

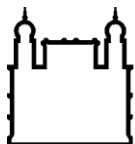
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS  
MIOCÁRDICAS EM 117 CASOS FATAIS DE DENGUE**

**EMÍLIA TOMÉ DE SOUSA**

Fortaleza  
Julho de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

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

***EMÍLIA TOMÉ DE SOUSA***

Alterações histopatológicas e imuno-histoquímicas miocárdicas em 117 casos fatais de dengue

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

**Orientador (es):** Prof. Dra. Elzinandes Leal de Azeredo  
Prof. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu

Fortaleza  
Julho de 2017

**Catálogo na fonte**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica**

**Biblioteca de Saúde Pública**

Tomé de Sousa, Emília.

Alterações histopatológicas e imuno-histoquímicas miocárdicas em 117 casos fatais de dengue / Emília Tomé de Sousa. - Rio de Janeiro, 2017.  
110 f.; il.

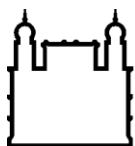
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Elzinandes Leal de Azeredo.

Co-orientadora: Margarida Maria de Lima Pompeu.

Bibliografia: f. 93-106

1. Arbovirose. 2. Dengue. 3. Casos fatais. 4. Miocardite. 5. Diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

**AUTOR: EMÍLIA TOMÉ DE SOUSA**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS  
MIOCÁRDICAS EM 117 CASOS FATAIS DE DENGUE**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Elzinandes Leal de Azeredo  
Prof. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu**

**Aprovada em: 17/07/2017**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra. Martha Cecília Suárez Mutis - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz-  
Fiocruz/Rio de Janeiro)

**Profa. Dra. Cristiane da Cunha Frota** (Universidade Federal do Ceará)

**Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornellas** (Universidade Federal do Ceará)

**Dr. Marciano Viana Paes** (Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz/Rio de Janeiro)

**Dr. Luiz Alberto Benvenuti** [(Instituto do Coração (Incor) - Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo (FMUSP)]

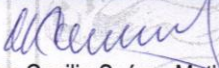
Rio de Janeiro, 17 de julho de 2017





Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

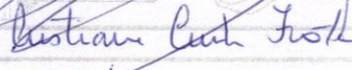
Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Emília Tomé de Sousa**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Elzinandes Leal de Azeredo e Dr<sup>a</sup>. Margarida Maria de Lima Pompeu. Ao décimo sétimo dia do mês de julho de dois mil e dezessete, realizou-se às quatorze horas, no Auditório do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, o exame da tese de doutorado intitulada: "**Alterações histopatológicas e imunohistoquímicas miocárdicas em casos fatais de dengue autopsiados no estado do Ceará**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina - área de concentração: Doenças Infeciosas e Parasitárias, na linha de pesquisa: Infecções e Doenças produzidas por Vírus. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Marciano Viana Paes - IOC/FIOCRUZ; Dr<sup>a</sup>. Conceição Aparecida Dornelas - UFC/CE; Dr. Luiz Alberto Benvenuti - INCOR-FAMUSP/SP, Dr<sup>a</sup>. Cristiane Cunha Frota - UFC/CE e como suplentes: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa – IOC/FIOCRUZ e Dr. José.Telmo Valença Júnior – UFC/CE. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Medicina está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 17 de Julho de 2017.

  
Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis (Presidente da Banca e Coordenadora do Programa):

Dr. Marciano Viana Paes (Membro da Banca): 

Dr<sup>a</sup>. Conceição Aparecida Dornelas (Membro da Banca): 

Dr. Luiz Alberto Benvenuti (Membro da Banca): 

Dr<sup>a</sup>. Cristiane Cunha Frota (Membro da Banca): 

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360  
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimento@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimento@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensino](http://www.fiocruz.br/iocensino)

**Às vítimas das doenças negligenciadas - homens, mulheres, jovens e crianças, cujas vidas foram atingidas pela insuficiência de políticas públicas de saneamento, educação e saúde.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

À Fundação Oswaldo Cruz-Instituto Oswaldo Cruz por ter se dedicado ao desafio de promover o DINTER no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

À minha orientadora Professora Dra Elzinandes Leal de Azeredo pela sua paciência, mansidão com que me conduziu nesse trabalho, o que tornou possível sua finalização, além de ter me proporcionado um grande crescimento pessoal como pesquisadora.

À minha co-orientadora Professora Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu, por ter me incentivado a participar do DINTER e ter construído comigo o projeto inicial e norteando os primeiros anos da pesquisa.

À Professora Dra Vera Capelozzi por ter me recebido no Laboratório de Genômica Pulmonar da FMUSP, o que contribuiu decisivamente para a realização das reações de imuno-histoquímica e do TUNEL, que subsidiaram o trabalho.

Aos professores do DINTER FIOCRUZ/UFC, pelo elevado nível de aprendizado que geraram para minha formação científica e profissional em especial ao Professor Dr Filipe Anibal Carvalho Costa, pela sua disposição, disponibilidade e ainda por ter me despertado para a grandiosidade do meu trabalho e para a contribuição social que ele trará, o que elevou minha dedicação na sua finalização.

Aos estimados amigos e colegas de curso Aline, Camila, Cristianne, Cynara, Fabrício, Jakeline, Juliana, Luiz, Roberta, Weberty, pelo companheirismo e ajuda mútua que caracterizaram esses anos de convívio.

À amiga e também colega de curso Professora Fernanda Capelo Barroso, pela sua inestimável ajuda, especialmente nos últimos meses, que com muita generosidade dividiu comigo seu tempo, entusiasmo e conhecimentos para melhor realizarmos nossos trabalhos.

Aos colegas professores e patologistas do Departamento de Patologia e Medicina Legal que assumiram minhas atividades docentes nos períodos em que precisei me

ausentar da cidade de Fortaleza, em especial ao Professor Dr José Telmo Valença Júnior e à Dra Adriana Regina Vilarinho, que me substituíram em muitas outras atividades docentes e na Supervisão da Residência Médica, respectivamente.

À direção do Serviço de Verificação de Óbitos Dr Rocha Furtado nas pessoas das Dras Denise Nunes Oliveira e Deborah Nunes de Melo Braga (2005-2012) e dos Drs Francisco José Ferreira Simão e Luciano Monteiro Franco (2013-2017) pela anuência na realização da pesquisa.

À Dra Deborah Nunes de Melo Braga pela concessão de utilizar o material por ela selecionado no Serviço de Verificação de óbitos Dr Rocha Furtado.

Aos técnicos do Serviço de Verificação de Óbitos Dr Rocha Furtado Ana Maria da Silva Reis, Natiel Silva dos Anjos e Andreia Silva de Oliveira pelo incansável auxílio na localização de prontuários, localização dos blocos de parafina e na preparação histológica do material respectivamente.

À direção do Laboratório Central do Estado do Ceará na pessoa do Dr Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá pela anuência na realização da pesquisa.

À Dra Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo por toda a assessoria técnico e científica das técnicas moleculares utilizadas.

À doutoranda Priscila Conrado Guerra Nunes do Laboratório de Imunologia Viral do IOC pela contribuição na realização da imuno-histoquímica para as proteínas NS1 e NS3.

Às técnicas do Laboratório de Genômica Pulmonar da FAMUSP Esmeralda Miristeni Eher e Sandra de Moraes Fernezljan, pelo esmero e profissionalismo na realização das técnicas de imuno-histoquímica.

Aos meus pais Maria Ireuda (*in memoriam*) e Geraldo Tomé, por terem incentivado os filhos a adquirirem conhecimento e a multiplicar esse conhecimento.

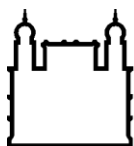
Ao meu amado marido José Roberto, que me ama com um amor exigente e isso me engrandece e que, além disso, sempre me estimulou e colaborou na realização deste trabalho e de muitos outros.

Aos meus lindos e amados filhos Rebeca, Débora, Gabriel, Mateus, Lucas e Ana, por serem o meu tesouro mais valioso, e por me ajudarem a ser cada vez mais uma pessoa melhor.



***“Mortui vivos docent”***

**Karl Rokitansky**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS MIOCÁRDICAS EM 117 CASOS FATAIS DE DENGUE RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Emília Tomé de Sousa

**Introdução:** Os vírus dengue (DENV1-4) são os arbovírus humanos de maior importância médica no mundo. No Ceará, Nordeste brasileiro, a dengue é endêmica desde 1986, quando foi isolado o sorotipo DENV-1. Foram registradas sete grandes epidemias em 1987, 1994, 2001, 2008, 2011, 2012 e 2015. Estudos demonstram que formas graves podem estar associadas à manifestações cardíacas. Clinicamente a miocardite, pode ser aguda, crônica ou em atividade persistente e fulminante. Podemos ainda classificar a miocardite pelos achados histopatológicos, como miocardite linfocítica, sendo esse o padrão mais comumente encontrado associado à etiologia viral. Os mecanismos relacionados com o acometimento cardíaco incluem efeitos diretos do DENV no miocárdio e efeitos indiretos da resposta inflamatória desencadeada pela infecção culminando na liberação de citocinas vasoativas pró-inflamatórias, responsáveis pelo extravasamento vascular e inflamação miocárdica. Igualmente à miocardite fulminante de outras etiologias, a miocardite durante a infecção pelo DENV está associada à alta mortalidade.

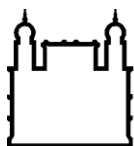
**Objetivos: Geral:** Descrever as alterações morfológicas e imunoinflamatórias no miocárdio dos casos fatais de dengue no Ceará no período de 2011-2013.

**Específicos:** Descrever características demográficas, clínicas e laboratoriais dos casos. Identificar e quantificar as alterações morfológicas; Determinar a frequência de miocardite; Definir a frequência de apoptose; Quantificar linfócitos T CD4 e CD8, macrófagos (CD68) e marcador endotelial CD31 presentes no miocárdio e correlacioná-los com os achados morfológicos; Verificar a expressão das proteínas NS1 e NS3.

**Metodologia:** Estudo retrospectivo do tipo série de casos, avaliou 117 amostras de miocárdio de casos confirmados de dengue e autopsiados no SVO-Ce de janeiro/2011 a dezembro/2013, quanto a dados demográficos, clínicos, laboratoriais. A análise histopatológica na coloração do HE, avaliou alterações morfológicas incluindo edema, hemorragia, necrose, fibrose e infiltrado inflamatório. Utilizamos os critérios de Dallas e da WHO/ISFC para o diagnóstico da miocardite. Anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68, anti-CD31, anti-NS1 e anti-NS3 foram usados na identificação das células mononucleares, das células CD31+ e para avaliação de proteínas virais por imuno-histoquímica respectivamente. Apoptose foi avaliada pela técnica TUNEL.

**Resultados:** Foi encontrado alto percentual de miocardite nos pacientes (47/117,40,2%) sem distinção entre sexo e idade. Os sorotipos

identificados foram DENV1, DENV3 e DENV4. Análises histopatológicas revelaram áreas com edema, hemorragia e necrose do tecido cardíaco; No entanto, a hemorragia e a necrose foram significativamente maiores nos pacientes com miocardite. Maior frequência de células expressando a molécula CD31/PECAM-1 foram encontradas nos pacientes com miocardite. Por outro lado, encontramos maior frequência de células apoptóticas nos casos sem miocardite. As proteínas NS1 e NS3 foram detectadas em macrófagos e cardiomiócitos dos dois grupos analisados. **Conclusão:** A análise imuno-histoquímica revelou ser 15% mais eficiente na identificação da miocardite em comparação com a análise histopatológica. Não encontramos parâmetros bioquímicos, hematológicos ou demográficos que pudessem estar associados ao risco de desenvolvimento de miocardite. Não houve suspeita clínica em nenhum dos casos estudados. Embora, existam muitas lacunas no entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da miocardite induzida pela infecção, este trabalho aponta a necessidade de serem propostos pelas entidades médicas e governamentais protocolos para a instauração de propeidêutica cardíaca eficiente nos casos de dengue grave.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### CARDIACS HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHYSTOCHEMICAL CHANGES IN 117 FATAL CASES OF DENGUE

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Emília Tomé de Sousa

**Introduction:** Dengue viruses (DENV1-4) are the most important human arboviruses in the world. In Ceará, Northeast Brazil, dengue has been endemic since 1986, when the serotype DENV-1 was isolated. Seven major epidemics were recorded in 1987, 1994, 2001, 2008, 2011, 2012 and 2015. Studies show that more severe forms may be associated with cardiac manifestations. Clinically, myocarditis may be acute, chronic, or persistent and fulminant. we can classify myocarditis based on histopathological findings, such as lymphocytic myocarditis, which is the most commonly found pattern, especially with viral etiology. Mechanisms related to cardiac involvement include direct effects of DENV on the myocardium as well as indirect effects of the inflammatory response triggered by the infection culminating in the release of vasoactive and proinflammatory cytokines responsible for capillary leakage and possibly myocardial inflammation. In the same way as fulminant myocarditis of other etiologies, fulminant myocarditis in dengue is associated with high mortality. Methodology: A case-series study evaluated 117 samples of cardiac tissue from confirmed dengue cases autopsied in the SVO-Ce from January 2011 to December 2013 regarding demographic, clinical and laboratory data. Histopathological analysis on HE staining evaluated morphological changes including edema, hemorrhage, necrosis, fibrosis and inflammatory infiltrate. We used the WHO / ISFC criteria for the myocarditis diagnosis. Anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 and anti-CD31 monoclonal antibodies were used in the identification of mononuclear cells as well as CD31 positive cells by immunohistochemistry. The presence of apoptosis in the myocardium was evaluated by the TUNEL technique. Results: A high percentage of myocarditis was found in patients (47 / 117,40,2%) without distinction between sexes and ages. The serotypes identified were DENV1, DENV3 and DENV4. Histopathological analyzes revealed areas with edema, hemorrhage and cardiac tissue necrosis; However, hemorrhage and necrosis were significantly greater in patients with myocarditis. In addition, increased mononuclear inflammatory infiltrate was observed in myocarditis. Higher frequency of cells expressing the CD31 / PECAM-1 molecule were found in patients with myocarditis. On the other hand, we found a higher frequency of apoptotic cells in cases without myocarditis. NS1 and

