exibiram aspecto regular. No caso 1 de DENV-2 e no caso 4 de DENV-3, estes neurônios estavam degenerados (Fig. 9C/Fig. 9I) e na substância branca houve presença de infiltrado linfocitário (Fig. 9D/Fig. 9J). No caso 2 de DENV-3, a pia máter e os grandes vasos apresentaram espessamento, com aumento do número de células inflamatórias e áreas de hemorragia associadas a essas regiões (Fig. 9E), enquanto que na substância branca os capilares apresentaram infiltrado linfocitário (Fig. 9F), assim como no caso 4 de DENV-3 (Fig. 9I). No caso 3 de

DENV-3, também havia infiltrado linfocitário no parênquima e ao redor de vasos (Fig. 9G) e regiões de edema (Fig. 9H).

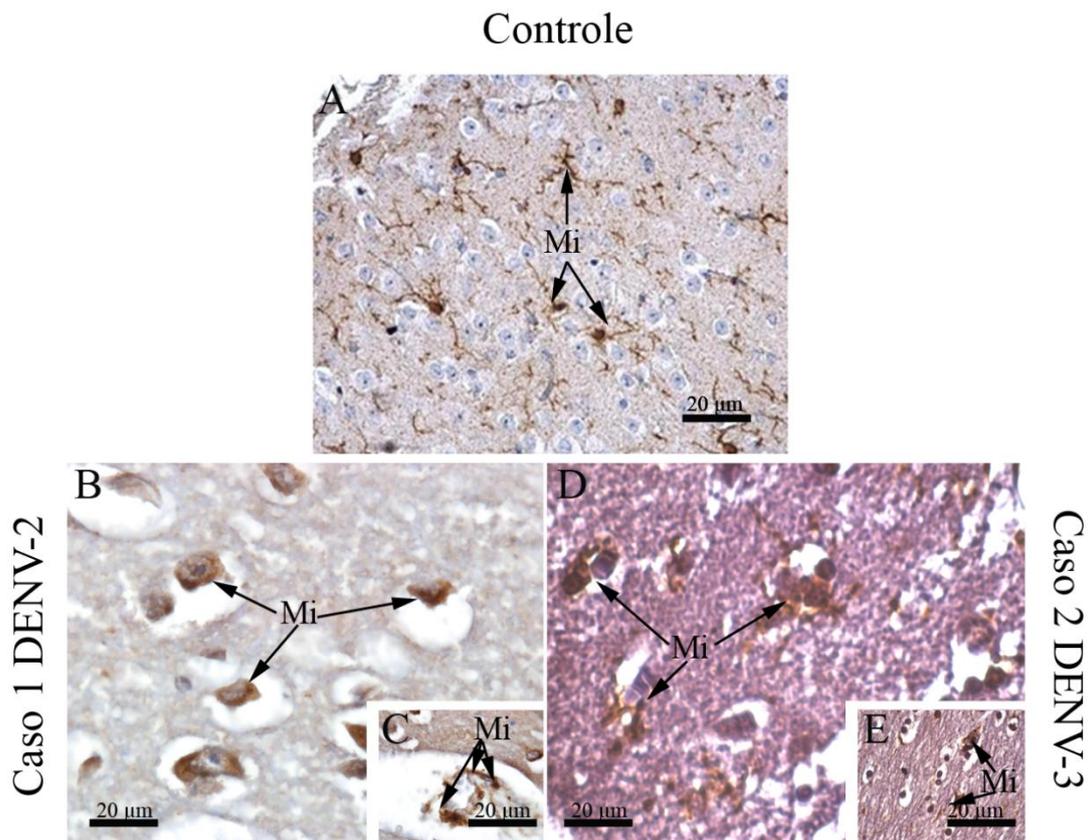
### Controle



**Figura 5.9: Avaliação histopatológica do tecido cerebral dos casos fatais de dengue.** Córtex cerebral exibindo neurônios piramidais regulares (A) e substância branca com capilares com aspecto regular em paciente não infectado pelo vírus da dengue (B). Neurônios piramidais degenerados na região cortical (C) e infiltrados de células linfocitárias na substância branca no caso 1 DENV-2 (D). Região da pia máter com infiltrado inflamatório e grande vaso com espessamento de parede de vaso e ao redor de área de hemorragia (E), e infiltrado linfocitário em capilar na substância branca do caso 2 de DENV-3 (F). Infiltrado linfocitário em capilar do córtex cerebral (G) e edema na região da substância branca no caso 3 DENV-3 (H). Neurônios piramidais degenerados no córtex (I) e infiltrado linfocitário ao redor de capilares e no parênquima da substância branca (J). PM – Pia máter; Npi – Neurônios piramidais; SB - Substância branca; Vs – Vaso; C – Capilar; He – hemorragia; E – Edema; Inf – Infiltrado inflamatório; NG – Neuroglia; Ly – Linfócitos.

### 5.10 Detecção de células da microglia no tecido cerebral de casos fatais de dengue.

A técnica de imunohistoquímica também foi ferramenta para análise das células da microglia no tecido nervoso dos casos fatais, com o anticorpo anti-IBA-1. Estas células foram detectadas no tecido cerebral de paciente não infectado com o vírus da dengue, exibindo prolongamentos finos (Fig. 10A). No caso 1 de DENV-2, elas foram detectadas na região cortical na periferia do corpo celular de neurônios (Fig. 10B) e em regiões perivasculares na substância branca (Fig. 10C). No caso 2 de DENV-3, elas foram detectadas no córtex (Fig. 10D) e na substância branca (Fig. 10E), exibindo em ambos os casos um formato com seus prolongamentos retraídos, sugerindo processo de ativação.

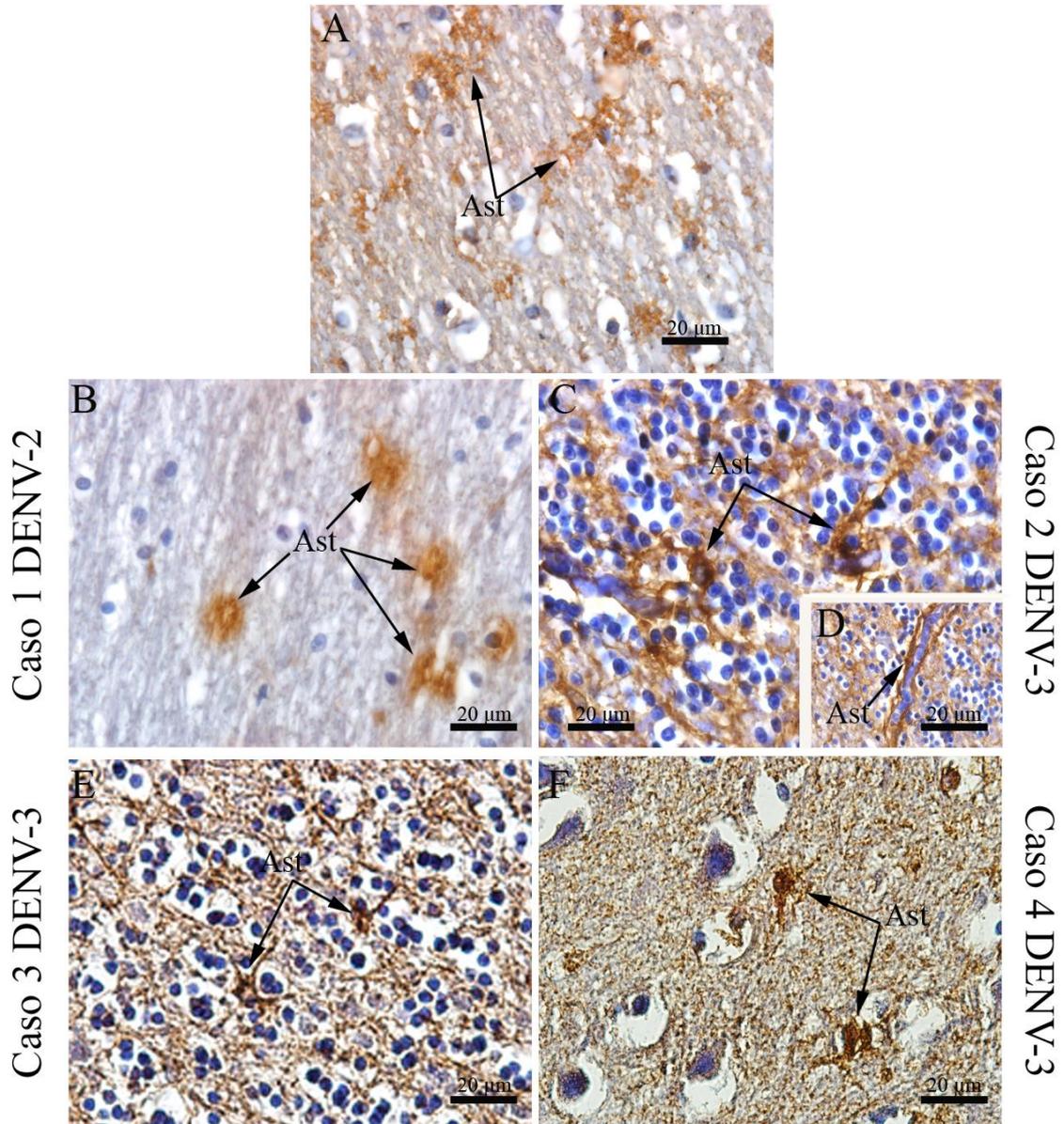


**Figura 5.10:** Detecção de células da microglia no tecido cerebral humano proveniente de casos fatais de dengue. Tecido cerebral de paciente não infectado por dengue (A). Detecção de microglia na região cortical do cérebro do caso fatal de DENV-2 (B) e ao redor de capilares na substância branca (C). Detecção de células da microglia na região cortical do cérebro do caso 2 de DENV-3 (D) e na região da substância branca (E). Mi – Microglia.

### **5.11 Detecção de astrócitos no cérebro/cerebelo de casos fatais de dengue.**

Para dar continuidade à caracterização das células neurais em estudo, foi realizada a detecção de astrócitos com auxílio do anticorpo anti-GFAP. Na região da substância branca do tecido cerebral de paciente não infectado pelo vírus da dengue, os astrócitos apresentaram ramificações finas (Fig. 11A), enquanto que no caso fatal 1 de DENV-2, estas células exibiram núcleo denso, sem ramificações visíveis (Fig. 11B). No caso 2 de DENV-3, os astrócitos foram detectados na camada granulosa do cérebro (Fig. 11C) e ao redor de vaso sanguíneo (Fig. 11D), apresentavam também prolongamentos grosseiros com núcleo denso em relação ao controle. No caso 3 de DENV-3 (Fig. 11E), os astrócitos foram detectados no cerebelo exibindo prolongamentos semelhantes ao observado no controle, assim como no caso 4 de DENV-3 porém este com núcleo mais denso (Fig. 11F).