NS3 proteins were detected in cardiomyocytes of the two groups analyzed. Conclusion: The immunohistochemical analysis revealed a frequency of 15% more cases compared to the histopathological analysis. We did not find biochemical, hematological or demographic parameters that could be associated with the risk of developing myocarditis. There was no clinical suspicion in any of the cases studied. Although there are many gaps in the understanding of the mechanisms involved in the infection-induced myocarditis pathogenesis, this work points out the need of efficient cardiac propaedeutic protocols by medical and governmental entities in severe dengue cases.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 HISTÓRICO DA DENGUE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 FORMAS CLÍNICAS</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 O VÍRUS</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 Resposta Imunológica Durante a Infecção Pelo Denv. ....	12
1.3.2 A Virulência do DENV .....	14
1.3.3 Fatores ligados ao Hospedeiro .....	15
1.3.4 Papel dos Anticorpos na infecção pelo DENV.....	16
1.3.5 “Pecado Antigênico Original” .....	16
1.3.6 Teoria da produção desregulada de citocinas – “Tempestade de citocinas” .....	17
1.3.7 Mimetismo Molecular .....	20
<b>1.4 MIOCARDITE</b> .....	<b>21</b>
1.4.1 Coração e Miocárdio.....	21
1.4.2 Definição e Classificações de Miocardite .....	23
1.4.3 Patogênese da Miocardite na Dengue .....	26
<b>1.5 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>29</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>32</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Desenho e período do estudo</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2 População e amostra do estudo</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3 Coleta de amostras de tecido, sangue e líquido</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4 Confirmação do diagnóstico de dengue</b> .....	<b>35</b>
3.4.1 Captura de anticorpos da classe IgM anti-DENV no sangue pela técnica ELISA .....	36

3.4.2	Isolamento viral a partir de amostras de sangue, soro, líquor e dos tecidos a fresco, com o objetivo identificar o sorotipo.....	36
3.4.3	Detecção de antígenos virais (anti-DENV) pela imunohistoquímica de tecidos. ....	38
3.4.4	Detecção de antígenos virais (NS1) pela técnica ELISA no sangue e/ou líquor. ....	39
3.4.5	Diagnóstico molecular feito pelo RT-PCR. ....	40
<b>3.5</b>	<b>Análise macroscópica do coração.....</b>	<b>41</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise histopatológica.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7</b>	<b>Microarranjos de tecidos (<i>tissue microarray</i>).....</b>	<b>42</b>
<b>3.8</b>	<b>Técnica de imunohistoquímica para identificação e quantificação dos marcadores CD4, CD8, CD68, CD31, NS1 e NS3.....</b>	<b>46</b>
<b>3.9</b>	<b>Identificação de Proteína não estrutural 1 (NS1) e Proteína não estrutural 3 (NS3) no tecido cardíaco através de imunohistoquímica.....</b>	<b>47</b>
<b>3.10</b>	<b>Detecção in situ de apoptose pela técnica <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> (sigla em inglês TUNEL).....</b>	<b>48</b>
<b>3.11</b>	<b>Histomorfometria com retículo para quantificação das alterações morfológicas e da expressão da molécula CD31.....</b>	<b>48</b>
<b>3.12</b>	<b>Estratégia de análise de dados e variáveis do estudo.....</b>	<b>49</b>
<b>3.13</b>	<b>Aspectos Éticos.....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Descrição das características demográficas, clínicas e laboratoriais de todos os casos fatais de dengue nos anos de 2011 a 2013.....</b>	<b>52</b>
4.1.2	Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	58
<b>4.2</b>	<b>Miocardite: classificação e diagnóstico dos casos fatais.....</b>	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos casos fatais com miocardite.....</b>	<b>61</b>

4.5	Expressão da molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1/CD31) no tecido miocárdico dos casos estudados .....	73
4.7	Deteção das proteínas NS1 e NS3 no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV .....	76
5	DISCUSSÃO	78
6	CONCLUSÕES	90
7	PERSPECTIVAS	92
8	REFERÊNCIAS	93
9	ANEXOS	107
9.1	Aprovação no Comitê de Ética .....	107
9.2	Carta de anuência do Laboratório Central do Estado do Ceará .....	109
9.3	Carta de anuência do Serviço de Verificação de óbitos Dr Rocha Furtado.....	110



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Classificação Clínica da Dengue. Figura adaptada do Manual de Dengue WHO, 2009. ....	6
Figura 2 Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula HepG2 infectada por DENV. ....	9
Figura 3: Estrutura do vírus dengue. ....	10
Figura 4 O genoma do vírus dengue. ....	11
Figura 5 Níveis de citocinas/quimiocinas e receptores solúveis em pacientes com Dengue, nas diferentes formas clínicas. ....	18
Figura 6 Modelo de secreção de citocinas durante a Dengue ....	19
Figura 7 Viremia, resposta antígeno-anticorpo contra a proteína NS1 durante a infecção DENV. ....	21
Figura 8 Tecido muscular cardíaco, mostrando miócitos normais (HE 400x) Fonte: o próprio autor. ....	22
Figura 9 Possíveis mecanismos imunológicos e virais envolvidos nas manifestações cardíacas e vasculares da dengue. Fonte: figura adaptada de Yaccoub e colaboradores, 2014 (Yacoub et al. 2014) ....	27
Figura 10 Desenho esquemático da sequência da obtenção das amostras e confirmação diagnóstica ....	35
Figura 11 Desenho esquemático da obtenção do bloco de TMA (Adaptado do Blog: Pathology of John's Hopkins Medicine. A) Técnica de TMA B) Bloco de TMA C) Corte histológico do bloco de TMA. ....	43
Figura 12 Desenho esquemático da sequência da realização da seleção das áreas para a realização do bloco de TMA e da leitura das lâminas após as reações de IHQ e TUNEL. ....	44
Figura 13 Figura representativa das planilhas dos blocos de TMA. ....	45
Figura 14 TMA. A. Planilha. B. Bloco. C. Lâmina ....	46
Figura 15 Microfotografia do retículo acoplado à ocular do microscópio ótico. Adaptado de Weibel ER. Stereological Methods. Vol1. Academic Press, INC. London, 1979. ....	49
Figura 16 Principais Sinais e sintomas ....	54
Figura 17 Frequência de miocardite nos casos fatais com diagnóstico laboratorial confirmado de infecção pelo DENV autopsiados no SVO. ....	59

Figura 18 Figura representativa com identificação de infiltrado de células mononucleares no tecido cardíaco de casos fatais com diagnóstico positivo de infecção pelo DENV autopsiado no SVO.....	59
Figura 19 Células mononucleares no miocárdio de casos fatais de dengue. ...	60
Figura 20. Peso do coração nos casos fatais com e sem miocardite e em relação ao gênero. ....	65
Figura 21 Microfotografias de áreas exibindo hemorragia no miocárdio dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO-Ce, setas pretas e círculos.....	66
Figura 22: Microfotografias de áreas exibindo edema no miocárdio, dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO-Ce, setas pretas. ....	66
Figura 23 . Microfotografias de áreas exibindo necrose no miocárdio, dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO-Ce, setas pretas finas indicam necrose recente (entre 6 e 12h), o círculo indica necrose mais avançada (após 12h) e setas grossas indicam necrose em bandas de contração.....	67
Figura 24 Microfotografias de áreas exibindo fibrose no miocárdio, dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO-Ce, círculo preto .....	68
Figura 25 Percentual das alterações histopatológicas no miocárdio dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO. ....	69
Figura 26 Quantificação de linfócitos CD4 e CD8 no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV 1, 3 e 4.....	71
Figura 27 Quantificação de macrófagos CD68+ no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV.....	72
Figura 28 Frequência de linfócitos T CD4 e CD8 e macrófagos CD68 presentes no infiltrado inflamatório no miocárdio na presença ou ausência de miocardite. ....	73
Figura 29 Expressão de PECAM-1/CD31 no tecido cardíaco de caso fatal infectado pelo DENV.....	74
Figura 30 Expressão de PECAM-1/CD31 no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV.....	74
Figura 31 Miocárdio de caso fatal infectado pelo DENV com célula apoptótica marcada por TUNEL.....	75
Figura 32 Células apoptóticas marcadas por TUNEL no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV.....	76

**Figura 33 Microfotografias das marcações imunohistoquímicas das proteínas não estruturais NS1 e NS3 .....77**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais causas de Miocardite / Cardiomiopatia Inflamatória .....	25
Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue (Lanciotti et al. 1992).....	41
Tabela 3 Diagnóstico Laboratorial de 117 casos fatais autopsiados no SVO 2011-2013, Ceará, Brasil. ....	53
Tabela 4. Características demográficas, clínicas e laboratoriais de 117 casos fatais de dengue autopsiados no SVO nos anos de 2011, 2012 e 2013. ....	57
Tabela 5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos de casos fatais com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV autopsiados no SVO durante os anos 2011, 2012 e 2013.....	58
Tabela 6 Características demográficas, clínicas e laboratoriais de 117 casos fatais com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV 1, 3 e 4, autopsiados no SVO nos grupos com miocardite e sem miocardite, anos 2011-2013.....	62
Tabela 7. Frequência da distribuição de comorbidades nos grupos com e sem miocardite.....	63
Tabela 8 Sinais de alarme e fatores associados com as formas graves de dengue nos casos fatais com miocardite e sem miocardite.....	63
Tabela 9 Parâmetros hematológicos e bioquímicos de casos fatais com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV 1, 3 e 4 autopsiados no SVO com ou sem miocardite. ....	64
Tabela 10 Frequência de marcação das proteínas NS1 e NS3 em macrófagos de casos com e sem miocardite e mediana de células apoptóticas no tecido cardíaco. ....	77

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AD	<i>Anno Domini</i>
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i>
ALT/TGP	Alanina aminotransferase / transaminase glutâmico pirúvica
APC	Célula apresentadora de antígeno
AST/TGO	Aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacética
C	Proteína do Capsídeo
C4	Fração 4 do Complemento
CCL2/MCP-1	Ligante 2 de CC quimiocina/ proteína quimiotática de monócitos-1
CCR2	Receptor de quimiocina 2
CD	Célula dendrítica
CD31	<i>cluster of differentiation 31=PECAM-1</i>
CD4	Marcador de Célula T com grupo de diferenciação 4
CD68	Marcador de macrófago
CD8	Marcador de Célula T com grupo de diferenciação 8
CE	Célula endotelial
CXCL10/IP-10	Ligante 10 de CXC quimiocina/ proteína 10 induzida por interferon
DAB	Diaminobenzidina
DCC	Dengue com complicação
DCSA	Dengue com sinais de alarme
DENCO	Estudo Multicêntrico de Controle da Dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
DG	Dengue Grave
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DSSA	Dengue sem sinais de alarme
E	Proteína do envelope do vírus dengue
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
FcR	Receptor de Fc
FD	Febre do dengue

FHD	Febre hemorrágica do dengue
H&E	Coloração de Hematoxilina e Eosina
H1N1	Vírus da Influenza A sorotipo H1N1
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HLA	Antígeno de histocompatibilidade
HT	Hematócrito
IEC-Pa	Instituto Evandro Chagas – Pará
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
INF	Interferon
INF- $\gamma$	Interferon gama
ISFC	<i>International Society and Federation Cardiology</i>
LACEN-Ce	Laboratório Central do Estado do Ceará
M	Proteína da membrana do vírus dengue
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Nested RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase nested
NK	Célula Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NS	Proteína não estrutural
OMS/WHO	Organização mundial da Saúde/World Health Organization
PBS	Tampão salina fostato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PrM	Pré proteína da membrana viral
PUBMED	Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
Real Time RT-PCR	Transcrição reversa – reação em cadeia pela polimerase em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa – reação em cadeia pela polimerase
SAAP	Streptavidina-biotina-fosfatase alcalina

SCD	Síndrome do Choque do Dengue
SESA	Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
SVO-Ce	Serviço de Verificação de Óbitos Dr Rocha Furtado
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador beta
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TUNEL	Técnica <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
VE-caderina	Caderina Endotelial Vascular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Vs	Versus

## 1 INTRODUÇÃO

Dengue é a arbovirose mais comum a nível mundial, com transmissão ocorrendo em pelo menos 128 países e até 4 bilhões de pessoas em risco, sendo mais prevalente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente na Ásia e América Latina (Guzman and Harris 2015; Stanaway et al. 2016)

O vírus dengue (DENV) pertence à família *Flaviviridae* e é transmitido aos seres humanos pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. Compreende quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV-4) distintos. As mais recentes estimativas revelam uma variação de 50 a 200 milhões de infecções a cada ano e cerca de 20 mil mortes, considerada a mais importante virose transmitida por artrópodes no século 21 (Cucunawangsih and Lugito 2017; Gubler 2002; Martina et al. 2009a; Stanaway et al. 2016).

Clinicamente, manifesta-se por um espectro que vai desde uma doença subclínica a uma condição grave e letal (Cucunawangsih and Lugito 2017). Ainda há muito o que se aprender sobre a patogênese das diferentes manifestações das infecções pelo DENV, como a respeito das variadas complicações cardíacas, em especial a miocardite, podendo ser subdiagnosticadas na prática clínica e contribuir para a mortalidade (Martina et al. 2009a; Miranda et al. 2013b). Na verdade pouco se sabe sobre a expressão da miocardite em pacientes que foram a óbito por dengue (Lee et al. 2010; Torres et al. 2008).

### 1.1 HISTÓRICO DA DENGUE

O primeiro registro encontrado até agora está em uma enciclopédia chinesa de sintomas de doença e de medicamentos, publicada pela primeira vez durante a dinastia Chin, de 265 a 420 A.D. e editado formalmente em 610 A.D. na Dinastia Tang e novamente em 992 A.D. na Dinastia Sung do Norte (Gubler 1998; Wilder-Smith et al. 2013). A doença era chamada, pelos chineses, de veneno da água, pensando tratar-se de alguma enfermidade relacionada a insetos voadores que surgiam da água (Gubler 1998).



A disseminação da doença pelo mundo ocorreu concomitantemente com o incremento do comércio marítimo que resultou em intensa mobilidade humana e do vetor através dos continentes (Gubler 2006). As pesquisas sugerem que surtos de doenças nas Índias Ocidentais francesas em 1635 e Panamá em 1699 também poderiam ter sido dengue, revelando que o dengue ou uma doença muito semelhante teve uma ampla distribuição geografia antes do século 18 (Gubler 1998). No entanto as primeiras informações bem documentadas de uma doença semelhante à Dengue ocorreu em epidemias na Indonésia e Egito em 1779 e na América, em 1780, nos Estados Unidos (Gubler 1998).

O padrão de distribuição da doença no mundo entre os anos de 1780 e 1940 permaneceu endêmico nas regiões tropicais e subtropicais com grandes e infrequentes surtos. Contudo, a infecção pelo DENV atingiu patamares elevados de incidência após o fim da segunda guerra mundial, em virtude da intensa e desenfreada urbanização o que favoreceu também o aumento da população do vetor e seu contato com populações humanas. Neste período tiveram início os estudos sobre a doença e o desenvolvimento de testes diagnósticos (Gubler 1998).

A agressão ao ecossistema no sudeste Asiático durante e após a Segunda Grande Guerra Mundial permitiu condições favoráveis para o aumento das arboviroses. Foi neste cenário que surgiu a primeira epidemia conhecida de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD), com pandemia global de dengue com transmissão epidêmica e hiperendemicidade (circulação de vários sorotipos do vírus da dengue); uma doença só recentemente descrita (Gubler 1998).

No Brasil, as campanhas de combate ao *A. aegypti* tiveram início com Emílio Ribas nas cidades de Sorocaba (1901), São Simão (1902) e Ribeirão Preto (1903), seguido por Oswaldo Cruz em 1903, na cidade do Rio de Janeiro, estendendo-se a todo Brasil. O último foco do mosquito foi debelado em 1955 e o certificado de erradicação do mosquito foi outorgado ao Brasil em 1958 (Teixeira and Barreto 1996).

No continente Americano, o combate da febre amarela foi iniciado nas décadas de 1940 e 1950, promovido pela Organização Pan-Americana de

Saúde, e o *A. aegypti* foi erradicado na maior parte da América Central e do Sul. Entretanto, com a interrupção do programa de erradicação do *A. aegypti* no início da década de 1970, houve um aumento gradual da re-infestação, de tal modo que na década de 1990 o vetor havia recuperado a distribuição que ocupava antes de sua erradicação (Gubler 1998; Pinheiro and Corber 1997).

Em 1977 houve o ressurgimento da epidemia de dengue nas Américas, com a introdução do DENV-1 na Jamaica, possivelmente tendo sido importado da África. A partir daí a epidemia se espalhou por todas as ilhas do Caribe e, em 1978, se espalhou nas Américas do Sul e Central (Pinheiro and Corber 1997).

A primeira epidemia de dengue confirmada clinicamente e laboratorialmente, no Brasil, ocorreu em 1981 em Boa Vista (Roraima), tendo sido isolados os sorotipos DENV-1 e o DENV-4. Contudo, a propagação para o resto do país, não se deu a partir desse episódio, pelo fato do mesmo ter sido rapidamente controlado. A disseminação do vírus para o país aconteceu a partir de casos de DENV-1 surgidos em Nova Iguaçu (Rio de Janeiro) em 1986 (Teixeira and Barreto 1996).

No período de 2001 a 2007, o Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) registrou 64,6% (2.798.601) de todos os casos de dengue nas Américas, dos quais 6.733 foram FHD com um total de 500 mortes. Destes, cerca de 98,5% foram notificados pelo Brasil, que também relatou a mais alta taxa de mortalidade (WHO 2009). Em 2016, o ministro da Saúde brasileiro descreveu a situação da dengue no país como "catastrófica" (Löwy 2017).

Os fatores meteorológicos, principalmente os índices pluviométricos e as variações de temperatura contribuem para o aumento dos vetores, estando associados com os picos das epidemias da dengue no Brasil. Contudo, para alcançar um melhor controle da dengue é necessário um investimento adequado em pesquisa, educação, treinamento e capacitação (Ebi and Nealon 2016; Viana and Ignotti 2013).

A dengue é considerada uma doença endêmica no Ceará desde 1986, quando foi isolado casos do sorotipo DENV-1 (Teixeira and Barreto 1996). Pelo Boletim Epidemiológico da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Ceará,

a doença manifesta-se de forma endêmica, e já foram registradas sete grandes epidemias nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011, 2012 e 2015 (Ceará 2017).

A introdução do sorotipo DENV-2 no Ceará, em 1994, gerou uma grande epidemia com dezenas de casos de FHD e 14 casos fatais. Até aquela data não havia sido notificado nenhum caso com vítima fatal (Vasconcelos et al. 1995).

Nos últimos anos ocorreram as três maiores epidemias do município, causadas por sorotipos diferentes: reintrodução do DENV-2 (2008); reintrodução do DENV-1 em 2011 e introdução do DENV-4 em 2012 (Ceará. SESA. 2016). Em 2016, no Ceará, foram confirmados 45 casos de Dengue Grave (DG) e 191 casos de Dengue Com Sinais de Alarme (DCSA), com 72 óbitos. No mesmo período de 2015, ocorreram 124 casos de DG e 664 casos de DCSA, com 30 óbitos (Ceará 2016).

## **1.2 FORMAS CLÍNICAS**

A dengue tem um amplo espectro de apresentações clínicas, muitas vezes com formas clínicas imprevisíveis; a infecção por qualquer um dos sorotipos pode ser assintomática, na maior parte dos casos, ou pode resultar em ampla variação de apresentações clínicas que vão desde uma síndrome gripal leve anteriormente conhecida como o dengue clássico ou Febre do Dengue (FD), até as formas mais graves da doença, que se caracterizam por coagulopatia, aumento da fragilidade e permeabilidade vasculares e derrames cavitários podendo evoluir para choque hipovolêmico. Na Ásia, o risco de desenvolver doença grave é maior em crianças infectadas até 15 anos, do que em adultos. Ao contrário do que ocorre nas Américas, onde os adultos são os principais alvos das formas mais graves da doença (Martina et al. 2009a; WHO 2009). Assim, as infecções foram classificadas em três categorias: febre indiferenciada, Febre do Dengue (FD) e Febre do Dengue Hemorrágico (FHD). E a FHD ainda foi classificada em quatro graus, sendo os graus III e IV definidos como Síndrome de Choque do Dengue (WHO 1997).

### **1.2.1. Evolução da classificação**

Devido ao grande espectro da apresentação clínica do dengue, a sua diferenciação de outras doenças febris era fundamental; então, em 1975 a OMS aprovou as primeiras diretrizes para o diagnóstico, onde um provável caso de dengue foi definido como uma doença febril aguda acompanhada de dois ou mais dos seguintes critérios: dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, erupção cutânea, manifestações hemorrágicas e leucopenia. Os quatro primeiros critérios são sintomas e, por definição, são relatados pelo paciente e não podem ser medidos diretamente pelo médico (Gutiérrez et al. 2013). Em 1997, a OMS fez a primeira classificação da doença sintomática em FD e FHD, e estabeleceu parâmetros de gravidade FHD e Síndrome do Choque do Dengue (SCD) (WHO 1997). Para a confirmação de caso de FHD seriam necessários 5 critérios (febre de no máximo 7 dias, exame específico positivo para dengue, plaquetopenia < 100.000mm<sup>3</sup>, extravasamento plasmático e manifestações hemorrágicas). Esta classificação foi baseada principalmente na experiência clínica dos países asiáticos. Contudo, os estudos adicionais revelaram a necessidade de parâmetros de gravidade alternativos mais específicos à realidade regionais (Harris et al. 2015).

Assim, com a pretensão de melhor identificar os casos graves que necessitariam de abordagem mais cuidadosa com internação hospitalar, a OMS, em 2009, organizou estudos adicionais que definissem parâmetros de gravidade (WHO 2009) com base nos resultados de estudo multicêntrico DENCO (Dengue control) realizado em pacientes de todas as faixas etárias do Sudeste Asiático e da América Latina.

A nova classificação, com maior aplicabilidade para definir os casos de dengue segue os seguintes critérios de gravidade da doença (Figura 1):

1) dengue sem sinais de alarme (DSSA), caracterizada por: náusea, vômito, erupções cutâneas, mialgia, cefaléia, artralgia, teste do torniquete positivo sem sinais de hemorragia e leucopenia com confirmação laboratorial;

2) dengue com sinais de alarme (DCSA), inclui: dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido,

letargia, agitação, hepatomegalia (aumento > 2 cm), elevação das transaminases hepáticas e diminuição na contagem de plaquetas;

3) dengue grave (DG), caracterizada por: extravasamento plasmático grave, podendo levar ao choque (SCD) e acumulação de fluído, acompanhado de desconforto respiratório; hemorragias graves e comprometimento de órgãos (lesão hepática, com níveis de aspartato aminotransferase (AST) ou alanina aminotransferase (ALT) >1000; insuficiência renal, cardiopatia, encefalite ou encefalopatia) (WHO 2009).

Essa nova classificação considerou, como critério para DG, além do extravasamento plasmático grave e da presença de hemorragia grave, a presença de comprometimento de órgãos, entre eles o coração. No texto publicado pela OMS, a miocardite está referida entre as manifestações cardíacas graves (WHO 2009). A incidência de miocardite entre os casos de DG, na maioria das áreas endêmicas, permanece desconhecida; podendo se manifestar inicialmente por arritmias cardíacas, o que pode levar a episódios de síncope e até mesmo a morte súbita (Nigam et al. 2015; WHO 2009).

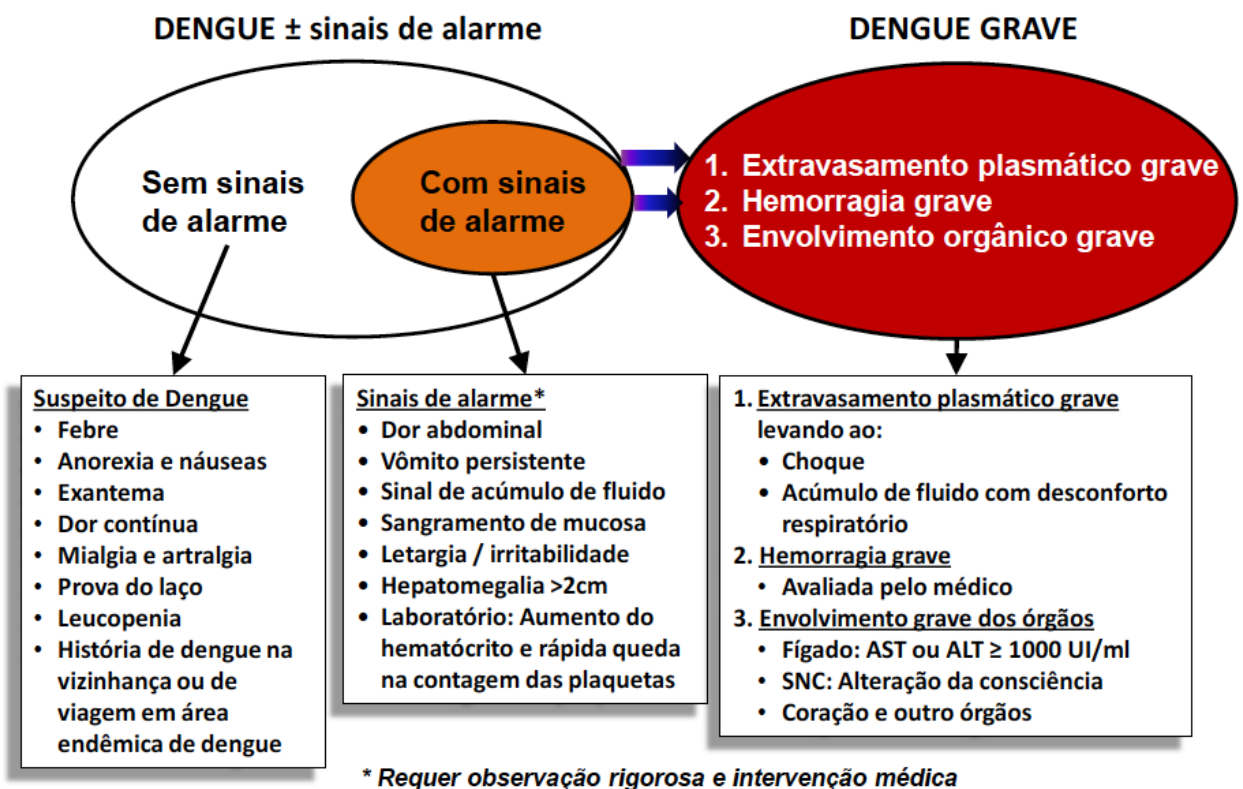


Figura 1 Classificação Clínica da Dengue. Figura adaptada do Manual de Dengue WHO, 2009.

À medida que a dengue se espalhou por todas as áreas tropicais, o perfil clínico-epidemiológico se diversificou de acordo com a idade, a etnia e o estado imunológico das populações afetadas. Desta forma, a aplicabilidade, complexidade e utilidade do Sistema de Classificação se tornou preocupante, devido a sua limitação na triagem e gerenciamento clínico dos casos (Alexander et al. 2011).

Nos anos seguintes, a nova proposta foi avaliada através de estudos multicêntricos (DENCO), nas mais diversas condições (em epidemias, sem epidemias, na atenção básica, em hospitais terciários, em ambulatórios e outros) e propondo uma classificação baseada em evidências que melhorariam a avaliação da gravidade clínica, bem como de possíveis sinais de alerta de progressão provável para doença grave (Alexander et al. 2011).

Diante dos achados científicos incontestáveis, com o intuito de evitar mortes por dengue, o Ministério da Saúde do Brasil apresentou uma ferramenta para lidar com casos de dengue, desde o nível primário em saúde até as unidades de maior complexidade. Assim, a partir de janeiro de 2014, adotou a nova classificação para os casos de dengue, baseando-se nas manifestações clínicas mais comuns da doença e tendo em conta alguns sinais de alarme que podem identificar os pacientes que evoluirão para uma forma grave da doença. As denominações dengue clássico, FHD (Grau I, II, III e IV), dengue com complicação (DCC) e SCD caíram em desuso, dando lugar às seguintes denominações: Dengue Sem Sinais de Alarme (DSSA), Dengue Com Sinais de Alarme (DCSA) e Dengue Grave (DG) (Brasil 2016).