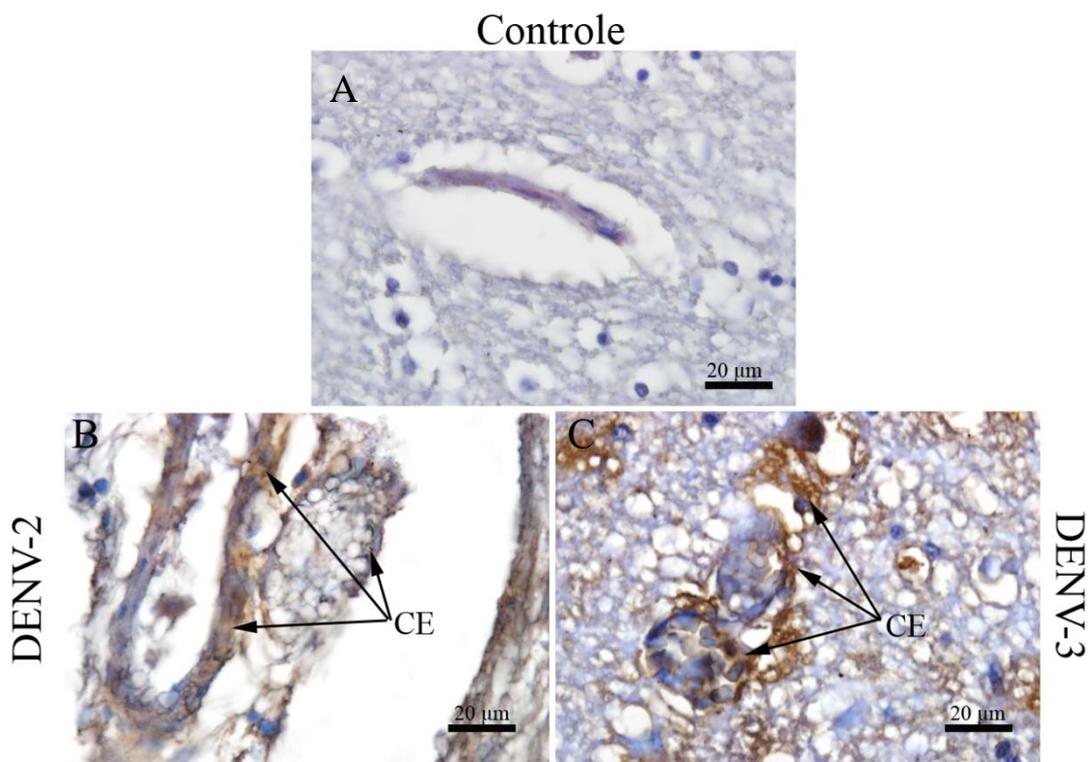
## Controle



**Figura 5.11:** Detecção de astrócitos no cérebro/cerebelo proveniente de casos fatais de dengue. Tecido cerebral humano não infectado com detecção de astrócitos exibindo prolongamentos finos (A). Detecção de astrócitos na substância branca no caso 1 de DENV-2 (B), ao redor de neurônios e em capilares na região da granulosa (C) e do caso 2 de DENV-3 (D); no tecido cerebelar do caso 3 de DENV-3 (E) e no córtex cerebral no caso 4 de DENV-3 (F). Ast – Astrócitos.

### 5.12 Caracterização de região de barreira hematoencefálica no tecido cerebral de casos fatais.

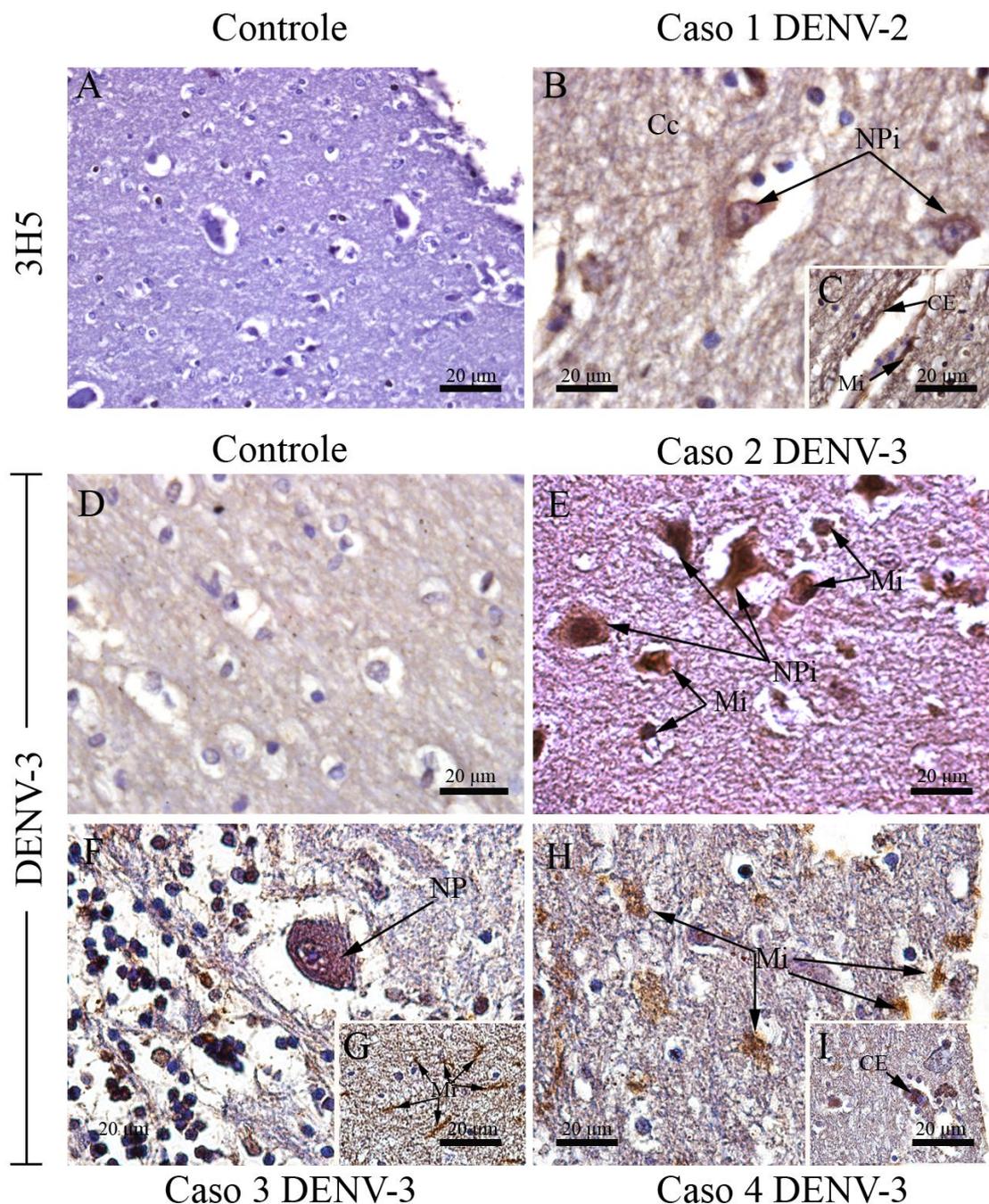
Foi realizada a caracterização da região de barreira hematoencefálica no caso de DENV-2 (Fig. 12B) e DENV-3 (Fig. 12C), onde foi detectada a marcação em células endoteliais de vasos com intensa disfunção. Este processo ocorre com ativação do endotélio e produção de citocinas. No controle, não foi observada ativação do endotélio nesta região (Fig. 12A)



**Figura 5.12:** Caracterização da barreira hematoencefálica nos casos fatais de dengue. Região de barreira hematoencefálica de tecido cerebral controle (A), do caso de DENV-2 (B) e DENV-3 (C) com detecção de células endoteliais. CE – Células endoteliais.

### **5.13 Detecção dos antígenos 3H5 (DENV-2) e DENV-3 no tecido nervoso de casos fatais de dengue.**

Através da técnica de imunohistoquímica foram detectados os antígenos 3H5 e DENV-3 no tecido nervoso dos casos fatais. Como resultados, foram identificados um caso de DENV-2 a partir da detecção do antígeno 3H5 em neurônios piramidais (Fig. 13B) e em células endoteliais e microglia (Fig. 13c); e os três casos de DENV-3 que teve o seu antígeno detectado em neurônios e microglia (Fig.13E), neurônios de Purkinje (Fig. 13F), microglia (Figs. 13G/13H) e em células endoteliais (Fig. 13I). O tecido nervoso de paciente não infectado com o vírus dengue não apresentou positividade para os antígenos 3H5 (Fig. 13A) e DENV-3 (Fig. 13D).

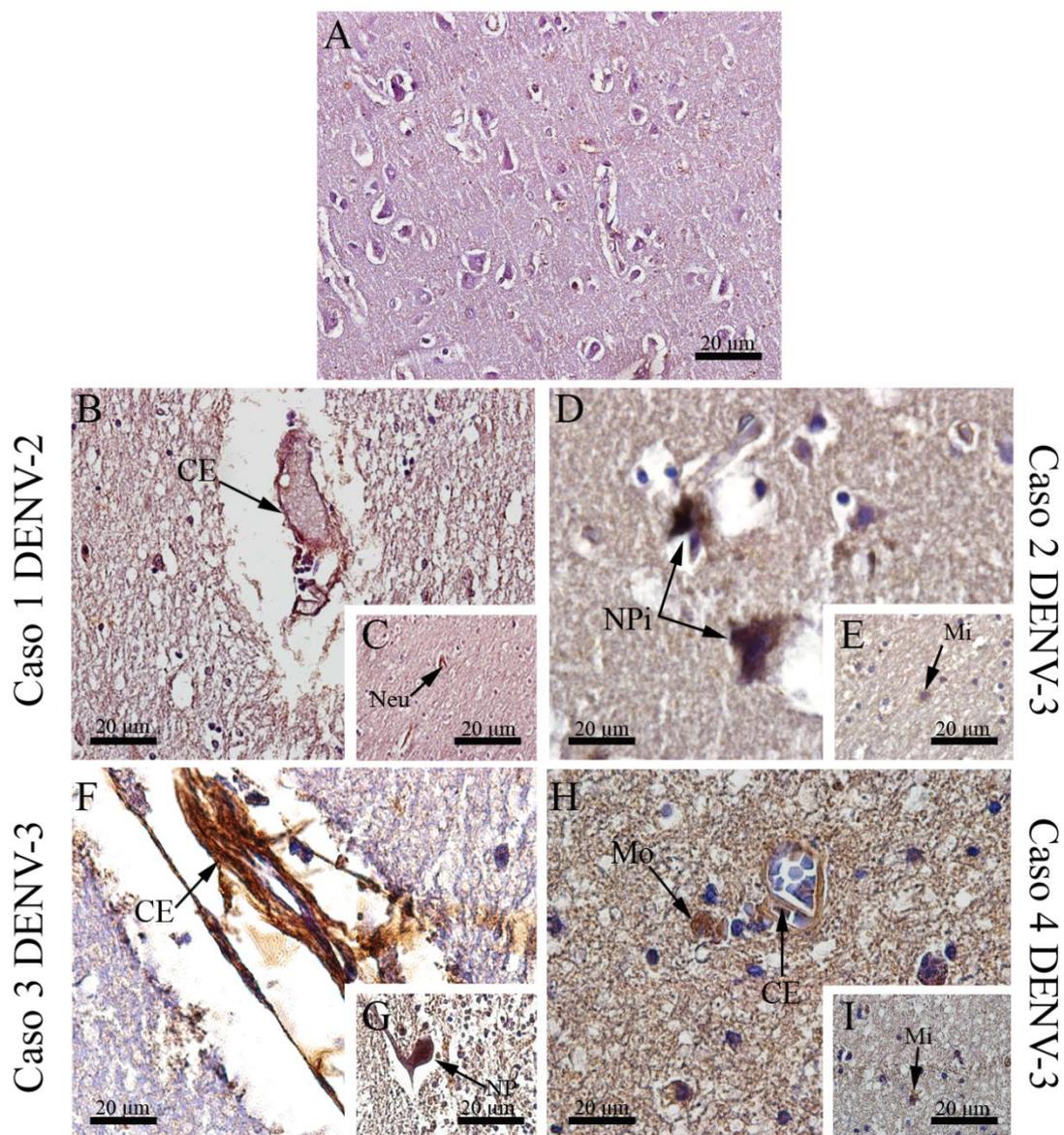


**Figura 5.13: Detecção dos antígenos 3H5 e DENV-3 nos casos fatais de dengue.** Córtex cerebral de paciente não-dengue (A/D). Detecção do antígeno 3H5 em neurônios piramidais no córtex cerebral (B) e em microglia e células endoteliais na substância branca de caso 1 de DENV-2 (C). Detecção do antígeno DENV-3 em neurônios piramidais e microglia no caso 2 de DENV-3 (E). Detecção do antígeno DENV-3 em neurônio de Purkinje (F) e células da microglia no cerebelo no caso 3 de DENV-3 (G). Detecção do antígeno DENV-3 em células da microglia no tecido cerebelar (H) e em célula endotelial nos vasos da substância branca do cerebelo no caso 4 de DENV-3 (I). Cc – Córtex cerebral; NPi – Neurônio piramidal; NP – Neurônio de Purkinje; CE – Células endoteliais; Mi – Microglia.