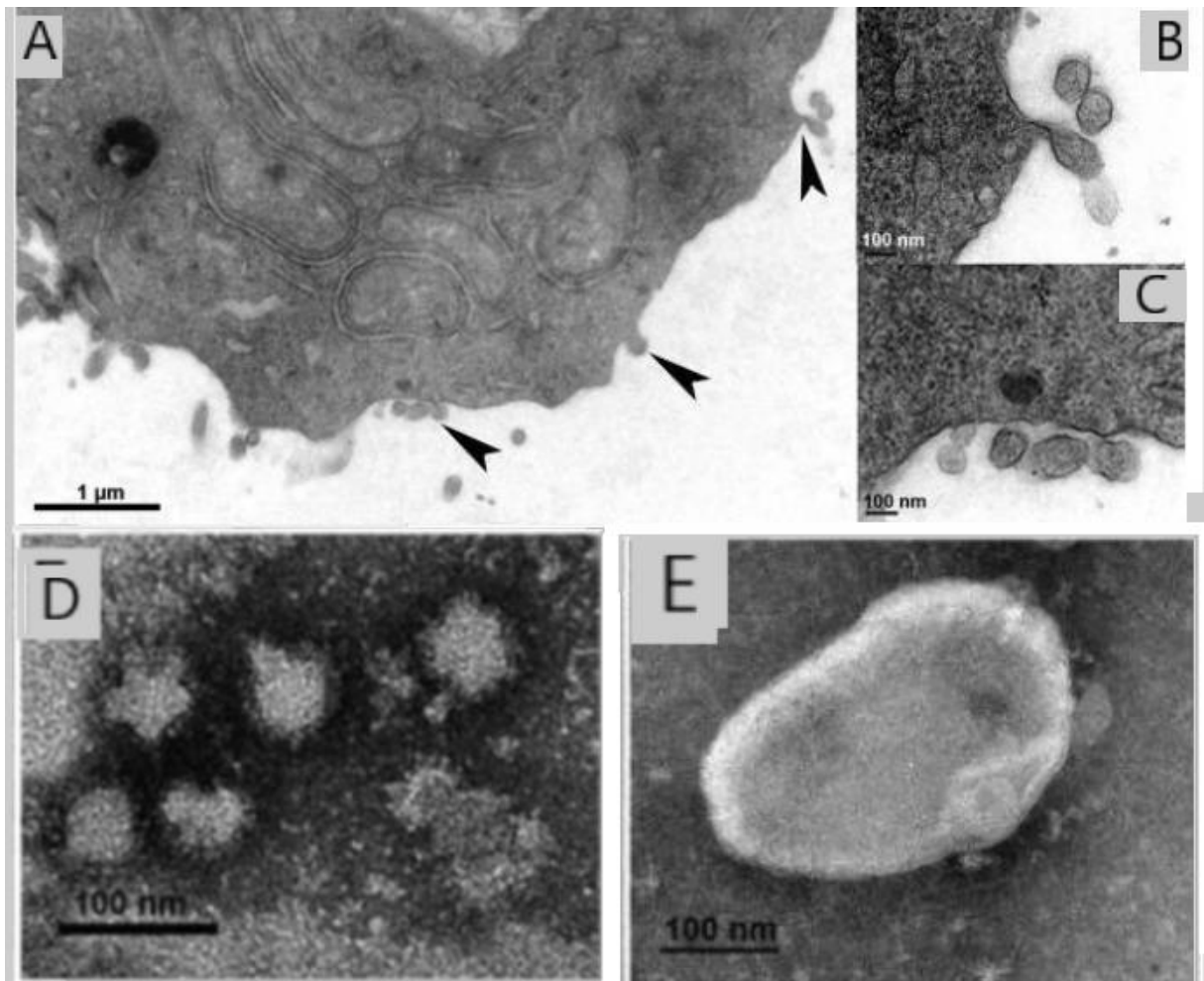
Considera-se caso suspeito de dengue pacientes que apresentam doença febril, usualmente entre dois e sete dias de duração, e que apresente duas ou mais das seguintes manifestações: náusea, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaleia, dor retro-orbital, petéquias, prova do laço positiva, leucopenia. Já os casos de DCSA são quando acompanhados de qualquer uma ou mais das seguintes alterações: dor abdominal intensa (referida ou à palpação) e contínua, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascite, derrame pleural, derrame pericárdico), hipotensão postural e/ou lipotimia, hepatomegalia maior do que 2 cm abaixo do rebordo costal, sangramento de mucosa, letargia e/ou irritabilidade ou aumento progressivo do hematócrito. Já

o DG se enquadra nos seguintes achados: extravasamento grave de plasma levando ao choque evidenciado por taquicardia; extremidades distais frias, pulso fraco e filiforme, enchimento capilar lento (>2 segundos), pressão arterial convergente (< 20 mm hg), taquipneia, oligúria (< 1,5 ml/kg/h), hipotensão arterial (fase tardia do choque), cianose (fase tardia do choque), acumulação de líquidos com insuficiência respiratória e sangramento grave ou comprometimento grave de órgãos (Brasil 2016).

Com a adoção da nova classificação não será possível comparar DG (nova classificação) com casos de FHD + DCC (classificação antiga), o que dificultará em muito o estudo de tendência entre os anos de transição da classificação.

### 1.3 O VÍRUS

O DENV é membro da família Flaviviridae, agrupado no gênero *Flavivirus*, que inclui vírus de importância médica transmitidos por artrópodes (febre amarela, vírus da encefalite japonesa) e circula sob a forma de quatro sorotipos antigenicamente distintos, chamados de DENV-1, -2, -3 e -4. Estudos em micrografia eletrônica demonstraram que os *vírions* apresentam uma superfície lisa e um diâmetro de aproximadamente 500Å, um núcleo eletrodenso rodeado por uma bicamada lipídica (Kuhn et al. 2002) (Figura 2).



**Figura 2** Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula HepG2 infectada por DENV. Pequenas vesículas de 80 a 200 nm de tamanho (pontas de seta) perto da periferia celular (A). (B e C) Vesículas em maior ampliação. (D) Microparticulas (MPs) em coloração negativa nas grades absorvidas por tampão. (E) Partícula de vírus purificada por densidade de sacarose. Fonte: Figura adaptada de Punyadee e colaboradores, 2015 (Punyadee et al. 2015).

No interior do núcleo capsídeo icosaédrico, encontra-se o material genético viral, composto por uma fita simples de RNA polaridade positiva, contendo 10.700 nucleotídeos (Figura 3). O genoma viral codifica proteínas estruturais e não estruturais. Sendo três estruturais: capsídeo (C), membrana (M, transcrita como precursor prM) e a proteína de envelope (E). E sete não estruturais: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5, essenciais para a replicação viral (Kuhn et al. 2002) (Figura 4). É com base nas diferenças antigênicas da proteína E, que o DENV é classificado em quatro diferentes sorotipos: DENV 1,



2, 3 e 4 (Chuang et al. 2013). A proteína do capsídeo (C) está envolvida com a montagem do capsídeo ao redor do RNA viral (Modis et al. 2004).

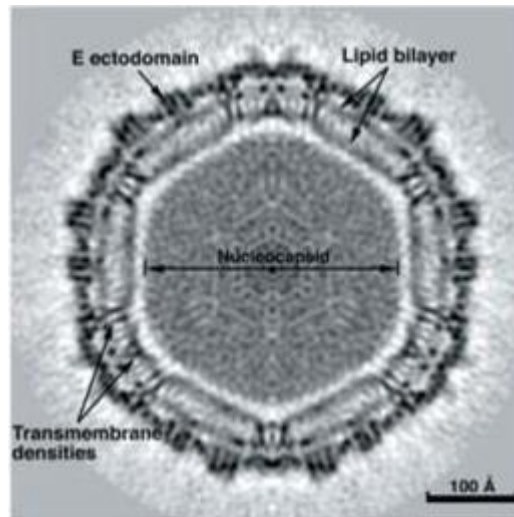


Figura 3: Estrutura do vírus dengue.

**(A) Corte longitudinal do vírus, mostrando o nucleocapsídeo icosaédrico e a membrana poligonal. As áreas escuras são proporcionais à densidade das moléculas por crio-microscopia eletrônica de partículas. Figura extraída de Zhang e colaboradores, 2003 (Zhang et al. 2003).**

As proteínas da membrana viral desempenham papéis críticos durante o ciclo de vida do vírus da dengue, particularmente durante a entrada em uma célula hospedeira. As duas proteínas da membrana do vírus da dengue, E e M, sofrem mudanças estruturais dramáticas desde a forma amadurecida e fusogênica do vírion e, novamente, no momento da infecção. Estas duas proteínas são expressas em uma poliproteína que é clivada para produzir o precursor de M (prM) e E. Em seguida, após a exposição ao pH neutro do retículo endoplasmático, prM se liga à proteína E para formar a forma "imitável spiky" do vírus (Zhang et al. 2013). O processo de maturação do vírus ocorre na rede trans-golgi e é guiada pela proteína E, que sofre modificações em pH baixo (5,8-6,0) no interior do lisossomo (Figura 3). A proteína E exposta na superfície viral é composta por três domínios (I, II e III) estando envolvida na interação com receptores celulares, fusão com a membrana da célula do hospedeiro, montagem da partícula viral e ainda apresenta determinantes antigênicos envolvidos na resposta imunológica, induzindo a produção de

anticorpos neutralizantes (Chen et al. 1996; He et al. 2016; Modis et al. 2004; Roehrig et al. 1998; Yu et al. 2008).

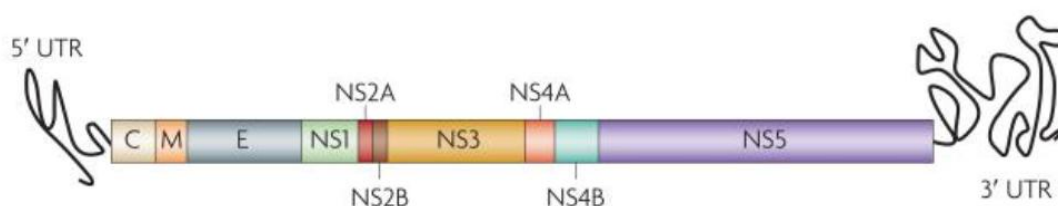


Figura 4 O genoma do vírus dengue.

**O Genoma viral codifica três proteínas estruturais C (cápsula), M (membrana) e E (glicoproteína de superfície) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).** Fonte: figura extraída de Guzman e colaboradores, 2010 (Guzman et al. 2010)

Dentre as proteínas não-estruturais (NS), a NS1 é glicoproteína, peso molecular de 46-55 kDa, dependendo do seu estado de glicosilação. Ela existe em duas diferentes formas: ancorada à membrana (mNS1) associada a organelas intracelulares ou secretada de células infectadas (sNS1), importante para a replicação viral. Estudo demonstrou que níveis plasmáticos elevados de NS1 eram mais frequentes nas formas mais graves do Dengue. O DENV NS1 maduro contém 352 resíduos de aminoácidos com dois sítios de glicosilação ligados a N nos resíduos 130 e 207 (Figura 4). Há 12 resíduos de cisteína em DENV NS1 que são absolutamente conservados entre todas as proteínas NS1 de flavivírus, indicando a importância das ligações dissulfureto na estrutura e função de NS1. O antígeno NS1 circula em pacientes com dengue desde o primeiro dia após o início da febre até o dia 9; com níveis séricos estimados entre 0,01 e 50 µg/ml, suas concentrações precoces no sangue estão positivamente associadas à gravidade da doença. Portanto, a detecção de antígeno DENV NS1, presente na circulação de pacientes infectados, é usada com sucesso para o diagnóstico precoce da infecção por DENV (Avirutnan et al. 2006; Chuang et al. 2013; Kao et al. 2005). Considerado imunógeno candidato à inclusão para estratégia vacinal.

A NS2A, NS4A e NS4B parecem funcionar como antagonistas da transdução de sinais do IFN do tipo 1, citocina envolvida no controle de infecções virais (Jones et al. 2005). NS2B é uma proteína associada à membrana que funciona como cofator para a ativação da protease NS3 (Erbel

et al. 2006). NS3 é uma proteína multifuncional que possui atividades enzimáticas envolvida na replicação do RNA (Gorbalenya et al. 1989; Li et al. 1999). Os domínios protease e helicase da proteína NS3 interagem com o hospedeiro estimulando a resposta imune celular. A proteína NS3 constitui o principal alvo de resposta imune mediada por linfócitos T CD4+ e CD8+ (Hurtado-Melgoza et al. 2016). NS4A está envolvida na replicação viral, promovendo sinalização através da região terminal-C para a translocação da NS4B no retículo endoplasmático, auxiliando a NS3 durante o processo de replicação do RNA viral (Miller et al. 2007; Umareddy 2006). A NS5 é uma proteína multifuncional bem conservada envolvida na síntese do RNA viral (Iglesias et al. 2011).

### ***1.3.1 Resposta Imunológica Durante a Infecção Pelo Denv.***

As respostas imunológicas inata e a adaptativa são importantes no controle da infecção pelo DENV. As primeiras células infectadas pelo DENV são as células dendríticas (dendritic cells-DCs) imaturas presentes na pele chamadas células de Langerhans. Durante o repasto sanguíneo pelo vetor, partículas virais são internalizadas pelas células de Langerhans iniciando a produção dos IFN tipo 1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) nos estágios iniciais da infecção (Wu et al. 2000). A ativação e maturação destas células é crucial na resposta antiviral; no entanto, também contribui para a propagação do DENV para outros tecidos (Castro-Mussot et al. 2013). Para se estabelecer, o DENV escapa da resposta imune inata induzida pelos IFN tipo 1. O mecanismo pelo qual o DENV bloqueia a produção de IFN tipo 1 ainda é pouco compreendido (He et al. 2016). No entanto, as proteínas NS2A, NS4A, NS4B e NS5 foram identificadas como potenciais antagonistas da via de sinalização dos interferons (Castro-Mussot et al. 2013). Anticorpos contra a proteína NS1 foram encontrados juntamente com a porção C3 do complemento nas mesmas células, indicando possível ativação do complemento por parte de imunocomplexos formados com a NS1 (Avirutnan et al. 2006).

As principais células alvo da infecção pelo DENV são monócitos e as DCs, membros da imunidade inata, mas também células apresentadoras de antígeno (APCs). As APCs tais como as DCs e macrófagos, são responsáveis pela indução da resposta adaptativa, tanto do tipo celular como humoral, que são altamente específicas, e necessitam de vários dias para se estabelecer (Castro-Mussot et al. 2013). Ambas respostas imunológicas inata e adaptativa são ativadas nos pacientes infectados pelo DENV que resultam em múltiplas vias de ativação com produção de citocinas e intensa ativação celular (Rothman et al. 2014). Neste contexto, altos níveis de citocinas inflamatórias são encontrados na fase aguda tanto da FD como na FHD. Intensa ativação de células NK, monócitos e linfócitos T CD4 e CD8 são observados nos pacientes infectados. A expansão dos linfócitos TCD8 citotóxicos em resposta a infecção pelo DENV contribui na lesão de células não infectadas e desta forma contribui para o desenvolvimento da gravidade (Castro-Mussot et al. 2013).

Todos os quatro sorotipos do vírus demonstram tropismo para monócitos, macrófagos e DCs e causam síndromes clínicas semelhantes, incluindo dengue branda, FD e FHD. Embora seu nome sugira o contrário, a principal característica da FHD é o aumento da permeabilidade vascular, o que provoca uma excessiva perda de plasma que se manifesta como aumento do hematócrito (hemoconcentração) e derrames em espaços pleurais e peritoneais e pode resultar em choque com risco de vida (Rothman et al. 2014). Estudos in vitro e os estudos de autópsia sugerem que três sistemas de órgãos desempenham um papel importante na patogênese de FHD/SCD: o sistema imunológico, o hepático e as células endoteliais (CE) dos revestimentos dos vasos sanguíneos. Certamente, o tropismo tecidual e celular do DENV tem um importante impacto no resultado das infecções; contudo, a ausência de um modelo animal apropriado dificulta grandemente nossa compreensão do papel desempenhado por esse tropismo (Martina et al. 2009a).

O papel da resposta imune adaptativa durante a infecção pelo DENV e os vários mecanismos sugeridos no desenvolvimento das formas graves da dengue são bastante discutidos e diversas teorias foram postuladas. Mecanismos imunopatogênicos, fatores inerentes aos sorotipos além de aspectos relacionados tanto ao hospedeiro como ao vírus constituem alvos de pesquisas há mais de 50 anos, porém ainda não existe consenso acerca do mecanismo envolvido. Os principais mecanismos sugeridos para o desenvolvimento das formas graves da dengue são discutidos a seguir. Certamente a melhor compreensão da patogênese nos levará ao desenvolvimento de melhores terapias para o tratamento e prevenção.

### **1.3.2 A Virulência do DENV**

Os quatro sorotipos do vírus dengue variam em termos de patogenicidade e virulência e os estudos demonstram a associação dos sorotipos 2 e 3 com casos mais graves (Guzman and Isturiz, 2010). Neste contexto, o genótipo asiático do DENV-2 foi mais associado à FHD/SCD do que o genótipo americano (Leitmeyer et al. 1999; Watts et al. 1999). Além disso, alguns estudos relataram que certos genótipos e cepas dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 apresentam um maior potencial de epidemia e virulência (Mackenzie et al., 2004). A linhagem II do DENV-2 foi associada com maior gravidade dos casos no Brasil (Faria et al. 2013).

Estudos longitudinais prospectivos de pacientes na fase aguda da doença revelaram uma interação altamente dinâmica entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro demonstrando que os títulos máximos de viremia são coincidentes com o aparecimento de febre e outros sintomas clássicos de dengue. Uma correlação positiva entre os títulos de viremia e a gravidade da doença também foi demonstrada sugerindo que a alta carga viral nos pacientes teria papel num desfecho desfavorável.

No entanto, foi demonstrado parcela significativa de pacientes com altos níveis de viremia mas sem extravasamento de plasma. Essas observações sugeriram que elevada carga viral não é necessariamente suficiente para o desenvolvimento do extravasamento de plasma. No entanto, poderia atuar como um gatilho para outras respostas que levam diretamente ao aumento da permeabilidade vascular (Rothman et al. 2014).

### **1.3.3 Fatores ligados ao Hospedeiro**

É notória a diferença, entre os continentes, quando se estuda a gravidade da doença (Lan and Hirayama 2011; Loke et al. 2002; Martina et al. 2009a). Na Ásia, o risco de desenvolver doenças graves é maior em crianças infectadas pelo DENV (<15 anos) do que em adultos. Ao contrário, nas Américas, a população adulta é mais afetada e, também entre eles, encontram-se a maioria dos casos graves (Martina et al., 2009).

Com relação aos fatores genéticos, a evidência indireta da importância genética do hospedeiro foi derivada das epidemias cubanas de dengue, onde um risco reduzido de FHD / SCD foi observado naqueles com ascendência africana em comparação com aqueles com ascendência europeia. As observações cubanas coincidem com a baixa susceptibilidade à FHD relatada nas populações do Caribe Africano e Negro (Bäck and Lundkvist 2013).

Estudos com tipagem de alelos HLA de classe I foram realizados em populações etnicamente e geograficamente distintas, e as correlações positivas de vários alelos HLA de classe I com susceptibilidade a FHD foram encontradas. Uma frequência significativamente maior de alelos HLA classe I A \* 31 e B \* 15 foram encontrados em indivíduos cubanos com infecção sintomática por DENV em comparação com controles assintomáticos, que apresentaram uma frequência elevada de alelos HLA II DRB1 \* 07 e DRB1 \* 04. O DRB1 \* 04 também foi o alelo mais frequente associado à resistência à FHD nas populações mestiças mexicanas das Américas (Bäck and Lundkvist 2013).

### **1.3.4 Papel dos Anticorpos na infecção pelo DENV**

A infecção primária por um sorotipo DENV fornece imunidade vital a esse sorotipo, mas apenas imunidade a curto prazo aos outros sorotipos. Além disso, em contraste com uma infecção primária por DENV, a infecção por DENV heteróloga secundária aumenta o risco de FHD. Há dados na literatura que corroboram com a tese de que infecções secundárias por DENV são frequentemente relacionadas ao desenvolvimento de doença grave. Os anticorpos subneutralizantes das infecções anteriores não são capazes de remover o patógeno; em vez disso, eles ajudam o vírus a entrar em células imunes e outras através de receptores Fc, em um fenômeno chamado Facilitação dependente de anticorpo (ADE, sigla em inglês para *Antibody-dependent enhancement*). A ADE foi sugerida como um importante mecanismo responsável pela imunopatologia da dengue (Bäck and Lundkvist 2013).

As infecções secundárias também podem ser influenciadas pelo fenômeno de reação cruzada, os anticorpos anti-DENV podem reagir de forma cruzada às proteínas do hospedeiro e às células endoteliais, o que pode aumentar a disfunção endotelial observada em FHD / SCD. Existe uma boa evidência de que os anticorpos contra a proteína viral de superfície (E) reagem de forma cruzada com o plasminogênio, estando associados com sangramento na infecção aguda pelo DENV, e os anticorpos anti- NS1 do DENV reagem de forma cruzada com proteínas do hospedeiro e células endoteliais (Bäck and Lundkvist 2013; Londono-Renteria et al. 2017).

### **1.3.5 “Pecado Antigênico Original”**

Outro mecanismo bastante discutido e que poderia estar relacionado com a patogenia da dengue é o fenômeno conhecido como pecado antigênico original das células T. O "pecado antigênico original" durante as infecções secundárias é definido como o domínio de anticorpos reativos ou respostas de células T a um primeiro sorotipo DENV infectante (o "antígeno original") sobre o sorotipo infectante atual. Nas infecções agudas de DENV, as respostas das células de memória de reatividade cruzada foram associadas a gravidade. Assim, as respostas alteradas das células T durante infecções secundárias,

podem contribuir para a "tempestade de citocinas" e a imunopatogênese de FHD / SCD (Zompi and Harris 2013).

### **1.3.6 Teoria da produção desregulada de citocinas – “Tempestade de citocinas”**

O DENV infecta predominantemente e se replica dentro de células do sistema mononuclear fagocitário, incluindo monócitos, linfócitos, células de Kupffer e macrófagos alveolares, mas o vírus pode infectar os leucócitos do sangue periférico, fígado, baço, linfonodos, medula óssea, timo, coração, rins, estômago, pulmões e possivelmente o cérebro, sugerindo passagem pela barreira hematoencefálica (Martina et al. 2009a; Singhi et al. 2007).

Na reinfecção com um diferente sorotipo, a doença grave está ligada a altos níveis de replicação viral reforçada por anticorpos no início da doença, seguida por uma cascata de ativação de células T de memória e uma "tempestade" de citocinas inflamatórias e outros mediadores químicos. Estas citocinas podem atuar diretamente sobre células endoteliais vasculares, resultando em extravazamento de plasma. Estudos sobre a extensão da ativação de células T em crianças tailandesas com FHD / SCD indicaram que a doença grave está associada a frequência na de ativação de células T acompanhadas de apoptose maciça (Pang et al. 2007).

Embora uma imagem completa e detalhada ainda não tenha surgido, atualmente acredita-se que, após uma ativação maciça de células T de memória, uma cascata de citocinas inflamatórias ativam as células endoteliais vasculares. Este evento é o principal responsável pela criação de um efeito endotélico de "peneiração" que leva a extravazamento de fluidos e proteínas. Também foi verificado que existem concentrações mais elevadas de tais citocinas, liberadas principalmente por células T, monócitos / macrófagos e células endoteliais, no soro de pacientes com FHD/SCD, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucinas (IL-2, IL-6, IL-1 e IL-8). Essas descobertas foram apoiadas por estudos que analisaram amostras de pacientes com FHD/SCD no Vietnã (Pang et al. 2007) e no Brasil (Bozza et al. 2008).

Anticorpos contra antígenos DENV podem reagir com células endoteliais ativando-as e induzindo à secreção de quimiocinas e citocinas, resultando em



lesão tecidual e extravasamento plasmático. Diversos fatores estão envolvidos: citocinas (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL10, IL13, IL18, TGF $\beta$  e IFN- $\gamma$ ), óxido nítrico (Nitric Oxide-NO), VE-caderina, VEGF (Vascular Endothelia Growth Factor-VEGF), proteases triptase e quimase. Além disso, a lesão irreversível do endotélio parece ser mediada por indução de apoptose de endotélio, cérebro, fígado, intestino e pulmão, de casos fatais de FHD/SCD (Chakravarti and Kumaria 2006; Couvelard et al. 1999; Dewi et al. 2008; Dewi et al. 2004; Furuta et al. 2012; Limonta et al. 2007; Mustafa et al. 2001; Noisakran et al. 2009).

Estudos realizados em pacientes com dengue observaram que níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e CCL2/MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1, ligante do CCR2) estavam associados à plaquetopenia (Bozza et al. 2008). Níveis elevados de CCL2/MCP-1, que atrai monócitos e está fortemente envolvido na redução das junções oclusivas de células endoteliais vasculares, foram observados em pacientes com dengue grave (Lee et al. 2006). Chau e colaboradores mostraram que pacientes com choque apresentam níveis plasmáticos das quimiocinas CXCL10/IP-10 (proteína 10 induzida por interferon), CCL2/MCP-1 e CXCL9/MIG (monocina induzida por interferon gama) mais elevados do que os pacientes sem choque, com a exceção dos níveis de CCL5/RANTES (Chau et al. 2008). (Figura 5).

TNF- $\alpha$	FHD > normal FHD > FD = ODF > normal	IL-18	FHD > FD > normal
IL-2	FHD = FD > normal	IFN- $\gamma$	FHD > FD > ODF = normal
IL-6	FHD > normal	CCL2/MCP-1	FHD > FD > ODF = normal
IL-8	FHD = FD > normal FHD > FD > normal	CCL5/RANTES	FHD = FD < normal
IL-10	FHD > FD	sTNFR2	FHD > FD > normal
IL-12	FHD < FD	sIL-2R	FHD > FD > normal

Figura 5 Níveis de citocinas/quimiocinas e receptores solúveis em pacientes com Dengue, nas diferentes formas clínicas.

**Febre do Hemorrágica Dengue (FHD), Febre do Dengue (FD), pacientes com Outras Doenças Febris (ODF) e controles saudáveis (normal). Figura adaptada de Mathew e colaboradores, 2008 (Mathew and Rothman 2008).**

As dosagens de citocinas em amostras séricas e/ou plasmáticas em pacientes infectados com DENV mostraram padrões característicos de respostas durante o curso da infecção (Figura 6). As citocinas que foram induzidas durante a fase febril foram IFN-alfa, refletindo a ativação do sistema imune inato (Libraty et al. 2002). Num modelo de primatas não humanos, as células dendríticas plasmocitóides circulantes, que são potentes produtoras de IFN  $\alpha$ , aumentaram em número logo após a inoculação viral e persistiram aumentadas durante a fase virêmica (Pichyangkul et al. 2003). Recentemente, foi observada maior frequência de células dendríticas plasmocitóides circulantes nos pacientes com FD e altos níveis circulantes de IFN-alfa (Gandini et al. 2013; Torrentes-Carvalho et al. 2009).

Entre as citocinas, o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) foi destacado como um fator no choque e infecção séptica. O bloqueio do MIF aumentou a taxa de sobrevivência em um modelo de sepse. Recentemente, um nível elevado de MIF também foi observado durante infecções com vírus da dengue. O MIF pode ser segregado por uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, hepatócitos e células endoteliais, após a estimulação. Os níveis de MIF estão positivamente correlacionados com gravidade na infecção pelo DENV (Chen et al. 2015; Costa et al. 2013)..

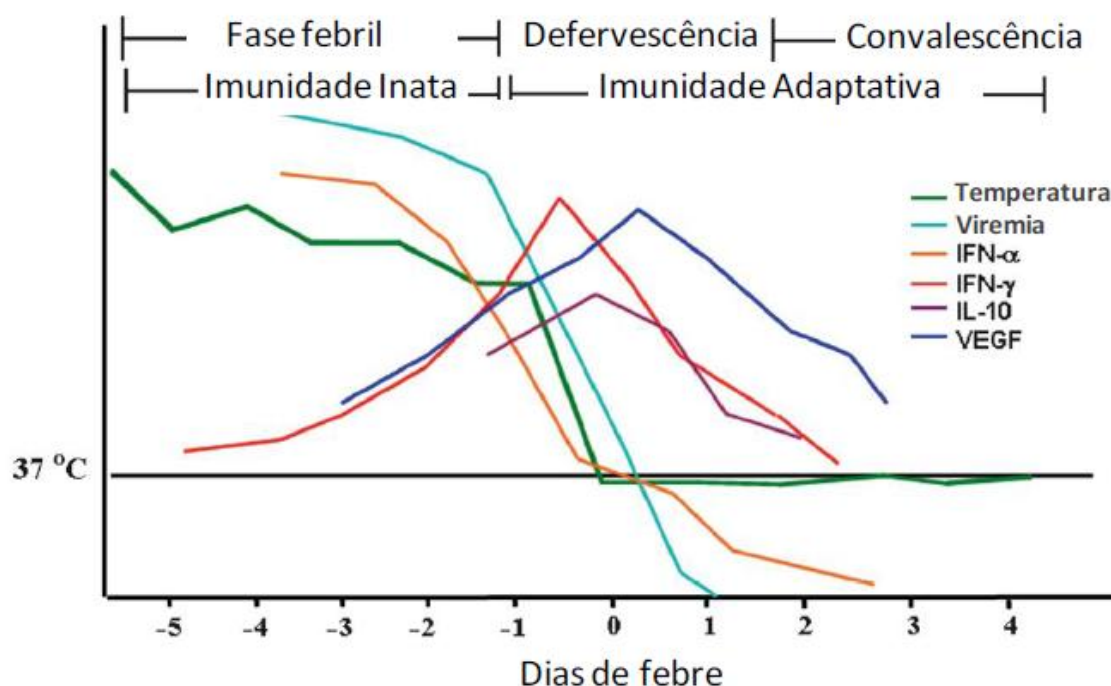


Figura 6 Modelo de secreção de citocinas durante a Dengue

**Temperatura e parâmetros imunológicos durante o curso da infecção pelo DENV. Dias de febre: -5 a -1, indicam o período da febre, dia 0 indica o início da defervescência e +1 a +4 são os dias após a defervescência. Sintomas graves da doença, como extravasamento plasmático, ocorrem normalmente no período da defervescência após o controle da viremia. Figura adaptada de Srikiatkachorn e Green, 2010 (Srikiatkachorn and Green 2010).**

### **1.3.7 Mimetismo Molecular**

Além do efeito da carga viral e dos diferentes genótipos e sorotipos virais, as respostas imunes anormais do hospedeiro após a infecção também podem explicar a progressão da FHD / SCD. Os anticorpos dirigidos contra a proteína não estrutural NS1 mostraram reatividade cruzada com plaquetas humanas e células endoteliais, que levaram ao dano nas plaquetas e endoteliais e à ativação inflamatória. Na verdade, a autoimunidade viral está envolvida na patogênese de numerosas infecções virais, como vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite C humana, citomegalovírus humano, vírus herpes simplex, vírus Epstein-Barr e DENV (Lin et al. 2006).