#### **5.14 Detecção da proteína NS3 em tecido nervoso de casos fatais.**

A fim de investigar a replicação do vírus no tecido nervoso proveniente de casos fatais ocorridos por dengue, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para detectar a proteína NS3. Esta proteína não foi detectada no córtex cerebral de paciente não infectado (Fig. 14A). No caso fatal de DENV-2, ela foi detectada em células endoteliais (Fig. 14B) e neurônio (Fig. 14C). No caso 2 de DENV-3 ela foi detectada em neurônios piramidais da região cortical do cérebro (Fig. 14D) e em células da microglia na região da substância branca (Fig. 14E), enquanto que no caso 3 de DENV-3, NS3 foi detectada em células endoteliais no córtex cerebral (Fig. 14F) e em neurônios de Purkinje no cerebelo (Fig. 14G). Por fim, no caso 4 de DENV-3, esta proteína foi detectada em macrófagos circulantes e células endoteliais (Fig. 14H) e em células da microglia na região de substância branca do cérebro (Fig. 14I).

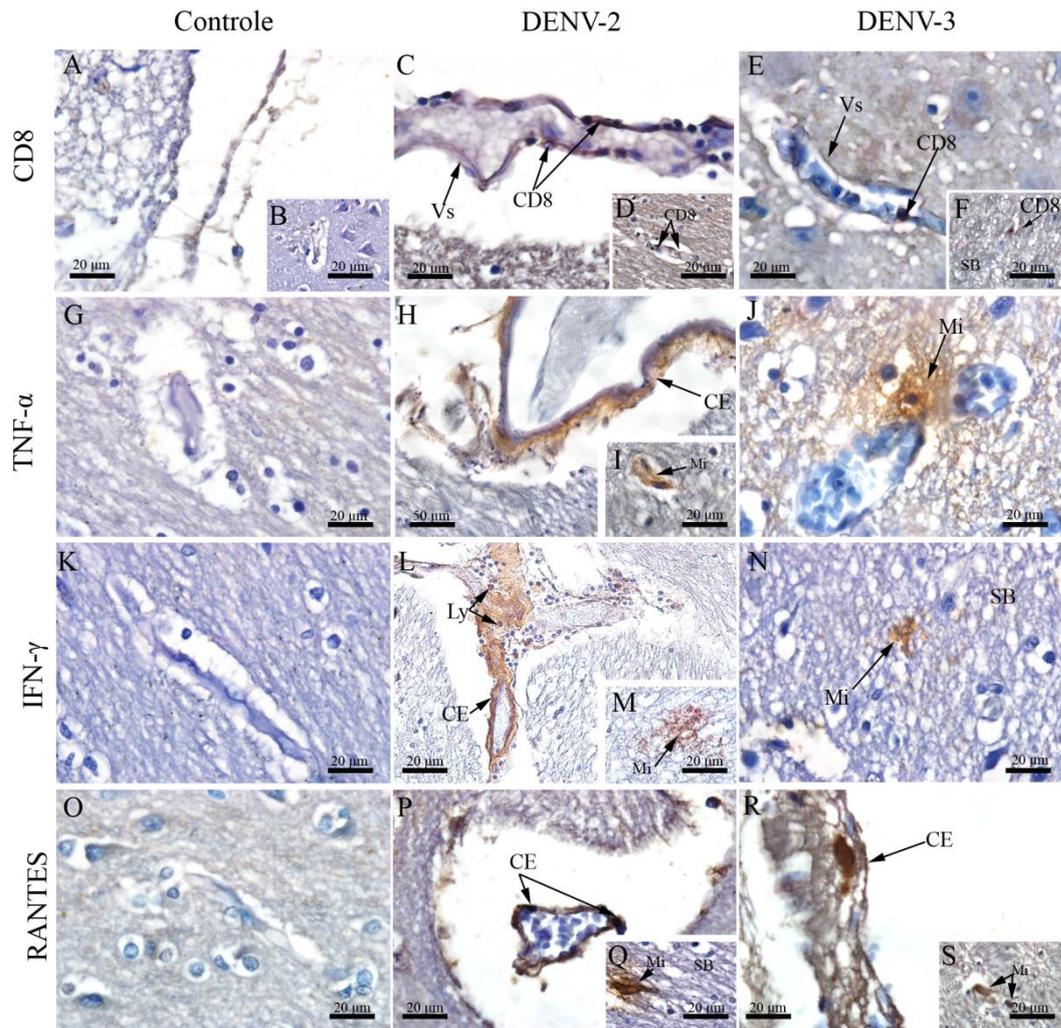
## Controle



**Figura 5.14: Detecção da proteína NS3 em tecido nervoso humano proveniente de casos fatais de dengue.** Córtex cerebral de controle negativo para dengue (A). Detecção da proteína NS3 em células endoteliais (B) e neurônio no caso fatal de DENV-2 (C). Detecção da proteína NS3 em neurônios piramidais (D) e microglia no caso fatal 2 de DENV-3 (E); em células endoteliais (F) e em neurônios de Purkinje no caso fatal 3 de DENV-3 (G) e em células endoteliais (H), macrófagos circulantes e microglia na substância branca no caso fatal 4 de DENV-3 (I). NPi – Neurônios piramidais; Neu – Neurônios; NP – Neurônios de Purkinje; Mi – Microglia; Mo – Macrófagos circulantes; CE – Célula endotelial.

### **5.15 Detecção de células CD8<sup>+</sup> e citocinas pró-inflamatórias no tecido cerebral dos casos fatais.**

Células positivas para CD8 foram detectadas em vasos e no parênquima do caso de DENV-2 (Figs. 15C/D) e de DENV-3 (Figs. 15E/F). Além disso, foi realizada a detecção das citocinas pró-inflamatórias no tecido cerebral dos casos fatais de DENV-2 e DENV-3. No caso de DENV-2, células endoteliais e microgliais foram positivas para TNF- $\alpha$  (Figs. 15H/I), IFN- $\gamma$  (Figs. 15 L/M) e RANTES (Figs. 15P/Q). Além disso, também foi detectado IFN- $\gamma$  nos infiltrados de linfócitos neste caso. Já no caso de DENV-3, o TNF- $\alpha$  (Fig. 15J) e IFN- $\gamma$  (Fig. 15N) foram detectadas principalmente em células da microglia, e a RANTES em células endoteliais (Fig. 15R) e microglia (Fig. 15S).



**Figura 5.15:** Detecção de células  $CD8^+$  e citocinas pró-inflamatórias em tecido cerebral de caso fatal de DENV-2 e DENV-3. Tecido cerebral de paciente não infectado pelo vírus da dengue (**A/G/K/I**). Detecção de  $TNF-\alpha$  em células endoteliais (**H**) e microglia no caso de DENV-2 (**I**) e DENV-3 (**J**). Detecção de  $IFN-\gamma$  em linfócitos e células endoteliais (**L**) e microglia no caso de DENV-2 (**M**) e DENV-3 (**N**). Detecção de RANTES em células endoteliais no caso de DENV-2 (**P**) e no caso de DENV-3 (**Q**); e microglia no caso de DENV-2 (**R**) e no caso de DENV-3 (**S**). SB – Substância branca; Mi – Microglia; CE – Célula endotelial; Ly – Linfócitos; Vs – Vaso;  $CD8$  – Células  $CD8^+$ .

## 6 DISCUSSÃO

O vírus da dengue foi, por muito tempo, considerado um vírus não neurotrópico, porém nas últimas epidemias da doença, tem sido cada vez mais frequente a ocorrência de relatos de envolvimento neurológico durante ou após a infecção por dengue. Dentre as manifestações neurológicas observadas, estão encefalite, encefalomielite, mielite transversa, paralisia flácida e síndrome de Guillian-Barré (Chen *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2007; Carod-Artal *et al.*, 2013). Em virtude da gravidade e da importância de entender a neuropatogênese da doença, alguns grupos de pesquisadores têm investido suas pesquisas em modelos experimentais envolvendo o vírus da dengue e o SNC, mesmo com a limitação em relação à falta de um modelo que reproduza fielmente os efeitos da doença como ela ocorre em humanos (Velandia-Romero *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2016).

Em estudos anteriores do grupo, alterações histopatológicas foram observadas no tecido hepático de camundongos imunocompetentes BALB/c inoculados com DENV-2 via i.p. (Paes *et al.*, 2005) e i.v. (Paes *et al.*, 2009). Por ser o fígado um órgão alvo e bastante afetado pela infecção, o tecido hepático de animais infectados pela via i.p. apresentou alterações mais focais como microesteatose ao redor da veia centrolobular e tumefação hepatocitária; enquanto que ao se utilizar a via i.v., as alterações foram mais difusas, como macroesteatose, além de apresentar áreas extensas de tumefação hepatocitária, hemorragia e edema, similar ao que vem sendo observado em casos fatais humanos (Bhamarapravati *et al.*, 1967; Burke T, 1968; Couvelard *et al.*, 1999; Huerre *et al.*, 2001; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Martina *et al.*, 2009; Póvoa *et al.*, 2014). Para determinar o pico de viremia, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, na qual foi observado um pico no 7<sup>o</sup> d.p.i. desses animais (Paes *et al.*, 2009). A partir destes resultados, no atual trabalho, buscamos investigar se o vírus DENV-2 era capaz de infectar o SNC, em um modelo imunocompetente, avaliando os principais danos no cérebro e cerebelo em camundongos BALB/c inoculados com DENV-2 pela via intravenosa, no 2<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> d.p.i. Além disso, também foi analisado o tecido nervoso de quatro casos fatais de dengue em humanos: um caso de DENV-2 e três de DENV-3. Os

tecidos foram submetidos a análises histopatológicas e ultraestruturais, detecção de antígenos virais, células da neuroglia e de citocinas.

Camundongos BALB/c são conhecidos como camundongos imunocompetentes, por possuírem o sistema imune completo, agindo de forma eficiente contra a infecção. Devido a essa resistência, muitas vezes é necessária a inoculação de altas doses do vírus, vírus modificado e/ou diferentes vias de inoculação (Guabiraba & Ryffel, 2014). Camundongos imunocompetentes inoculados pela via intracerebral, já foram reportados por desenvolverem sintomas como paralisia (Oliveira *et al.*, 2016); trombocitopenia, alta viremia e hemorragia sistêmica pela inoculação intradermal (Chen *et al.*, 2007); e disfunção hepática pela via i.v. (Chen *et al.*, 2004). Contudo, neste trabalho, mesmo que os camundongos infectados não tenham sido comprometidos o suficiente a ponto de apresentarem sintomas, a análise histopatológica do cérebro e cerebelo destes animais revelou alterações que não foram observadas nos camundongos controle, inoculados somente com o meio L-15. Assim como nos trabalhos anteriores (Paes *et al.*, 2005, 2009), foi visto que o tecido dos camundongos infectados no 2º d.p.i. apresentou infiltrados inflamatórios mais focais, enquanto que no 7º d.p.i., estes estavam dispostos de forma mais difusa. A região da pia máter dos camundongos infectados se mostrou mais espessada do que nos camundongos controle, devido ao aumento do número de células da região, remetendo a um processo de encefalite, já reportada em casos fatais humanos (Soares *et al.*, 2011), e em modelos murinos imunocompetentes (Falgout *et al.*, 1990; Amaral *et al.*, 2011; Amorim *et al.*, 2012). Além disso, distúrbios circulatórios como hemorragia e edema, comumente descritos em casos de dengue (Martina *et al.*, 2009; Burke, 1968; Carlos *et al.*, 2005), foram encontradas no cerebelo dos camundongos infectados.

A reação inflamatória observada no cérebro e cerebelo, tanto no início quanto no final da cinética, pode ser consequência da resposta de células residentes do tecido cerebral e cerebelar, como microglia ativada, e também da drenagem de antígenos para os linfonodos cervicais que sensibilizariam os linfócitos T (Laman & Weller, 2013; Aspelund *et al.*, 2015). A migração de leucócitos para o cérebro e cerebelo dos camundongos infectados também

pode ter sido facilitada devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais de capilares, estimuladas por citocinas anti-virais (Amaral *et al.*, 2011). Isto pode ser também devido à resposta pró-inflamatória de microglia, astrócito e de leucócitos que são recrutados para o tecido cerebral, assim como infecção de células endoteliais, que pode gerar disfunção do endotélio, componente da barreira hematoencefálica (Avirutnan *et al.*, 1998; Ashhurst *et al.*, 2013, Jensen *et al.*, 2013; Barkhordarian *et al.*, 2015). Esta disfunção das células endoteliais tem suas chances de ocorrência aumentadas em infecções secundárias, nas quais há alta produção de anticorpos e células T de memória da infecção anterior, e acabam por exacerbar a produção de citocinas, resultando em um fenômeno denominado de “tempestade de citocinas” (Rajendran *et al.*, 2013). Alguns grupos já reportaram disfunção das células endoteliais que compõem a barreira hematoencefálica, em animais infectados pelo vírus da dengue neuroadaptado (Velandia-Romero *et al.*, 2012), assim como pelo vírus do Oeste do Nilo (Wang *et al.*, 2003) e da encefalite japonesa (Mishra *et al.*, 2009) e ainda, em casos de dengue ocorrido em humanos (Cardoso *et al.*, 2010).

Além das alterações histopatológicas observadas, também foi possível observar um aumento da detecção das células da microglia em áreas perivasculares do córtex e na substância branca de camundongos infectados. A partir disto, foi feita a quantificação das células positivas para IBA-1 no cérebro destes camundongos, na qual foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre os camundongos *mock* e infectados no 7° d.p.i. Estas células possuem atividade macrofágica, que se ativam quando há distúrbios neurológicos e podem atuar como amplificadores para a neuroinflamação (Das Sarma, 2014). Na sua forma não ativada, elas costumam apresentar formato alongado com prolongamentos finos, como observado em camundongos não infectados; já na sua forma ativa, estes prolongamentos sofrem retração, tomando um aspecto mais arredondado (Tsai *et al.*, 2016), que é possível observar no tecido de camundongos infectados. A ativação destas células tem como principal função a proteção do SNC contra infecções. Porém, caso sua ativação ocorra de forma exacerbada, pode haver produção intensa de mediadores pró-inflamatórios como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e óxido nítrico, que

se tornam tóxicos para as células nervosas. Além disso, a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pela microglia pode aumentar a ativação de astrócitos próximos a elas, que por consequência, causam mais dano neuronal (Hirsch *et al.*, 2009; Saijo *et al.*, 2009; Kirkley *et al.*, 2017).

No atual trabalho foi visto que o DENV-2 foi capaz de infectar células neurais em cultura, e se replicar na microglia. A infecção “*in-vitro*” pelos quatro sorotipos da dengue individualmente, utilizando células da microglia de origem murina, já foi relatada, a fim de avaliar a resposta imune. Foi visto que a infecção com DENV-1 resultou em aumento da permeabilidade vascular e DENV-2 induziu apoptose mediante estresse oxidativo. A infecção por DENV-3 se estabeleceu devido ao comprometimento da resposta imune local e a infecção por DENV-4 levou ao maior comprometimento da barreira hematoencefálica. Observou-se que cada sorotipo se comportou de maneira diferente na cultura (Bhatt *et al.*, 2015), porém nenhum deles foi capaz de destruir a barreira, evidenciando que as células da microglia são células alvo da infecção pelo DENV e possuem um papel fundamental na proteção do SNC contra danos teciduais, como o estabelecimento de encefalites. Já em camundongos infectados com DENV-2 pelas vias intracerebral e intraperitoneal, que tiveram rompimento da BHE, houve o desenvolvimento da encefalite (Chaturvedi *et al.*, 1991).

Em macacos *Callithrix penicillata*, a infecção por dengue levou à severa neuroinflamação, com ocorrência do fenômeno denominado ADE, caracterizado pela superprodução de citocinas e ativação de microglia (Vasconcelos *et al.*, 2016). Isto pode ser correlacionado com os nossos resultados, já que observamos uma suposta ativação de microglia, tanto pelo aumento do número de células positivas quanto pela detecção de antígenos virais nestas células. Além disso, esta superprodução de citocinas também é capaz de ativar o endotélio da região da barreira, na qual também realizamos marcação, e por onde houve a provável passagem do vírus e de células que provocaram os infiltrados inflamatórios no parênquima cerebral. Estudos de modelos murinos (Barth *et al.* 2006; Barreto *et al.* 2007; Huang *et al.* 2000; Velandia-Romero *et al.*, 2012) e com biópsias humanas também sugerem ativação microglial (Ramos *et al.*, 1998).

O tecido cerebral dos camundongos infectados pelo vírus apresentou áreas de gliose reativa, caracterizada pelo aglomerado de astrócitos. O aumento do número destas células em tecidos que sofreram algum tipo de injúria ainda não está bem esclarecido, porém há evidências que de possam papel na resposta imune cerebral. Os astrócitos são as células mais abundantes no sistema nervoso central e são capazes de liberar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que têm influência sobre o tipo de resposta das células T efetoras, junto com as células da microglia. Além disso, possuem efeito modulador no funcionamento da barreira hematoencefálica e também podem atuar como apresentadores de antígenos, induzindo a proliferação de células T no cérebro (Jensen *et al.*, 2013). Em nosso estudo, no cérebro foi realizada uma quantificação de células positivas para GFAP, que caracteriza marcação de astrócitos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de camundongos *mock* e infectados no 7º d.p.i., e entre 2º e 7º d.p.i. Além disso, estas células também apresentaram morfologia alterada ao comparar os camundongos infectados e não infectados. Diferenças em número, tamanho e morfologia destas células já foram relatadas em camundongos infectados com DENV-4 neuroadaptado a camundongos pela via i.p. (Velandia-Romero *et al.*, 2012). Quando ocorrem injúrias no tecido nervoso, os astrócitos podem se tornar reativos, que é caracterizado pela hipertrofia dos seus processamentos e maior expressão de GFAP (Pekny & Nilsson, 2005; Sovrea & Bosca, 2013). O aumento da expressão de GFAP pode ocorrer por gliose reativa de dois tipos: leve e moderada, e quando há ou não proliferação de astrócitos. Porém somente com esses parâmetros, não se pode afirmar que houve aumento do número de astrócitos. Além disso, em tecido nervoso saudável, há astrócitos que não expressam a quantidade de GFAP suficiente para serem identificados por imunohistoquímica, causando uma falsa impressão de que no tecido dos camundongos não infectados tinha menos astrócitos do que nos infectados (Sofroniew, 2009). Ao analisar estes dados com as observações nas análises histopatológicas, temos mais um indicativo de que estas células estejam proliferando em resposta à lesão cerebral, tentando combater a infecção e proteger o tecido. Estudos mostram que a gliose pode atuar de forma pró ou anti-inflamatória, já que ela é capaz de formar uma barreira contra a dispersão de células inflamatórias do tecido lesionado para o saudável. Contudo,

disfunções neste processo podem contribuir para causar mais dano ao tecido (Sofroniew, 2005).

A fim de identificar se o vírus foi capaz de replicar e em quais células, foi feita a detecção da proteína NS3, uma proteína não estrutural do vírus da dengue que participa ativamente no processo de replicação viral. Esta proteína foi detectada no tecido nervoso murino infectando mais precisamente neurônios, microglia, células granulares do hipocampo, neurônios de Purkinje e células endoteliais. Neste mesmo modelo, a replicação do vírus já foi observada em hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais do fígado de camundongos infectados com DENV-2 pela via i.v., (Paes *et al.*, 2009), confirmando a replicação sistêmica do DENV e seu neurotropismo para o SNC. A replicação viral também já foi sugerida no retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi de macrófagos do pulmão de camundongos, devido à presença de partículas semelhantes ao vírus da dengue (Barreto *et al.*, 2007). Além do modelo “*in vivo*”, também foram feitos experimentos “*in vitro*”, com culturas primárias de células do córtex cerebral, infectadas com DENV-2. Como resultados, observamos que essas células foram permissivas à infecção e passíveis de replicação viral, a partir da detecção da proteína NS3. Em particular, encontramos marcação para NS3 na microglia ativada, detectada pelo anticorpo F4/80. Esses dados confirmam mais uma vez a disseminação do DENV nessas células e estão de acordo com as detecções de antígenos NS3 nos tecidos murino e humano.

Na análise ultraestrutural do tecido cerebral dos camundongos, neurônios, microglia e astrócitos exibiram alterações celulares indicativas de apoptose, principalmente no 7<sup>o</sup> d.p.i., como tumefação das mitocôndrias, membrana nuclear irregular, citoplasma expansivo e deposição de heterocromatina. Algumas dessas alterações celulares já foram encontradas no fígado de casos fatais de dengue (Póvoa *et al.*, 2014). A tumefação mitocondrial também já foi reportada em células HepG2 infectadas com DENV-2, apresentando disfunções fisiológicas e energéticas, sendo associadas à morte celular após infecção por DENV (El-Bacha *et al.*, 2007). Essa tumefação pode ocorrer devido à interação de proteínas virais com a mitocôndria, sendo capazes de modular a permeabilidade da membrana mitocondrial, acarretando a liberação

de componentes do espaço intermembranar para o citoplasma, além de regular o processo de apoptose (Everett *et al.*, 2001; Piccoli *et al.*, 2006).

No tecido cerebelar também houve regiões de desmielinização, confirmando achados da histopatologia. Estudos utilizando vírus neurotrópico da hepatite sugerem que a produção de IFN- $\gamma$  pode ativar microglia, promovendo a maturação e ativação de fagolisossomos, que fagocitam a bainha de mielina, causando esta desmielinização (Chatterjee *et al.*, 2013). Esse tipo de alteração é encontrada com frequência em casos de esclerose múltipla (Lassmann *et al.*, 2005) e em arboviroses como chikungunya e zika, que podem levar a doenças desmielinizantes, como a Síndrome de Guillain-Barré (Agarwal *et al.*, 2017).

No experimento murino “*in vivo*”, a fim de entender a resposta imune, realizamos a detecção de citocinas pró-inflamatórias no parênquima cerebral, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , no 2º d.p.i. Em camundongos BALB/c infectados com DENV-2 pela via intracerebral foram analisados os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias no plasma, entre elas, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Um dia após o desafio, foi detectado um pico destas citocinas nos camundongos infectados em comparação aos animais não infectados. Nos dias seguintes, o nível de IFN- $\gamma$  caiu abaixo do limite de detecção, enquanto que o nível de TNF- $\alpha$  teve aumento no 7º d.p.i (Oliveira *et al.*, 2016).

Na análise histopatológica do tecido cerebral dos casos fatais, assim como no modelo murino, foram encontrados infiltrados inflamatórios ao redor dos capilares cerebrais e cerebelares, hemorragia e edema, que são alterações frequentes observados em órgãos acometidos na dengue grave. Elas também já foram descritas em trabalhos anteriores, no fígado, pulmão, coração e rim de casos fatais ocorridos por infecção de DENV-3 (Póvoa *et al.*, 2014). Nos infiltrados inflamatórios observados foram detectados linfócitos T CD8<sup>+</sup>, que podem estar correlacionados com os danos observados no tecido nervoso.