A proteína NS1, que é secretada no início da infecção por DENV, pode se ligar ao sulfato de heparano na superfície de uma grande variedade de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos, hepatócitos e algumas células endoteliais. A ligação de NS1 à superfície das células endoteliais pode induzir a ativação do complemento, o que pode contribuir para a patogênese do extravasamento vascular que ocorre em pacientes com FHD / DSS. A ligação de anticorpos anti-NS1 à NS1 ancorada na membrana também pode induzir transdução de sinal, levando a fosforilação de proteína tirosina que pode afetar a replicação DENV dentro de células infectadas.

Por outro lado, a proteína NS1 interage com as proteínas C4 e C4B do sistema complemento podendo levar a degradação de C4 que por sua vez pode proteger o DENV da lise dependente de complemento. Portanto, NS1 é um fator viral que pode aumentar a replicação do DENV e a evasão da resposta imune (Lin et al. 2006).

Estudos em camundongos e em pacientes com DENV mostraram que os autoanticorpos podem reagir de forma cruzada com as plaquetas. Estes anticorpos anti-plaquetas podem representar outro mecanismo possível pelo

qual o consumo de plaquetas é aumentado durante a infecção por DENV. Além disso, outros estudos relataram que os anticorpos anti-NS1 podem reagir de forma cruzada com diferentes moléculas e células relacionadas à coagulação, como plasminogênio humano, trombina, plaquetas e células endoteliais e que na fase crítica da DG os níveis de autoanticorpos antiplaquetários e os autoanticorpos anticélulas endoteliais são mais elevados do que na dengue sem sinais de alarme, coincidindo com aumento da permeabilidade vascular e a plaquetopenia (Figura 7). A IgM presente no soro de pacientes com DG mostrou maior reatividade cruzada com plaquetas e células endoteliais do que a IgG. Os anticorpos anti-NS1 são os principais responsáveis pela reatividade cruzada (Chuang et al. 2014). (Figura 7)

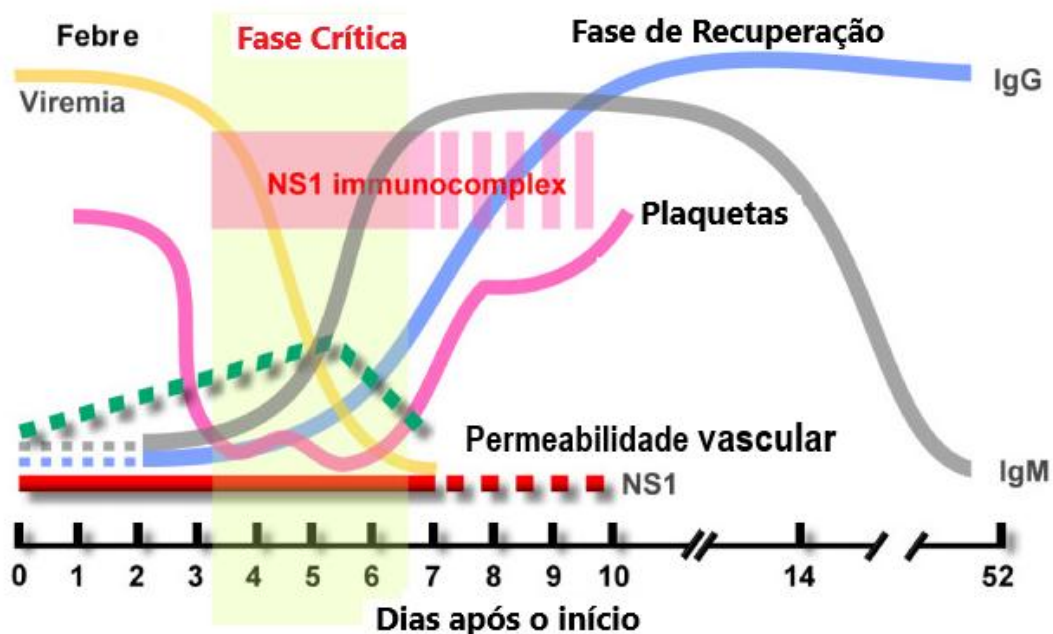


Figura 7 Viremia, resposta antígeno-anticorpo contra a proteína NS1 durante a infecção DENV. Demonstração esquemática da relação entre o extrazamento vascular, trombocitopenia, a cinética da viremia, a detecção NS1 e de anticorpos anti-DENV nos soros de pacientes com dengue durante a fase febril, fase crítica e fases de recuperação da doença. Fonte: Figura adaptada de Chuang e colaboradores, 2013 (Chuang et al. 2013).

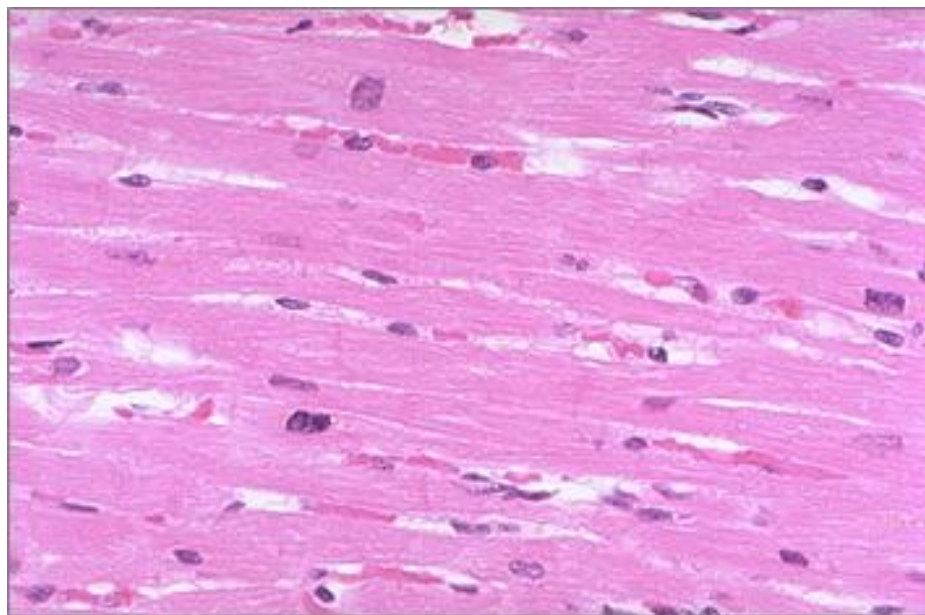
## 1.4 MIOCARDITE

### 1.4.1 Coração e Miocárdio

O coração é uma bomba muito eficiente que possibilita o suprimento constante de nutrientes aos tecidos e a excreção de produtos residuais. A

doença cardiovascular é a principal causa de morte no mundo, sendo sua maioria em países em desenvolvimento. Seu peso varia de acordo com a altura e peso corporal; nas mulheres o peso médio (250 a 300g) é menor do que nos homens (300 a 350g), sendo que o aumento do tamanho e peso cardíacos acompanham muitas formas de patologias (Abbas, A.K., Fausto, N, Kumar 2008).

Responsável pela função de bombeamento do coração, o músculo cardíaco, miocárdio, é composto principalmente de uma coleção especializada de células chamadas de cardiomiócitos, miócitos atriais e ventriculares (Abbas, A.K., Fausto, N, Kumar 2008). Essas células são alongadas e ramificadas, com estriações transversais e um ou dois núcleos localizados centralmente. Cada célula mede aproximadamente 15 $\mu$ m de diâmetro por 85 a 100  $\mu$ m de comprimento, circundadas por uma delicada bainha de tecido conjuntivo, que contém abundante rede de capilares sanguíneos, que se prendem por meio de junções intercelulares complexas. Uma característica exclusiva do músculo cardíaco são as linhas transversais fortemente coráveis que aparecem em intervalos irregulares ao longo da célula são os discos intercalares, são complexos juncionais, com aspecto de escada, encontrados na interface de células musculares adjacentes (Figura 8) (Junqueira, L. C.; Carneiro 2013).



**Figura 8** Tecido muscular cardíaco, mostrando miócitos normais (HE 400x) Fonte: o próprio autor.

Para que as células musculares cardíacas não se separem durante a atividade contrátil, elas são unidas por desmossomos. Do ponto de vista funcional, a passagem de íons permite que cadeias de células musculares cardíacas se comportem como se fossem um sincício, pois o sinal para a contração passa como uma onda de uma célula para a outra. Seu citoplasma é rico em proteínas contráteis, além de conter numerosas mitocôndrias, estas ocupam aproximadamente 40% do volume citoplasmático. O músculo cardíaco é capaz de armazenar ácidos graxos sob a forma de triglicerídeos em gotículas lipídicas no citoplasma dos miócitos. Há pequena quantidade de glicogênio, que fornece glicose quando há necessidade. Os miócitos podem apresentar grânulos de lipofuscina, localizados principalmente próximo às extremidades dos núcleos celulares. A lipofuscina é um pigmento de desgaste que aparece nas células que não se multiplicam e tem vida longa, como é o miócito (Junqueira, L. C.; Carneiro 2013).

#### **1.4.2 Definição e Classificações de Miocardite**

Sob a designação de miocardite está um grupo diverso de patologias, infecciosas e/ou inflamatórias que provocam lesão do miocárdio; o que as distingue principalmente da inflamação miocárdica secundária a fenômeno isquêmicos (Abbas, A.K., Fausto, N, Kumar 2008).

O termo é geralmente utilizado somente para inflamação difusa do miocárdio que resulta em sintomas, apesar de miocardite focal também ser descrita (Abbas, A.K., Fausto, N, Kumar 2008). Miocardite pode ser idiopática, causada por uma infecção específica, ou resultar de um distúrbio autoimune, ou ainda a combinação de mais de uma causa. Atualmente tem se utilizado também o termo cardiomiopatia inflamatória referindo-se à miocardite (Caforio et al. 2013)

Clinicamente a miocardite pode ser aguda (autolimitada), crônica ou em atividade persistente e fulminante. Na etiologia da miocardite aguda podemos ter uma vasta lista de vírus, bactérias, fungos, além de doenças do colágeno, vasculite, drogas e toxinas, no entanto, mais de 50% dos casos é idiopática, a miocardite aguda pode ser autolimitada, sem falência cardíaca, ou pode ter sinais de dano cardíaco e ainda evoluir para a miocardite fulminante (Caforio et

al. 2013). A miocardite fulminante é aquela de instalação rápida e caso não seja instituído um tratamento anti-inflamatório agressivo, causará falência cardíaca grave. Em geral é causada por infecções virais ou doenças autoimunes. Durante a fase ativa da miocardite, o coração pode parecer normal ou dilatado, podendo haver algum grau de hipertrofia a depender da duração da doença; se o paciente sobreviver à fase aguda, as lesões inflamatórias podem regredir sem ou com lesão residual (Abbas, A.K., Fausto, N, Kumar 2008). Há ainda uma outra forma clínica de miocardite caracterizada pelo desenvolvimento de fibrose e formação de células gigantes, inflamação crônica e necrose persistentes (Abbas, A.K., Fausto, N, Kumar 2008).

Quanto à etiologia a miocardite pode ser classificada como causada por agentes infecciosos, ou como miocardite imuno-mediada, como a que ocorre em doenças sistêmicas, ou ainda miocardite tóxica, em geral secundária a drogas, as principais causas estão resumidas na tabela 1 (Caforio et al. 2013). Contudo, mesmo sendo de causa infecciosa, a doença em curso poderá ser diretamente devido a presença do agente infeccioso no coração e/ou devido ao ataque imunopático (Rose 2016).



**Tabela 1 Principais causas de Miocardite / Cardiomiopatia Inflamatória**  
**Miocardite infecciosa**

<b>Bactéria</b>	<i>Staphylococcus, Streptococcus, Pneumococcus, Meningococcus, Gonococcus, Salmonella, Corynebacterium diphtheriae, Haemophilus influenzae, Mycobacterium (tuberculosis), Mycoplasma pneumoniae, Brucella</i>
<b>Espiroqueta</b>	<i>Borrelia</i> (Doença de Lyme), <i>Leptospira</i> (Doença de Weil)
<b>Fungo</b>	<i>Aspergillus, Actinomyces, Blastomyces, Candida, Coccidioides, Cryptococcus, Histoplasma, Mucormycoses, Nocardia, Sporothrix</i>
<b>Protozoário</b>	<i>Trypanosoma cruzi, Toxoplasma gondii, Entamoeba, Leishmania</i>
<b>Parasito</b>	<i>Trichinella spiralis, Echinococcus granulosus, Taenia solium</i>
<b>Rickettsia</b>	<i>Coxiella burnetii</i> (Q fever), <i>R. rickettsii</i> (Rocky Mountain spotted fever), <i>R. tsutsugamushi</i>
<b>Vírus</b>	Vírus <b>RNA</b> : <i>Coxsackievirus A e B, echovirus, poliovírus</i> , vírus da influenza A e B vi, vírus sincicial respiratório, vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus da rubéola, vírus da hepatites C, vírus <b>da dengue</b> , vírus da febre amarela, vírus da Chikungunya, vírus Junin, vírus da febre de Lassa, vírus da raiva, vírus da imunodeficiência humana -1 vírus <b>DNA</b> : <i>adenovirus, parvovirus B19, citomegalovirus, herpes virus-6 humano, vírus Epstein-Barr, herpes simples vírus, vírus varicela-zoster, vírus da varíola e vírus vaccinia</i>
<b>Miocardite imunomediada</b>	
<b>Alérgenos</b>	vacinaToxoide tetânico, doença do soro Drogas: penicilina, cefaclor, colchicina, furosemida, isoniazida, lidocaína, tetraciclina, sulfonamidas, fenitoína, fenilbutazona, Metildopa, diuréticos tiazídicos, amitriptilina
<b>Aloantígenos</b>	Rejeição a transplante cardíaco
<b>Autoantígenos</b>	Associado a distúrbios autoimunes ou imuno-mediados: lúpus eritematosos sistêmicos, artrite reumatóide, Síndrome de Churg-Strauss, doença de Kawasaki, doença inflamatória intestinal, esclerodermia, polimiosite, miastenia gravis, diabetes Mellitus insulino-dependente, tireotoxicose, sarcoidose, granulomatose de Wegener, doença cardíaca reumática (febre reumática).
<b>Miocardite tóxica</b>	
<b>Drogas</b>	Anfetaminas, antraciclina, cocaína, ciclofosfamida, etanol, fluorouracilo, lítio, catecolaminas, hemetina, interleucina-2, Trastuzumab, clozapina
<b>Metais pesados</b>	Cobre, ferro, chumbo (raro, mais comumente causam a acumulação intramiocitária)
<b>Miscelânea</b>	Picadas de escorpião, picadas de cobras e aranhas, picadas de abelhas e vespas, monóxido de carbono, inalantes, fósforo, arsénio,
<b>Agentes físicos</b>	Radiação e choque elétrico
<b>Miocardite Periparto</b>	Idiopática, pode ter uma etiologia infecciosa ou autoimune

Fonte: figura adaptada de Caforio et al., 2013 (Caforio et al. 2013)

Podemos ainda classificar a miocardite pelos achados histopatológicos, como miocardite linfocítica, sendo esse o padrão mais comumente encontrado. Nele há um predomínio do infiltrado inflamatório de linfócitos e histiócitos, podendo haver polimorfonucleares de permeio, acompanhado de necrose de miócitos; em geral está relacionada com as viroses e distúrbios autoimunes (Burke and Tavora 2011). Outro padrão é a miocardite por hipersensibilidade, onde tipicamente encontramos infiltrado eosinofílico, ocasionalmente acompanhado de necrose, ocorre como resposta alérgica a medicamentos (Burke and Tavora 2011; Burke et al. 1991). Podemos ter ainda a miocardite



tóxica onde encontramos necrose em banda de contração, vasculite, edema intracelular e infiltrado inflamatório misto, com predomínio de neutrófilos, linfócitos B e macrófagos (Burke and Tavora 2011). Temos ainda a miocardite de células gigantes e a sarcoidose cardíaca, elas compartilham os achados de inflamação granulomatosa, mas com diferenças nas apresentações clínicas e no curso da doença (Burke and Tavora 2011). A primeira é caracterizada por ser um processo inflamatório agressivo contra o miócito, enquanto a sarcoidose cardíaca representa um envolvimento cardíaco de uma doença primariamente sistêmica, que não tem o músculo cardíaco como seu principal alvo de destruição (Burke and Tavora 2011).

Para o diagnóstico de miocardite em 1986 foram propostos os critérios de Dallas que forneceram categorização histopatológica pela qual a miocardite poderia ser estabelecida. Pelos critérios de Dallas, miocardite requer infiltrado inflamatório associado a necrose não isquêmica de miócito, ou associado a degeneração celular representada por vacuolização ou ruptura de miócitos. A miocardite *borderline* requer um infiltrado inflamatório discreto e nenhuma evidência microscópica de necrose de miócitos. Esses critérios foram utilizados preferencialmente por patologistas americanos por cerca de dez anos. No entanto, a falta de padronização da amostragem, a variação na interpretação mesmo entre os especialistas, a discordância entre os achados morfológicos quando relacionados a outros marcadores de infecção viral e de ativação imune no coração, sugeriram que os critérios de Dallas isoladamente não eram mais suficientes para contemplar o diagnóstico de miocardite (Baughman 2006). Por esses motivos em 1995 foi então proposta pela WHO/ISFC (Richardson et al. 1996) uma nova classificação que utiliza critérios imunológicos e imunohistoquímicos para o diagnóstico de miocardite que incluem a presença no tecido cardíaco de mais de 14 leucócitos/mm<sup>2</sup>, incluindo 7 linfócitos T/mm<sup>2</sup> e até 4 monócitos/mm<sup>2</sup> (Basso et al. 2013; Caforio et al. 2015; Caforio et al. 2013).

### **1.4.3 Patogênese da Miocardite na Dengue**

Os mecanismos patogênicos subjacentes à insuficiência miocárdica ainda precisam ser elucidados, mas a maioria dos pacientes não tem evidência de doença miocárdica, a invasão viral direta de cardiomiócitos é improvável.

Outros mecanismos postulados incluem edema do miocárdio por extravasamento capilar local, presença de um fator inotrópico negativo circulante do miocárdio (por exemplo, um ou mais mediadores pró-inflamatórios), hipoperfusão coronária, pela vasodilatação, alteração da homeostase do cálcio, ou uma combinação desses fatores. Em contraste, na miocardite fulminante da dengue, existem evidências de necrose de miócitos com aumento substanciais nos níveis de biomarcadores cardíacos, alterações no segmento ST simulando o achado do eletrocardiograma (ECG) de infarto agudo do miocárdio, sintomas cardíacos específicos, e sinais claros de comprometimento funcional (Lee et al. 2009; Miranda et al. 2013a). Tal como a Miocardite fulminante de outras etiologias, a miocardite fulminante da dengue está associada à alta mortalidade (Kirawittaya et al. 2015; Ku and Yu 2016; Lee et al. 2010; Lin et al. 2015; Póvoa et al. 2014). Atualmente, a partir de dados disponíveis na literatura não é conhecido se graus leves de comprometimento do miocárdio observados em muitos pacientes com dengue são o resultado miocardite subclínica com casos fulminantes representando o pior desfecho deste espectro, ou se existem entidades patológicas distintas. Vários graus de lesão miocárdica ocorrem em resposta a uma série de mecanismos já mencionados como mostra a figura 9.

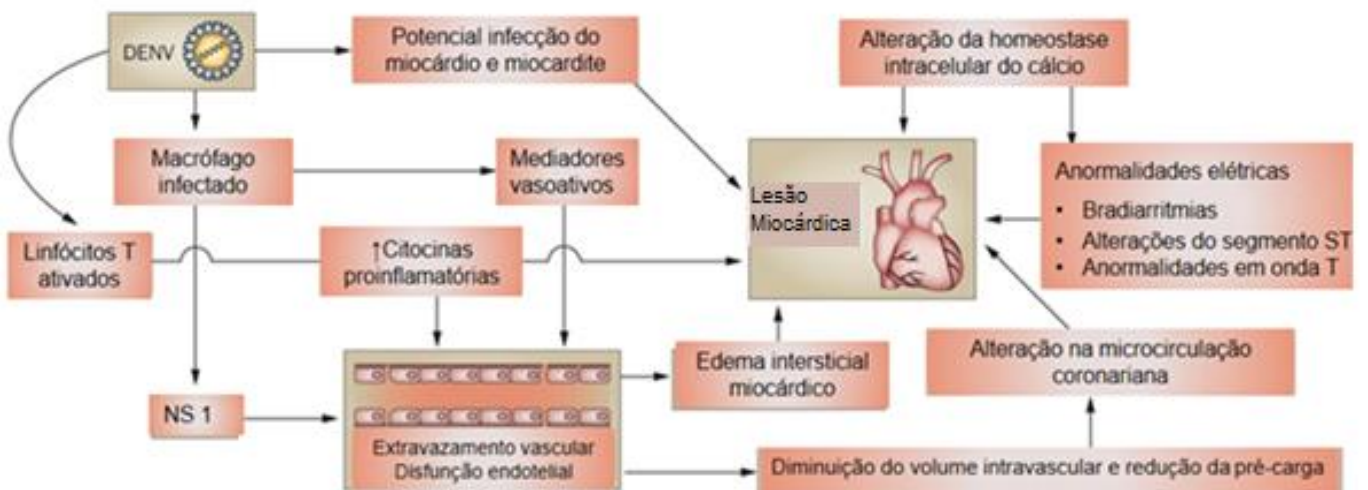


Figura 9 Possíveis mecanismos imunológicos e virais envolvidos nas manifestações cardíacas e vasculares da dengue. Fonte: figura adaptada de Yacoub e colaboradores, 2014 (Yacoub et al. 2014)

De acordo com os mecanismos propostos: o DENV é fagocitado por macrófagos com a ativação de células T resultante e liberação de substâncias vasoativas e pró-inflamatórias, citocinas responsáveis pelo extravasamento capilar e possivelmente também pelo comprometimento do miocárdio. A interação entre o NS1 e a camada de glicocálice do endotélio vascular potencializa o aumento da permeabilidade capilar (Yacoub et al. 2014). O plasma presente no interstício resultante desse extravasamento, pode contribuir para a disfunção cardíaca, levando à diminuição da pré-carga, alteração da microcirculação coronária e edema intersticial miocárdico. A alteração da homeostase do cálcio intracelular também foi demonstrada nos pacientes infectados (Yacoub et al. 2014).

A miocardite na dengue vem ganhando importância de forma expressiva pelo aumento das epidemias e o aparecimento da miocardite em formas graves da doença, mas há poucos trabalhos publicados (Bich et al. 2015; Byard 2016; Li et al. 2016; Yacoub et al. 2014). A prevalência dessa manifestação em pacientes com dengue ainda é incerta, com grande variação entre os poucos trabalhos publicados; em Belgaum, na Índia, revelou uma prevalência de 37,5% em casos graves de dengue hospitalizados, por outro lado, na Tailândia, pesquisadores falam que a miocardite se trata de manifestação rara (Arora and Patil 2016; Wiwanitkit 2006).

Ainda não está estabelecido se a susceptibilidade à miocardite está relacionada a algum sorotipo específico (Li et al. 2016). Pouco se conhece sobre as alterações histopatológicas e imuno-histoquímicas da miocardite em pacientes humanos com confirmação sorológica ou molecular da dengue (Shivanthan et al. 2015; Torres et al. 2013). A grande expressão dos resultados das pesquisas deu-se sem comprovação por biópsia endomiocárdica, padrão-ouro para o diagnóstico (Kindermann et al. 2012).

Os trabalhos apontam para uma associação da miocardite com casos graves da doença, o que ainda não está bem esclarecido. Contudo, o aprimoramento desses conhecimentos se apresenta como prioritário, pois podem indicar estratégias mais eficientes para o controle das elevadas taxas de mortalidade que encontramos em nosso país, incluindo mais adequada propedêutica e manejo dos paciente (Weerakoon et al. 2011).

Do ano de 1877, data do primeiro trabalho publicado sobre dengue no banco de dados da Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA (PUBMED), até 01 de junho de 2017, encontramos 17.401 publicações usando o descritor “dengue” e 18.003, quando o descritor foi “myocarditis” e, desses todos, apenas 76 tinham algo sobre miocardite e dengue. Com o descritor dengue no título, apenas 68 apresentavam alguma citação da miocardite. Trabalhos que falam especificamente sobre a miocardite na dengue, onde os dois descritores se encontram no título do trabalho, a busca no PUBMED só revelou 34 trabalhos.

Dos trabalhos que citam a dengue e o descritor autópsia (“autopsy”), só encontramos 59 trabalhos publicados. Quando o descritor dengue vai para o título, cai para 49 e se for algo mais específico, com os dois descritores (“dengue” e “myocarditis”) no título, encontramos apenas 2 (o mesmo com o termo “necropsy”).

## **1.5 JUSTIFICATIVA**

A incidência global de dengue cresceu drasticamente nas últimas décadas, no entanto o aumento no número de casos de dengue grave, que deveria ser uma minoria (5% ou menos), dentro de um universo de 40 milhões de casos sintomáticos, torna-se bastante preocupante (Castro et al. 2017; Shepard et al. 2016). No Brasil, por exemplo, entre 2000 e 2015, o número de casos aumentou 232,7% e a mortalidade, teve uma elevação de 639,0% (Araújo et al. 2017). Além disso, a dengue epidêmica, que ocorre ciclicamente a cada 3 a 5 anos, pode levar ao aumento da magnitude dos casos graves (Shepard et al. 2011). Com esse aumento dos casos, espera-se que mais manifestações inespecíficas ou incomuns levem à morte; dentre elas a miocardite (Bich et al. 2015; Byard 2016).

Nos últimos cinquenta anos, apesar das intensivas e extensas investigações, a patogênese da dengue ainda não é claramente compreendida e, só recentemente, as pesquisas vêm dando mais ênfase ao estudo do papel dos eventos intracelulares na patogênese da infecção (Jain et al. 2014). Especificamente em relação à miocardite, os estudos ainda são controversos a

respeito da sua prevalência entre os pacientes com dengue e estudos clínicos com pacientes graves sugerem que essa complicação não é rara (Li et al. 2016; Yacoub et al. 2014). Por outro lado, outros estudos enfatizam que a miocardite se trate de uma manifestação rara (Arora and Patil 2016; Wiwanitkit 2006). Fatores genéticos entre as populações são associados com casos graves e devem ser também considerados na miocardite, o que exigiria uma abordagem regional (Bäck and Lundkvist 2013; Martina et al. 2009a; Martina et al. 2009b). Também não está estabelecido se a susceptibilidade à miocardite está relacionada a algum sorotipo específico (Li et al. 2016). Pouco se conhece sobre as manifestações cardíacas na dengue, principalmente sobre a sua patogênese, bem como há apenas poucos relatos de caso sobre as alterações histopatológicas e imuno-histoquímicas em pacientes humanos com confirmação sorológica ou molecular da dengue (Póvoa et al. 2014; Shivanthan et al. 2015; Torres et al. 2013).