Póvoa e colaboradores (2016), também analisaram resposta imune celular em tecidos periféricos, nos quais foi observada a expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Houve também um aumento do número de células endoteliais expressando RANTES, que parece contribuir para a alteração de permeabilidade vascular, e conseqüentemente, para a

ocorrência de infiltrados inflamatórios. Estes resultados suportam teorias que propõem que a resposta exacerbada de células T podem desenvolver casos mais graves da doença (Póvoa *et al.*, 2016). Em nosso estudo, apesar de ainda não termos realizado a quantificação das citocinas no tecido cerebral, também observamos células expressando TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e RANTES. É importante salientar que a produção destas citocinas pode estar relacionada com os danos teciduais encontrados e com a severidade da doença. Níveis destas citocinas também já foram detectados sendo expressas por células endoteliais infectadas “*in vitro*” (Avirutnan *et al.*, 1998).

Nos tecidos cerebrais humanos de casos fatais provenientes dos sorotipos 2 e 3, nós observamos neurônios piramidais degenerados, assim como nos tecidos murinos. Na literatura, já foi vista associação de dano neuronal com a produção de óxido nítrico (Campbell *et al.*, 1994). Este é conhecido por atuar como mecanismo de defesa contra infecções virais, promovendo processos de apoptose ou anti-apoptose, a fim de prevenir o dano tecidual (Akaike *et al.*, 1996; Sánchez-Burgos *et al.*, 2004). Neste trabalho, células como microglia e astrócitos também exibiram alterações nos casos fatais, em comparação com o controle.

Além disso, antígenos de DENV-2 foram detectados pelo anticorpo anti-3H5 em neurônios piramidais, microglia e células endoteliais, enquanto que antígenos de DENV-3 foram detectados também em microglia e células endoteliais, e em neurônios de Purkinje, dos casos humanos fatais. Antígenos de DENV-3 já foram detectados em células endoteliais do fígado e coração; e também em hepatócitos, células de Kupffer, pneumócitos do tipo II, fibras cardíacas, macrófagos alveolares, do baço e rins; e monócitos dos rins e coração (Póvoa *et al.*, 2014). Corroborando com nossos achados, Bhoopat e colaboradores também detectaram antígenos de dengue em neurônios do córtex cerebral, neurônios de Purkinje, microglia e astrócitos humanos (Bhoopat *et al.*, 1996).

Também analisamos a replicação do vírus também nos casos fatais humanos pela detecção da proteína NS3, que foi encontrada em neurônios piramidais e de Purkinje, microglia e macrófagos circulantes e em células endoteliais. Os resultados se assemelham bastante aos encontrados no modelo murino. Já foi reportada a replicação do vírus da dengue em humanos

no baço, linfonodos, células de Kupffer, hepatócitos e células endoteliais (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Miagostovich *et al.*, 1997; Ling *et al.*, 2007; Póvoa *et al.*, 2014). Além disso, Limonta e colaboradores (2012) previamente já haviam descrito a presença de partículas semelhantes ao vírus da dengue no retículo endoplasmático rugoso de oligodendrócitos, através da microscopia eletrônica de transmissão. A partir destes achados, observa-se o amplo tropismo e replicação do vírus da dengue em diferentes tecidos.

Os sorotipos 2 e 3 estão mais associados a ocorrências de manifestações neurológicas (Domingues *et al.*, 2008, Soares *et al.*, 2010), porém os sorotipos 1 e 4 também já foram identificados em casos de encefalite (Ramos *et al.*, 1998). Neste trabalho, foi observado envolvimento do SNC com alterações histopatológicas e detecção de vírus e citocinas em todos os casos fatais. Contudo, apesar de não haver relatos de envolvimento neurológico na descrição clínica do caso 1 (DENV-2) e caso 2 (DENV-3), foi possível identificar danos no tecido cerebral destes casos. Em trabalho do grupo, ainda não publicado, também foram observadas alterações histopatológicas no fígado e pulmão deste caso 1 (DENV-2), indicativas de choque por dengue, como relatado no prontuário. Dentre elas estão, infiltrado mononuclear associado à necrose hepatocitária, principalmente ao redor do espaço porta; perda da luz alveolar devido ao espessamento do septo (causado por pneumonia intersticial persistente) e formação de membrana hialina. A encefalite viral geralmente apresenta-se como encefalite aguda durante epidemias de dengue e pode ser vista em todos os três tipos clássicos de dengue. Além da ação direta do vírus, mecanismos indiretos, como disfunções renais e hepáticas, síndrome hipóxico-isquêmica e outros distúrbios metabólicos também podem afetar a função cerebral (Viswanathan *et al.*, 2016; Jayasinghe *et al.*, 2016). Já o paciente do caso 2 de DENV-3, apresentou obesidade mórbida, uma doença de base, que provavelmente contribuiu para evolução da dengue, com falência múltipla dos órgãos (Póvoa *et al.*, 2014). Os casos 3 e 4 (DENV-3) possuíam relatos de envolvimento do SNC, como encefalite de etiologia viral e edema cerebral discreto, respectivamente. Além destas observações, células da neuroglia também se mostraram alteradas. Células da microglia apresentaram retração dos seus prolongamentos, assim como no modelo murino, sugerindo ativação destas células. Ao analisar os astrócitos dos casos fatais, elas exibiram núcleo

denso, ocupando quase toda extensão da célula, e sem ramificações visíveis. Este tipo de alteração morfológica é bastante encontrado em processo de isquemia/hipóxia, quando a célula fica desprovida de oxigênio (Chen *et al.*, 2003, Sofroniew *et al.*, 2010).

Diante dos resultados, foi possível observar um repertório de lesão tecidual, detecção de antígenos virais e infiltrados inflamatórios com produção de citocinas, que confirmam o tropismo do DENV para o sistema nervoso central no modelo murino e em casos fatais humanos. Esses resultados auxiliam na compreensão das principais células envolvidas na neuropatogênese da dengue.

Como perspectivas futuras, pretende-se, realizar colocalização do DENV com as principais células e citocinas. Nesse trabalho, não foi possível realizar a detecção de células CD8<sup>+</sup> no tecido de camundongo em parafina. Logo, pretendemos realizar essas marcações em tecido congelado, a fim de confirmar a migração dessas células para o parênquima cerebral a partir de regiões de barreira hematoencefálica. Além disso, pretende-se aumentar o número de casos fatais, assim como o número de controles humanos. Também iremos investigar outras citocinas e mediadores inflamatórios que possam estar contribuindo para a neuropatogênese da doença.

## 7 CONCLUSÕES

- Os camundongos BALB/c foram susceptíveis à infecção por DENV-2, inoculado pela via intravenosa. Além disso, o vírus foi capaz de causar infecção sistêmica evoluindo para infecção também no SNC.

- Foi observado tropismo do vírus para o SNC, causando lesões no tecido cerebral/cerebelar, mas sem comprometer estes camundongos imunocompetentes com sinais clínicos aparentes.

- Além das alterações histopatológicas, houve alteração em número e morfologia de microglia e astrócitos tanto no cérebro de camundongos quanto no cérebro de humanos, sugerindo ativação destas células, como tentativa de combater a infecção viral.

- Foi confirmada a replicação do vírus em células endoteliais, microglia e neurônios, no modelo murino e nos casos fatais humanos, pela detecção da proteína NS3; indicando os alvos de infecção e replicação viral.

- A cultura mista de células do córtex cerebral foi capaz de ser infectada pelo DENV-2. Em particular, foi confirmado o tropismo e replicação viral principalmente em células da microglia, indicando replicação viral neste tipo celular; corroborando com os resultados observados no modelo murino e nos casos fatais humanos.

- Foi possível identificar um perfil pró-inflamatório da infecção pelo vírus da dengue no modelo murino e nos casos fatais, através da detecção das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e quimiocina RANTES. Além de caracterizar as principais células envolvidas na neuropatogênese da dengue, como microglia e células endoteliais.

- Muitos dos resultados observados no tecido murino foram também caracterizados no tecido dos casos fatais de dengue em humanos, o que auxilia a comunidade científica no melhor entendimento da neuropatogênese da doença.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, N.J. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2005; 25, 5–23.
2. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan;37(1):13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030. Epub 2009 Aug 5.
3. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 2008;89:474–84.
4. Agarwal A, Vibha D, Srivastava AK, Shukla G, Prasad K. Guillain-Barre syndrome complicating chikungunya virus infection. *J Neurovirol.* 2017 Jun;23(3):504-507. doi: 10.1007/s13365-017-0516-1. Epub 2017 Feb 13.
5. Akaike T, Noguchi Y, Ijiry S, Suga M, Zheng Y and Dietzschold B *et al.* Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: Involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2448-53.
6. Amaral DC, Rachid MA, Vilela MC, Campos RD, Ferreira GP, Rodrigues DH, *et al.* Intracerebral infection with dengue3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. *J Neuroinflammation.* 2011; 8:23.
7. Amorim JH, Diniz MO, Cariri FA, Rodrigues JF, Bizerra RS, Gonçalves AJ, de Barcelos Alves AM, de Souza Ferreira LC. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine.* 2012 Jan 20;30(5):837-45. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.034. Epub 2011 Dec 15.
8. Araújo F, Nogueira R, Araújo MS, Perdigão A, Cavalcanti L, Brilhante R, *et al.* Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2012 Apr; 18(4):677-9. doi: 10.3201/eid1804.111552
9. Ashhurst TM, Vreden Cv, Munoz-Erazo L, Niewold P, Watabe K, Terry RL, Deffrasnes C, Getts DR, Cole King NJ. Antiviral macrophage

- responses in flavivirus encephalitis. *Indian J Med Res.* 2013 Nov;138(5):632-47.
10. Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, Wiig H, Alitalo K. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med.* 2015 Jun 29;212(7):991-9. doi: 10.1084/jem.20142290. Epub 2015 Jun 15.
  11. Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM, Mancini EJ. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol.* 2009; 83(24):12895-906
  12. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 35:33–42.
  13. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol.* 1998 Dec 1;161(11):6338-46.
  14. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N *et al* Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLOS Pathog.* 2007; 3:e183.
  15. Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 2013 Aug 30;3. doi: 10.3402/iee.v3i0.19839
  16. Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, *et al.* Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3- specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80(3):416-24.
  17. Barreto D, Takiya C, Schatzmayr H, Ribeiro R, Farias J (2007) Barth O. Histological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with dengue virus serotipe 2. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 May;102(2):175-82.

18. Basílio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, et al. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro. *Braz J Infect Dis.* 2005 Aug;9(4):341-7. Epub 2005 Nov 1.
19. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Aug;53(3):287-99. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00420.x. Epub 2008 Jul 3.
20. Bazan JF, Fletterick RJ Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology.* 1989 Aug;171(2):637-9.
21. Bente, D. A. and R. Rico-Hesse. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models.* 2006; 3(1): 97-103.
22. Barkhordarian A, Thames AD, Du AM, Jan AL, Nahcivan M, Nguyen MT, Sama N, Chiappelli F. Viral immune surveillance: Toward a TH17/TH9 gate to the central nervous system. *Bioinformatics.* 2015 Jan 30;11(1):47-54. doi: 10.6026/97320630011047. eCollection 2015.
23. Barth O, Barreto D, Paes M, Takiya C, Pinhão A, Schatzmayr H. Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Dec;101(8):905-15.
24. Bhamarapavati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol.* 1967 Dec;61(4):500-10.
25. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):504-7. doi: 10.1038/nature12060.
26. Bhoopat L, Bhamarapavati N, Attasiri C, Yoksarn S, Chaiwun B, Khunamornpong S, et al. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1996;14(2):107-13.
27. Bordignon J, Probst CM, Mosimann AL, Pavoni DP, Stella V, Buck GA, Satproedprai N, Fawcett P, Zanata SM, de Noronha L, Krieger MA, Duarte Dos Santos CN. Expression profile of interferon stimulated

- genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. *Virology*. 2008 Aug 1;377(2):319-29. doi: 10.1016/j.virol.2008.04.033.
28. Brewoo JN, Kinney RM, Powell TD, Arguello JJ, Silengo SJ, Partidos CD, *et al*. Immunogenicity and efficacy of chimeric dengue vaccine (DENVax) formulations in interferon-deficient AG129 mice. *Vaccine*. 2012 Feb 14;30(8):1513-20.
  29. Burke T. Dengue haemorrhagic fever: a pathological study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1968;62(5):682-92.
  30. Campbell IL, Samimi A and Chiang CS. Expression of inducible nitric oxide synthase. Correlation with neuropathology and clinical features in mice with lymphocytic choriomeningitis. *J Immunol*. 1994 Oct 15;153(8):3622-9.
  31. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*. 2010 Sep 24;64(2):328-63. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.003. Epub 2010 May 26.
  32. Carlos CC, Oishi K, Cinco MT, Mapua CA, Inoue S, *et al*. Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73: 435–40.
  33. Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol*. 2013;12(9):906-19.
  34. Castejón OJ. Biopathology of astrocytes in human traumatic and complicated brain injuries. Review and hypothesis. *Folia Neuropathol*. 2015;53(3):173-92. doi: 10.5114/fn.2015.54419.
  35. Castellanos J, Bello J, Velandia-Romero M. Manifestaciones neurológicas durante la infección por el virus del dengue. *Infectio*. 2014;18(4):167–76. doi:10.1016/j.infect.2014.02.006.
  36. Chang, G.J. Molecular biology of dengue viruses. In: *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Cambridge: CAB International. 1997; pp 175-198.

37. Chatterjee D, Biswas K, Nag S, Ramachandra SG, Das Sarma J. Microglia Play a Major Role in Direct Viral-Induced Demyelination. *Clin Dev Immunol*. 2013;510396. doi: 10.1155/2013/510396. Epub 2013 Jun 20.
38. Chaturvedi UC, Dhawan R, Khanna M, Mathur A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. *J Gen Virol*. 1991;72(4):859-66. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-72-4-859>
39. Chavez-Salinas S, Ceballos-Olvera I, Reyes-Del Valle J, Medina F, Del Angel RM. Heat shock effect upon dengue virus replication into U937 cells. *Virus Res*. 2008;138:111–8.
40. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Feb;23(2):137-49.
41. Chen HC, Lai SY, Sung JM, Lee SH, Lin YC, Wang WK, *et al*. Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol*. 2004; 73(3):419-31.
42. Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol*. 2007; 81:5518–26.
43. Chen S, Wu Z, Wang M, Cheng A. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses*. 2017 Oct 7;9(10). pii: E291. doi: 10.3390/v9100291.
44. Chimelli L, Hahn MD, Netto MB, Ramos RG, Dias M, Gray F. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. *Clin Neuropathol*. 1990; 9(3):157-62.
45. Claro LB, Tomassini HC, Rosa ML. [Dengue prevention and control: a review of studies on knowledge, beliefs, and practices]. *Cad Saude Publica*. 2004 Nov-Dec;20(6):1447-57. Epub 2004 Dec 8.
46. Clyde K, Kile JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol*. 2006; 80 (23): 11418-11431.

47. Costa VV, Fagundes CT, Valadao DF *et al.* A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- $\gamma$  in host resistance to infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6:e1663.
48. Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Hénin D, Deubel V. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol.* 1999 Sep;30(9):1106-10.
49. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews.* 2015; 39 (2) 155-170.
50. Dalrymple N, Mackow ER. Productive Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Is Directed by Heparan Sulfate-Containing Proteoglycan Receptors. *J Virol.* 2011, 85(18), 9478–9485. doi: 10.1128/JVI.05008-11 PMID: 21734047
51. Dalrymple NA, Mackow ER. Roles for Endothelial Cells in Dengue Virus Infection. *Adv Virol.* 2012, 1–8. doi: 10.1155/2012/840654
52. Das Sarma, J. Microglia-mediated neuroinflammation is an amplifier of virus-induced neuropathology. *J Neurovirol.* 2014 Apr;20(2):122-36. doi: 10.1007/s13365-013-0188-4. Epub 2013 Aug 27.
53. Dejnirattisai W, Webb AI, Chan V, Jumnainsong A, Davidson A, Mongkolsapaya J, Screaton G. Lectin switching during dengue virus infection. *J Infect Dis.* 2011;203:1775–83.
54. De La Guardia C; Leonart R. Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. *Biomed Res Int.* 2014;2014:825039. doi: 10.1155/2014/825039. Epub 2014 Jul 24.
55. Deltagen – Histology Atlas. [acesso em 27 out 2017] Disponível em: <<http://www.deltagen.com/target/histologyatlas/HistologyAtlas.html>>
56. de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Póvoa TF, *et al.* Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS One.* 2012;7(7, article e38527) doi: 10.1371/journal.pone.0038527
57. Di Benedetto B, Rupprecht R. Targeting Glia Cells: Novel Perspectives for the Treatment of Neuropsychiatric Diseases. [Curr Neuropharmacol.](#)

- 2013 Mar; 11(2): 171–185. Published online 2013 Mar. doi: [10.2174/1570159X11311020004](https://doi.org/10.2174/1570159X11311020004)
58. Diego Gomez-Nicola, V. Hugh Perry. Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain: A Paradigm of Functional Plasticity. *Neuroscientist*. 2015 Apr; 21(2): 169–184. doi: 10.1177/1073858414530512
  59. Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci*. 2008;267(1-2):36-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2007.09.040>
  60. Edelman R, Hombach J. Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas: summary of a World Health Organization Technical Consultation. *Vaccine*. 2008; 26(33):4113-9.
  61. El-Bacha T, Midlej V, Pereira da Silva AP, Silva da Costa L, Benchimol M, Galina A, Da Poian AT. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Oct;1772(10):1158-66. Epub 2007 Sep 15.
  62. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blumel G. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate) *Res Exp Med (Berl)* 1984;184:159–169.
  63. Everett H, McFadden G. Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria. *Virology*. 2001 Sep 15;288(1):1-7.
  64. Fagundes CT, Costa VV, Cisalpino D *et al*. IFN- $\gamma$  production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1449.
  65. Falgout B, Miller RH, Lai CJ . Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J Virol*. 1993 Apr; 67(4):2034-42.
  66. Ferreira RA, de Oliveira SA, Gandini M, Ferreira Lda C, Correa G, Abiraude FM, Reid MM, Cruz OG, Kubelka CF. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction

- in Brazilian children with dengue fever. *Acta Trop.* 2015 Sep;149:138-47. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.04.023. Epub 2015 May 2.
67. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, and others. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci.* 2011 Feb 1;124(Pt 3):447-58. doi: 10.1242/jcs.074088.
  68. Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener.* 2009 Nov 16;4:47. doi: 10.1186/1750-1326-4-47.
  69. Garman RH. *Histology of the Central Nervous System. Toxicologic Pathology*, 39: 22-35, 2011 Copyright # 2011 by The Author(s) ISSN: 0192-6233 print / 1533-1601 online DOI: 10.1177/0192623310389621
  70. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores.* ed. Guanabara koogan 1999. pg 278- 280 (pgs 426).
  71. Gear ARL, Camerini D. Platelet Chemokines and Chemokine Receptors: Linking Hemostasis, Inflammation, and Host Defense. *Microcirculation.* 2003 Jun;10(3-4):335-50.
  72. Geiss BJ, Stahla H, Hannah AM, Gari AM, Keenan SM. Focus on flaviviruses: current and future drug targets. *Future Med Chem.* 2009 May; 1(2):327-44.
  73. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010 Nov 5;330(6005):841-5. doi: 10.1126/science.1194637. Epub 2010 Oct 21.
  74. Gogineni V, Schinazi RF, Hamann MT. Role of Marine Natural Products in the Genesis of Antiviral Agents. *Chem Rev.* 2015 Sep 23;115(18):9655-706. doi: 10.1021/cr4006318.
  75. Grange L, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A, Gresh L, Paul R, Harris E. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. *Front Immunol.* 2014;5:280. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00280>
  76. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19:429–36.

77. Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol.* 2014; 426(6):1148-60.
78. Guabiraba R, Ryffel B. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology.* 2014;141(2):143-56.
79. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol.* 1998; 11:480–496.
80. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.* 2002; 33: 330-42.
81. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec; 8(12 Suppl):S7-16. doi: 10.1038/nrmicro2460.
82. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015 Jan 31;385(9966):453-65. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9.
83. Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. *J. Infect. Dis.* 1973; 128 (1): 7-14.
84. Halstead SB. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis.* 1979; 140:527–33.
85. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003; 60:421-69.
86. Hapuarachchi HC, Chua RCR, Shi Y, Thein TL, Lee LK, Lee KS, *et al.* Clinical Outcome and Genetic Differences within a Monophyletic Dengue Virus Type 2 Population. *PLoS One.* 2015; 10(3). doi: 10.1371/journal.pone.0121696
87. Harris E, Videa E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez ML, *et al.* Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998

- epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;63:5–11. doi:10.7860/JCDR/2015/12406.5942.
88. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3(4):376-96.
89. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009;8:382–97.
90. Hober D, Poli L, Roblin B *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48: 324–331.
91. Huang KJ, Li SY, Chen SC, Liu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Lei HY. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol.* 2000;81( 9):2177-82.
92. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, Khen NT, Drouet MT, Huong VT, Ha DQ, Buisson Y, Deubel V. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch.* 2001 Feb;438(2):107-15.
93. Islam R, Salahuddin M, Ayubi MS, Hossain T, Majumder A, Taylor-Robinson AW, Mahmud-Al-Rafat A. Dengue epidemiology and pathogenesis: images of the future viewed through a mirror of the past. *Virol Sin.* 2015; 5: 326-43.
94. Janssen HL, Bienfait HP, Jansen CL, van Duinen SG, Vriesendorp R, Schimsheimer RJ, *et al.* Fatal cerebral oedema associated with primary dengue infection. *J Infect.* 1998 ;36 (3) : 344-6.
95. Jayasinghe NS, Thalagala E, Wattegama M, Thirumavalavan K. Dengue fever with diffuse cerebral hemorrhages, subdural hematoma and cranial diabetes insipidus. *BMC Res Notes* 2016;9:265
96. Jensen CJ, Massie A, De Keyser J. Immune players in the CNS: the astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Sep;8(4):824-39. doi: 10.1007/s11481-013-9480-6. Epub 2013 Jul 4.
97. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally Infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* 2004; 189(8):1411-8.

98. Kato F, Ishida Y, Oishi S, Fujii N, Watanabe S, Vasudevan SG, Tajima S, Takasaki T, Suzuki Y, Ichiyama K, Yamamoto N, Yoshii K, Takashima I, Kobayashi T, Miura T, Igarashi T, Hishiki T. Novel antiviral activity of bromocriptine against dengue virus replication. *Antiviral Res.* 2016 Jul;131:141-7. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.04.014.
99. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron.* 2013; 77(1):10–8.
100. Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol.* 2001 May; 75(10):4633-40.
101. Kirkley KS, Popichak KA, Afzali MF, Legare ME, Tjalkens RB. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *J Neuroinflammation.* 2017 May 5;14(1):99. doi: 10.1186/s12974-017-0871-0.
102. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife.* 2015;4 doi: 10.7554/eLife.08347.
103. Kuan-Meng Soo, Bahariah Khalid, Siew-Mooi Ching, Chau Ling Tham, Rusliza Basir, Hui-Yee Chee. Meta-analysis of biomarkers for severe dengue infections. *PeerJ.* 2017; 5: e3589. Published online. 2017 Sep 15; doi: 10.7717/peerj.3589
104. Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, Beatty PR, Harris E. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology.* 2008 Oct 25;380(2):296-303.
105. Laman JD, Weller RO. Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Sep;8(4):840-56. doi: 10.1007/s11481-013-9470-8. Epub 2013 May 22.
106. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts. *Brain Pathol.* 2005 Jul;15(3):217-22.

107. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC *et al.* MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol.* 2006; 87(12):3623-30. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.82093-0>
108. Liao B, Tang Y, Hu F, Zhou W, Yao X, Hong W, Wang J, Zhang X. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecules may correlate with the severity of denguevirus-1 infection in adults. *Emerg Microbes Infect.* 2015 Apr;4(4):e24. doi: 10.1038/emi.2015.24. Epub 2015 Apr 22.
109. Lima, F. R.; Gervais, A.; Colin, C.; Izembart, M.; Neto, V. M.; Mallat, M., Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. *J. Neurosci.*, 2001, 21 (6), 2028-2038.
110. Lindenbach BD & Rice CM. *Flavirididae: The viruses and their replication.* Fields Virology. Fields B. N. Knipe D. M. Howley P. M. (Eds.) 4th ed. 2001; 2 991-1024.
111. Ling LM, Wilder-Smith A, Leo YS. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 2007; 38(3):265-8.
112. Liou ML, Hsu CY. Japanese encephalitis virus is transported across the cerebral blood vessels by endocytosis in mouse brain. *Cell Tissue Res.* 1998; 293(3):389-94. <http://dx.doi.org/10.1007/s004410051130>
113. Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh AA. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J. Virol.* 2004; 78:12225–12235
114. Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View, *Clinical Microbiology.* 2009; 22 (4): 564-581.
115. Martínez J, Hernández JC, Urcuqui-Inchima S. [Role of dendritic cells in infection by dengue virus: targets for replication and immune response]. *Rev Chilena Infectol.* 2017 Jun;34(3):249-256. doi: 10.4067/S0716-10182017000300007.

116. McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem.* 2011; 286(25):22147-59.
117. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe.* 2012; 12:544–57
118. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, *et al.* Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 2014 Mar;22(3):138-46. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.011. Epub 2014 Jan 24.
119. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, *et al.* Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.* 1997; 16(4):204-8.
120. Mishra MK, Dutta K, Saheb SK, Basu A. Understanding the molecular mechanism of blood-brain barrier damage in an experimental model of Japanese encephalitis: correlation with minocycline administration as a therapeutic agent. *Neurochem Int.* 2009 Dec;55(8):717-23. doi: 10.1016/j.neuint.2009.07.006. Epub 2009 Jul 21.
121. Microscopia Online – USP [acesso em 27 out 2017] Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/mol/9-24-org-cerebelo3.html>>
122. Mikula, S., Trotts, I., Stone, J., and Jones, E.G. Internet-Enabled High-Resolution Brain Mapping and Virtual Microscopy. *NeuroImage.* 35(1):9-15. [acesso em 20 jun 2015] Disponível em: <<http://brainmaps.org/ajax-viewer.php?datid=107&sname=n11a> . 2007.>
123. Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* 2008;4:e17.
124. Murrel S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol. Adv.* 2011; 29: 239-47.
125. Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, *et al.* Evaluation of the traditional and revised WHO

- classifications of Dengue disease severity. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(11):e1397.
126. Natarajan S. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. Genet Mol Biol. 2010 Apr;33(2):214-9. doi: 10.1590/S1415-47572010000200002.
  127. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. EMBO Rep. 2003; 4:723–8.
  128. Neal JW. Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? J Infect. 2014; 69(3):203-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.05.010>
  129. Nogueira RM<sup>1</sup>, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990 Apr-Jun; 85(2):253
  130. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. Epidemiol Infect 1993; 111 (1), 163-70.
  131. Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106(3):255-6.
  132. Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, *et al.* Dengue virus type 3, Brazil, 2002. Emerg Infect Dis. 2005; 11(9):1376-81.
  133. Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. Rev Panam Salud Publica. 2007 Nov; 22(5):358-63.
  134. Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001 Oct; 96(7):925-6.

135. Oliveira ER, Amorim JF, Paes MV, Azevedo AS, Gonçalves AJ, Costa SM, Mantuano-Barradas M, Póvoa TF, de Meis J, Basílio-de-Oliveira CA, Nogueira AC, Alves AM. Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. *Virology*. 2016 Feb;489:95-107. doi: 10.1016/j.virol.2015.12.006. Epub 2015 Dec 31.
136. Olsen AL, Morrey JD, Smee DF, Sidwell RW. Correlation between breakdown of the blood-brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice. *Antiviral Res*. 2007; 75, 104-112. doi: 10.1016/j.antiviral.2006.11.013 PMID: 17223204
137. Okamoto T, Suzuki T, Kusakabe S, Tokunaga M, Hirano J, Miyata Y, Matsuura Y. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses*. 2017 Aug 28; 9(9). pii: E243. doi: 10.3390/v9090243.
138. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villinger F, Ansari AA *et al*. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*. 2010; 115(9):1823-34.
139. Osanai CH, Travassos Da Rosa AP, Tang AT, Do Amaral RS, Passos AD. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev. Inst. Med. Trop*. 1983; 25 (1): 53-54.
140. Osnaya-Romero N, Perez-Guille MG, Andrade-García S, Gonzalez-Vargas E, Borgaro-Payro R, Villagomez-Martinez S, de Jesús Ortega-Maldonado J, Arredondo-García JL. Neurological complications and death in children with dengue virus infection: report of two cases. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017 Apr 27; 23:25. doi: 10.1186/s40409-017-0115-x
141. Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhão AT, Mota EM, *et al*. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest*. 2009; 89(10):1140-51.
142. Paes MV, Pinhão AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC *et al*. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*. 2005; 338(2):236-46.
143. Pagliari C, Quaresma JA, Fernandes ER, Stegun FW, Brasil RA, de Andrade HF Jr, *et al*. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic

- fever: contribution to the study of human liver lesions. *J Med Virol.* 2014; 86(7):1193-7.
144. Pang T, Cardoso MJ, Guzmán MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 2007; 85 (1): 43-5.
  145. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, and others. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333(6048):1456–8.
  146. Patkar CG, Kuhn RJ. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J Virol.* 2008 Apr; 82(7):3342-52.
  147. Pekny M, Nilsson M: Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005, 50:427–434.
  148. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Aug; 11(4):369-77. doi: 10.1016/j.mib.2008.06.004.
  149. Piccoli C, Scrima R, D'Aprile A, Ripoli M, Lecce L, Boffoli D, Capitanio N. Mitochondrial dysfunction in hepatitis C virus infection. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1429-37. Epub 2006 May 19.
  150. Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, Gregorio GG, Hendrickson WA, Kuhn RJ, Rossmann MG. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell.* 2006; 124:485–93.
  151. Potisopon S, Priet S, Collet A, Decroly E, Canard B, Selisko B. The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(18): 11642–11656.
  152. Póvoa TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal

- cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*. 2014; 9(4):e83386.
153. Puccioni-Sohler M, Orsini M, Soares CN. Dengue: a new challenge for neurology. *Neurol Int*. 2012; 4(3):e15. <http://dx.doi.org/10.4081/ni.2012.e15>
  154. Puccioni-sohler M, Rosadas C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 2015; 73(8): 698-703.
  155. Puccioni-Sohler M, Rosadas C, Cabral-Castro MJ. Neurological complications in dengue infection: a review for clinical practice. *Arq Neuropsiquiatr*. 2013 Sep; 71(9B):667-71. doi: 10.1590/0004-282X20130147.
  156. Quintela T, Marcelino H, Deery MJ, Feret R, Howard J, Lilley KS, Albuquerque T, Gonçalves I, Duarte AC, Santos C. Sex related differences in rat choroid plexus and cerebrospinal fluid: a cDNA microarray and proteomic analysis. *Neuroendocrinol*. 2015 Nov 26; doi: 10.1111/jne.12340.
  157. Radke EG, Gregory CJ, Kintziger KW, *et al*. Dengue outbreak in Key West, Florida, USA, 2009. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 135–37.
  158. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013 Nov 9;9(10):1057-69. doi: 10.7150/ijbs.7502. eCollection 2013.
  159. Ramos C, Sánchez G, Pando RH, Baquera J, Hernández D *et al*. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol* 1998; 4: 465-468.
  160. Rathakrishnan *et al*. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LCS, Manikam R, Sekaran SD. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLOS ONE*. 2012; 7(12):e52215 doi: 10.1371/journal.pone.0052215
  161. Raut, C.G.; Deolankar, R.P.; Kolhapure, R.M.; Goverdhan, M.K. Susceptibility of laboratory-bred rodents to the experimental infection with dengue virus type 2. *Acta Virol*. 1996, 40, 143–146.

162. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, Volume 27, Issue 3, 1 May. 1938, Pages 493–497, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
163. Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 2005; 79:4557–67.  
Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17, 208–212.
164. Rodenhuis-Zybert, I.; Wilschut, J.; Smit, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol. Life Science*. 2010; 67(16):2773-2786.
165. Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61(5):720-4.
166. Ross TM. Dengue virus. *Clin Lab Med*. 2010; 30(1):149-60.
167. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*, 2004; 113(7): 946-951.
168. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 2011; 11 (8): 532-43.
169. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. A Nurr1/ CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* [Internet] Elsevier Ltd. 2009; 137:47–59.
170. Salazar MI, Pérez-García M, Terreros-Tinoco M, Castro-Mussot ME, Pérez-Ramírez DJ, Ramírez-Reyes AG, et al. Dengue virus type 2: protein binding and active replication in human central nervous system cells. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:904067.
171. Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, et al. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(3):238-42.
172. Sánchez-Burgos G, Hernández-Pando R, Campbell IL, Ramos-Castañeda J, Ramos C. Cytokine production in brain of mice

- experimentally infected with dengue virus. *Neuroreport*. 2004 Jan 19;15(1):37-42.
173. San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenoghe A, Dayan GH, *et al*. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82(1):128-35.
174. Scaturro P, Cortese M, Chatel-Chaix L, Fischl W, Bartenschlager R. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathog*. 2015 Nov 12;11(11):e1005277. doi: 10.1371/journal.ppat.1005277. eCollection 2015.
175. Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis* 2014; 14: 1271–80.
176. Schatzmayr & Cabral. A virologia no Estado do Rio de Janeiro: uma visão global. In *Epidemias modernas: dengue e Aids*. 2009; p37, pp111.
177. Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81: 245-246.
178. Sreaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology*. 2015 Nov 25; 15(12):745-59. doi: 10.1038/nri3916.
179. Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 100(7): 608-614.
180. Sharp TM, Tomashek KM, Read JS, Margolis HS, Waterman SH. A New Look at an Old Disease: Recent Insights into the Global Epidemiology of Dengue. *Curr Epidemiol Rep*. 2017; 4(1):11-21. doi: 10.1007/s40471-017-0095-y. Epub 2017 Jan 14.

181. Shrestha S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol.* 2004; 78(6):2701-10.
182. Silveira GF, Strottmann DM, de Borba L, Mansur DS, Zanchin NI, Bordignon J, Duarte Dos Santos CN. Single point mutations in the helicase domain of the NS3 protein enhance dengue virus replicative capacity in human monocyte-derived dendritic cells and circumvent the type I interferon response. *Clin Exp Immunol.* 2016 Jan; 183(1):114-28. doi: 10.1111/cei.12701.
183. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med.*, 2012; 366(15):1423-32.
184. Singla M, Kar M, Sethi T, Kabra SK, Lodha R, Chandele A, Medigeshi GR. Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India--Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Mar 16;10(3):e0004497. doi: 10.1371/journal.pntd.0004497. eCollection 2016 Mar.
185. Smith DR, Holbrook MR, Gowen BB. Animal models of viral hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2014 Dec; 112:59-79. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.10.001. Epub 2014 Oct 18.
186. Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, Freitas MRG, Puccioni-Sohler M. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: report of a case. *Int J Infect Dis.* 2010 Feb; 14(2):e150-2. doi: 10.1016/j.ijid.2009.03.016. Epub 2009 Jun 5.
187. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 2005; 5:400–407
188. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32:638–647
189. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. Epub 2009 Dec 10.

190. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci*. 2015 May; 16(5): 249–263. doi: 10.1038/nrn3898
191. Sovrea AS, Bosca AB. Astrocytes reassessment - an evolving concept part one: embryology, biology, morphology and reactivity. *J Mol Psychiatry*. 2013 Oct 24;1:18. doi: 10.1186/2049-9256-1-18
192. Splinder KR & Hsu TH. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends Microbiol*. 2012 Jun; 20(6): 282–290. Published online 2012 May 6. doi: 10.1016/j.tim.2012.03.009
193. Srikiatkachorn A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever, *Thromb Haemost* 2009; 102: 1042–1049.
194. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006; 87(10):2755-66.
195. Streit, W.J., Graeber, M.B., Kreutzberg, G. Expression of the antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motoneuron injury. *Exp. Neurol*. 1989; 105, 115–126.
196. SVS - Serviço de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2017a. [acesso em 27 out 2017]. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/planonacionaisaude20122015>>.
197. SVS - Serviço de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2017b. [acesso em 27 out 2017]. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/obitos-ate-2016.pdf>>.
198. SVS - Serviço de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2011. [acesso em 07 jul 2015] Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/planonacionaisaude20122015>>.
199. Teixeira MG, Costa MC, Coelho G, Barreto ML. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Oct;14(10):1663. doi: 10.3201/eid1410.071164.

200. Tom Linson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 Jun; 9(3):327-43.
201. Tsacopoulos M, Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*. 1996; 16 (3), 877-85.
202. Tsai TT, Chen CL, Lin YS, Chang CP, Tsai CC, Cheng YL, Huang CC, Ho CJ, Lee YC, Lin LT, Jhan MK, Lin CF. Microglia retard dengue virus-induced acute viral encephalitis. *Sci Rep*. 2016 Jun 9;6:27670. doi: 10.1038/srep27670.
203. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS pathog*. 2008; 4:e1000244.
204. Vass, K., Lassmann, H. Intrathecal application of interferon-gamma: progressive appearance of MHC antigens within the nervous system. *Am. J. Pathol*. 1990; 137, 789-800.
205. Vasconcelos, B. C. *et al*. Antibody-enhanced dengue disease generates a marked CNS inflammatory response in the black-tufted marmoset *Callithrix penicillata*. *Neuropathology*. 2016 Feb;36(1):3-16. doi: 10.1111/neup.12229. Epub 2015 Aug 24.
206. Velandia-Romero ML, Acosta-Losada O, Castellanos JE. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *J Neurovirol*. 2012 Oct; 18(5):374-87. <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-012-0117-y>. Epub 2012 Jul 24.
207. Velandia-Romero ML, Calderón-Peláez MA, Castellanos JE. In Vitro Infection with Dengue Virus Induces Changes in the Structure and Function of the Mouse Brain Endothelium. *PLoS One*. 2016 Jun 23;11(6):e0157786. doi: 10.1371/journal.pone.0157786. eCollection 2016.
208. Viswanathan S, Botross N, Rusli BN, Riad A. Acute disseminated encephalomyelitis complicating dengue infection with neuroimaging mimicking multiple sclerosis: a report of two cases. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;10:112–5

209. Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 2011; 23,29 (42):7221-8.
210. WHO, World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control .1997; 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
211. WHO, World health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals. 2014 <http://www.who.int/immunization/diseases/dengue/en/>.
212. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. 2009. doi:WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.
213. Xie X, Gayen S, Kang C, Yuan Z, Shi PY. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol*. 2013 Apr; 87(8):4609-22.
214. Yauch LE, Shrestha S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res*. 2008 Nov; 80(2):87-93. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.06.010. Epub 2008 Jul 9.
215. Zellweger RM, Shrestha S. Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. *Front Immunol*. 2014; 5: 151.
216. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*. 2012 Jan; 4(1):62-82.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Documentação CEUA e CEP



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética  
no Uso de Animais

#### LICENÇA

LW-14/12

Certificamos que o protocolo (P-12/11-3), intitulado "Estudo experimental de dengue em modelo murino", sob a responsabilidade de MARCIANO VIANA PAES, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/03/2016 e inclui o uso total de :

***Mus musculus***

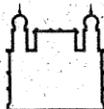
- 50 Machos de BALB/cJ, Idade: 4 Semana(s), Peso: 25,0000 Grama(s).

***Mus musculus***

- 20 Machos de BALB/cJ, Idade: 1 Semana(s), Peso: 25,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 19 de março de 2012

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética  
no Uso de Animais

### TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DA LICENÇA Nº LW-14/12 (P-12/11.3)

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FIOCRUZ, em atenção à solicitação do Dr. Marciano Viana Paes autoriza o presente aditivo, conforme solicitação do proponente via carta s/nº, de 14 de dezembro de 2012.

1. Inclusão 330 *Mus musculus* BALB/c;
2. Inclusão de 400 camundongos suíços;
3. Inclusão de 100 camundongos C57/BL6.

Este aditivo tem validade até 19 de março de 2016.

Rio de Janeiro, 17 de dezembro de 2012.

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octavio A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise histopatológica em tecidos de casos fatais de dengue, buscando caracterizar os principais alvos celulares envolvidos na patogênese da dengue.

**Pesquisador:** Marciano Viana Paes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47525115.3.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.308.318

#### **Apresentação do Projeto:**

Sendo a dengue uma importante arbovirose humana que acomete indivíduos que vivem em regiões tropicais e subtropicais, sendo um sério problema de saúde pública em função da sua alta taxa de morbidade e mortalidade. Milhares de pessoas moram em áreas endêmicas da dengue com um aumento anual do número de novos casos. Assim a necessidade de estender conhecimentos acerca da patogenicidade do vírus nos casos fatais em diferentes órgãos, entendendo o envolvimento na patofisiologia da doença e a meta precípua deste projeto.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

O presente trabalho visa obter subsídios sobre a patogênese causada pelo vírus da dengue, baseado na avaliação histopatológica e determinação do perfil de citocinas/quimiocinas nos tecidos de casos fatais de dengue, com objetivo de elucidar os principais alvos celulares e mediadores envolvidos na patogênese da dengue

Objetivo Secundário:

- Avaliação histopatológica das lesões causadas pela infecção com DENV-3 e da epidemia de 2008-10, em diferentes órgãos obtidos de sete casos fatais de dengue;
- Investigar, através da microscopia eletrônica de transmissão, quais são as principais células

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.308.318

envolvidas na patogênese da doença nos diferentes tecidos dos casos fatais.

- Detecção de antígenos virais de dengue nos diferentes órgãos dos casos fatais de dengue;
- Quantificação por imunohistoquímica das subpopulações de células T, B e macrófagos nos diferentes órgãos obtidos de casos fatais de dengue;
- Quantificação por imunohistoquímica da produção de algumas citocinas produzidas nos diferentes órgãos obtidos de casos fatais de dengue;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

O grupo focal desta pesquisa é constituído por indivíduos que foram á óbitos em decorrência da infecção com o vírus da Dengue. Todo o material que fará parte da pesquisa est Os blocos de parafina a serem utilizadas neste projeto fazem parte de um arquivo do laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais /IOC. Todo o material é identificado em um livro de protocolo do laboratório, e a partir daí cada caso é conhecido apenas pelo número desse registro. Assim o risco pode ser considerado inexistente para este grupo. Uma vez que a necropsia foi necessária para se conhecer a causa mortis e a família concedeu autorização para uso das amostras em pesquisa futuras, os riscos são pouco frequentes.

Benefícios:

Devido ao fato dos 07 voluntários da pesquisa terem evoluído para o óbito os benefícios não recaem sobre estes. Assim este projeto poderá contribuir para a compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos na patogênese da doença. Além disso, esses estudos proporcionarão a sua utilização em testes de novos fármacos para o tratamento da doença e o desenvolvimento de vacinas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto de pesquisa apresenta importância científica, apresenta-se exequível, uma vez que irá ser desenvolvido com amostras de pacientes tratados para Dengue que foram a óbito. Integra a equipe de pesquisa , o médico, o qual na época de 2008 fez a coleta do material e a integração deste em blocos de parafinas para integrar o acervo do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais /IOC.

O Pesquisador responsável pela pesquisa informa em carta resposta ao CEP FIOCRUZ/IOC, que não fará uso de outras fontes de dados secundários (prontuários), tendo inserido esta alteração também no projeto da PB.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.308.318

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os seguintes documentos: Folha de rosto- Em conformidade

Projeto de Pesquisa: Em conformidade

- TCLE - Solicitação de dispensa ACEITA. Uma vez que todo o material foi coletado e acervo do do Laboratório de biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais/IOC e o consentimento de necropsia e uso de material foi concedido na época ao médico responsável Dr. Carlos Alberto Basilio de Oliveira. Pendência ATENDIDA

- Carta de anuência das Instituições das fontes secundárias de pesquisa. Uma vez que o Pesquisador não fará uso de fontes secundárias de dados, não há necessidade de desta carta. Desta forma a Pendência esta ATENDIDA

**Recomendações:**

Recomendamos conforme o que preconiza a resolução 466/12, que sejam elaborados e apresentados relatórios parciais e final ao CEP e que os dados da pesquisa sejam mantidos sob sua guarda por um período de 5 anos após o termino da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Tendo o pesquisador atendido com clareza as pendências expressas no parecer 1.186.022. Considero o projeto APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoAnuencia.pdf	29/09/2015 21:50:49	Anselmo Gomes de Araujo	Aceito
Outros	CartarespostaCep.pdf	29/09/2015 21:49:23	Anselmo Gomes de Araujo	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_266669.pdf	29/09/2015 11:22:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto CEP Detalhado.docx	18/07/2015 16:16:11		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	10/07/2015 17:01:57		Aceito
Outros	CEP Casos Fatais Equipe.docx	06/07/2015 14:20:04		Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.308.318

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 04 de Novembro de 2015

*José Henrique da Silva Pilotto*

Assinado por:

José Henrique da Silva Pilotto  
(Coordenador)

*José Henrique da Silva Pilotto*  
Matrícula SIAPE 0827357  
CRM 52.37829-7

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

## 9.2 Artigos publicados durante o mestrado

Póvoa TF, Oliveira ER, Basílio-de-Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, **Salomão NG**, Mota EM, Paes MV. Peripheral Organs of Dengue Fatal Cases Present Strong Pro-Inflammatory Response with Participation of IFN-Gamma-, TNF-Alpha- and RANTES-Producing Cells. PLoS One. 2016 Dec 22;11(12):e0168973. doi: 10.1371/journal.pone.0168973. eCollection 2016.

Oliveira ERA, Póvoa TF, Nuovo GJ, Allonso D, **Salomão NG**, Basílio-de-Oliveira CA, Geraldo LHM, Fonseca CG, Lima FRS, Mohana-Borges R, Paes MV. Dengue fatal cases present virus-specific HMGB1 response in peripheral organs. Sci Rep. 2017 Nov 22;7(1):16011. doi: 10.1038/s41598-017-16197-5.

Kíssila Rabelo, Regina Célia de Souza Campos Fernandes, Luiz José de Souza, Thais Louvain de Souza, Flávia Barreto dos Santos, Priscila Conrado Guerra Nunes, Elzinandes Leal de Azeredo, **Natália Gedeão Salomão**, Gisela Freitas Trindade, Carlos A. Basílio-de-Oliveira, Jorge José de Carvalho, Enrique Medina-Acosta and Marciano Viana Paes. Placental Histopathology and Clinical Presentation of Severe Congenital Zika Syndrome in a Human Immunodeficiency Virus-Exposed Uninfected Infant. Front. Immunol. 07 December 2017 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01704>

Salomão, Natália .

Estudo da imunopatologia no cérebro/cerebelo de camundongos infectados com denv-2 por via intravenosa e em casos fatais humanos: histopatologia, detecção viral e citocinas / Natália Salomão. - , 2018.

101 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientadora: Flavia Santos.

Co-orientador: Marciano Paes.

Bibliografia: f. 72-92

1. Dengue. 2. Camundongo. 3. Humano. 4. Sistema nervoso central. 5. Neuroglia. I. Título.