Embora milhares de pacientes infectados pelo DENV tenham sido notificados nos últimos 60 anos, apenas uma pequena parcela dos casos fatais fora submetidos à autópsia (Martina et al. 2009a). No Sudeste Asiático e nas Américas, por exemplo, a pesquisa histopatológica nos óbitos por DHF/DSS é difícil de ser realizada, principalmente em locais onde não há tecnologia de laboratório apropriada ou quando a autópsia não é aceita, devido a práticas culturais e religiosas (Martina et al. 2009a).

Sabe-se que o padrão ouro para o diagnóstico de miocardite atualmente é o estudo histopatológico e imuno-histoquímico, mas na sua maioria, as pesquisas têm se limitado à descrição de alterações clínicas compatíveis com miocardite, sem a comprovação por biópsia endomiocárdica (Kindermann et al. 2012). O desconhecimento da frequência da miocardite na dengue, podem levar a omissões gravíssimas na adequada propedêutica clínica. A taxa de mortalidade de pacientes com dengue grave não tratada ou inadequadamente tratada é altíssima, superior a 20%, o que impõe melhor conhecimento da miocardite na dengue grave (Aslam et al. 2016; Byard 2016; Li et al. 2016).

Em 2011, o Ministério da Saúde do Brasil, colocou entre as necessidades nacionais as pesquisas nessa área. Está bem claro na Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde que o país precisa aumentar a

produção de conhecimento nos estudos das manifestações não usuais da dengue nos seus diferentes aspectos: frequência, gravidade, fatores de risco (Brasil 2011). Também aponta a necessidade de avanço nos estudos da fisiopatogenia das condições graves dessa doença.

Assim, este trabalho se apresenta exatamente dentro das prioridades nacionais, contribuindo para a demonstração das alterações histopatológicas no miocárdio em casos fatais, comprovadamente infectados pelo DENV, o que poderá trazer mais subsídios para o entendimento da fisiopatologia da miocardite em pacientes graves. Também ajudará, através de novos conhecimentos epidemiológicos e patogênicos, na elaboração de protocolos mais adequados, o que colaborará para a eficiência e impacto das ações que são desenvolvidas a nível nacional e regional pelo Programa Nacional de Controle de Dengue.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a frequência da miocardite nos 117 casos fatais de dengue necropsiados no Serviço de Verificação de Óbitos através das alterações histopatológicas, imunológicas e inflamatórias.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Descrever as características demográficas, clínicas e laboratoriais de casos fatais de dengue nos anos de 2011 a 2013.
- Identificar e quantificar as alterações histopatológicas no miocárdio, incluindo edema, infiltrado inflamatório, necrose, fibrose e hemorragia, em pacientes com dengue necropsiados.
- Quantificar linfócitos T CD4+ e CD8+ e macrófagos presentes no infiltrado inflamatório no miocárdio.
- Relacionar a presença de linfócitos T CD4+ e CD8+ e macrófagos CD68+ entre os grupos com e sem miocardite.
- Avaliar possível correlação da miocardite com a presença das alterações histopatológicas, incluindo edema, infiltrado inflamatório, necrose, fibrose e hemorragia, em pacientes com dengue necropsiados;
- Identificar a frequência e a intensidade da expressão do marcador endotelial CD31 no tecido miocárdico dos casos estudados, correlacionando-a com os grupos com e sem miocardite.
- Descrever a frequência e a intensidade de apoptose nos miócitos, correlacionando-a com os grupos com e sem miocardite.
- Detectar e avaliar a expressão de antígenos virais das proteínas NS1 e NS3 no tecido cardíaco dos casos estudados.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho e período do estudo**

Foi realizado um estudo do tipo série de casos retrospectivo, de pacientes necropsiados no Serviço de Verificação de Óbitos Dr Rocha Furtado (SVO-Ce) no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013.

#### **3.2 População e amostra do estudo**

A população de estudo foram casos suspeitos de dengue que deram entrada no SVO-Ce no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013.

Os critérios de inclusão da amostra estudada:

- Paciente ter tido diagnóstico confirmado de dengue por um dos seguintes métodos; sorologia (ELISA), pesquisa do antígeno NS-1 e/ou isolamento viral no líquor (post-mortem), imuno-histoquímica para detecção do DENV no fígado ou por PCR nos tecidos a fresco.
- Paciente que foi submetido à necropsia.
- Paciente que mantinha no acervo de blocos de parafina do SVO-Ce, amostra de tecido cardíaco.

Os critérios de exclusão foram:

- Impossibilidade técnica de classificação imuno-histoquímica da miocardite, por desprendimento das microsecções das lâminas de TMA do caso em um dos imunomarcadores (CD4, CD8 ou CD68)
- Casos não confirmados por nenhuma das técnicas de diagnósticas utilizadas para dengue.

Amostra do estudo:

Entraram no critério de inclusão 117 pacientes necropsiados. Foram excluídos 4 casos por impossibilidade técnica de classificação imuno-



histoquímica de miocardite. Esta amostra representa 95% dos 123 óbitos por dengue identificados no SVO que tiveram diagnóstico confirmado, e que foram notificados ao Núcleo de Vigilância Epidemiológica do Estado do Ceará.

Os critérios utilizados para o diagnóstico de miocardite foram os critérios histológicos de Dallas, que se constitui como o infiltrado inflamatório no miocárdio associado a degeneração e necrose não isquêmica de cardiomiócitos (Aretz 1987; Aretz et al. 1987) e os critérios imuno-histoquímicos da WHO/ISFC, que consideram a presença no tecido cardíaco  $\geq 14$  leucócitos/mm<sup>2</sup>, incluindo 7 linfócitos T/mm<sup>2</sup> e/ou até 4 monócitos/mm<sup>2</sup> (Caforio et al. 2013).

### **3.3 Coleta de amostras de tecido, sangue e líquido.**

O material foi coletado durante o exame de necropsia, após pesagem e análise macroscópica do coração, sendo extraído com bisturi três fragmentos com volume de aproximadamente 1,0 X 1,0 X 0,5 cm, do ventrículo esquerdo. Dois dos fragmentos foram fixados em formalina a 10% e o outro foi mantido a fresco. Estes procedimentos foram realizados no SVO em Fortaleza. Um dos fragmentos fixados foi enviado ao Instituto Evandro Chagas (IEC-Belém – Pará) para pesquisa imuno-histoquímica de DENV. O segundo fragmento fixado em formalina permaneceu no SVO para análise histopatológica. O fragmento mantido a fresco foi enviado para o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN – Ceará) para realização de PCR para detecção de DENV. Durante o exame de necropsia foram coletados 10 ml de sangue total da artéria aorta. O sangue foi enviado para o LACEN – CE para realização de sorologias (ELISA) para detecção de anticorpos contra DENV. Foram coletados ainda 10 ml de líquido antes da extração do encéfalo, para pesquisa dos antígenos NS-1 e isolamento viral no LACEN- CE. (Figura 10)

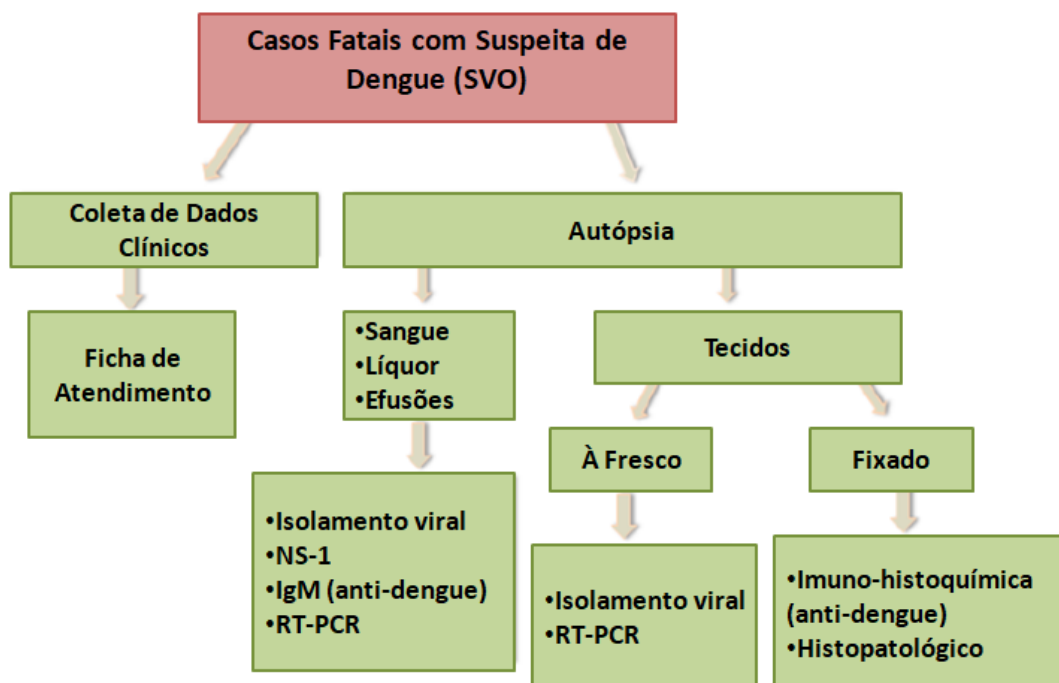


Figura 10 Desenho esquemático da sequência da obtenção das amostras e confirmação diagnóstica. Adaptado de Braga, 2014.

A coleta das amostras obedeceu ao protocolo de autorização de autópsia do Ministério da Saúde, onde recomenda-se que o procedimento ocorra em intervalo de até doze horas *post mortem*.

### 3.4 Confirmação do diagnóstico de dengue

Conforme o protocolo do Ministério da Saúde, adotado pela Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, o diagnóstico de dengue foi realizado pelo LACEN-Ce e pelo IEC-Pa.

As amostras foram encaminhadas ao (LACEN-CE) em até duas horas após a coleta, para realização dos testes diagnósticos.

As amostras de sangue, soro e líquido e os fragmentos de tecido a fresco foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. Os fragmentos foram macerados em 1,5mL de Leibovitz-15 médio (Sigma), pH 7,0-7,4 e 3% de penicilina de sódio / sulfato de estreptomicina. A suspensão foi centrifugada (10.000rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos). O sobrenadante obtido foi transferido para um criotubo esterilizado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser utilizado no RT-PCR.

### **3.4.1 Captura de anticorpos da classe IgM anti-DENV no sangue pela técnica ELISA**

Os anticorpos IgM foram detectados pela técnica imunoenzimática de captura de IgM, utilizando-se o kit ELISA-IgM anti-dengue® (PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália).

Em placa de 96 poços já sensibilizada com anti-IgM humana, foram adicionados 100µL da amostra diluída em diluente da amostra (10µL de soro em 1000µL do diluente da amostra diluído) e mesma diluição é aplicada para os controles e calibradores. Foi aplicado 100µL controles negativo, positivo e para os calibradores em seus respectivos poços. Logo em seguida, a placa foi incubada durante uma hora a 37°C.

Após a incubação, a placa foi lavada seis vezes com Tampão de Lavagem, logo em seguida foi adicionado 100µL do complexo antígeno-anticorpo monoclonal M conjugado (antígeno-MAb) em cada poço e incubado a 37°C durante uma hora. Foi adicionado, com uso de pipeta, 100µL do substrato TMB, em cada poço, incubado durante dez minutos à temperatura ambiente, onde formará uma coloração azul. Após esse tempo, foi adicionado 100µL da Solução para Interrupção da enzima, mudando de cor azul para amarelo. Após 30 minutos, foi realizada a leitura visual e em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 450 nm (Multiskan MCC, Thermo Electron Corporation) e títulos de IgM anti-DENV foram determinados, de acordo com o fabricante.

### **3.4.2 Isolamento viral a partir de amostras de sangue, soro, líquido e dos tecidos a fresco, com o objetivo identificar o sorotipo.**

A inoculação de soros de paciente na fase aguda e de macerado de tecidos a fresco infectados em cultura de células de mosquito *Ae. albopictus* clone C6/36 foi utilizado como método para o isolamento viral descrito por Igarashi (1978).

As células foram cultivadas em tubos de 1,5 x 16 cm contendo 2,0 ml de meio L-15 (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA), com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). Após a formação de monocamada, o meio foi substituído por igual volume de meio L-15 contendo 2% de SFB. Os soros diluídos 1/10 em meio L-15 foram inoculados em

alíquotas de 0,1ml na monocamada celular. Para cada grupo de amostras inoculadas, foram incluídos controles de vírus (C+) e de células (C-). Após inoculação, os tubos foram incubados à temperatura de 28°C e observados diariamente, por um período de dez a quatorze dias, em microscópio óptico invertido (Zeiss - Deutschland, Alemanha), com aumento de até 400 vezes.

As células inoculadas foram submetidas ao teste de imunofluorescência para identificação e/ou confirmação da presença do vírus, esta foi feita utilizando anticorpos monoclonais tipo-específicos para DENV-1 a 4 (Gubler et al. 1984).

Promoveu-se o descolamento das células inoculadas, com auxílio da pipeta Pasteur. Aproximadamente 0,025mL da suspensão celular foram colocados sobre um dos 10 círculos existentes nas lâminas de 26x76 mm (Biolab Merieux, New Zealand). A lâmina foi seca a temperatura ambiente durante a noite, sendo posteriormente fixadas em acetona P.A. (Merck, Darmstadt, Germany) por 20 minutos a -20°C e secas em temperatura ambiente.

No dia seguinte, inicialmente foram adicionados 20 µL dos “pools” de anticorpos monoclonais (dengue 1-4) ou, do inglês “mouse immune ascitic fluid” (MIAF) diluído 1:50 em PBS pH 7,5. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, em seguida, foi retirado o excesso de anticorpos, lavado duas vezes com PBS, pH7,2, e deixado secar em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 20 µL de anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC- Antibodies Incorporated, Davis, USA) diluído em 1:20 de preto de naftaleno 12B 0,1%, incubando em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, retirou-se o excesso do conjugado, lavando-se duas vezes com PBS, pH7,2, e deixou-se secar em temperatura ambiente. Em seguida, enxaguou-se rapidamente em água tipo II, para a montagem da lâmina com lamínula em glicerol tamponado, para observação em microscópio de imunofluorescência.

Para a tipagem viral, foram colocados 0,025mL da suspensão celular sobre um dos 10 círculos existentes nas lâminas de 26x76 mm (Biolab Merieux, New Zealand). A lâmina foi seca a temperatura ambiente durante a noite, no dia seguinte as lâminas foram fixadas em acetona P.A. (Merck, Darmstadt,

Germany) por 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em seguida foram secas em temperatura ambiente.

Foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  dos anticorpos monoclonais (diluído em PBS pH 7,5 - 1x concentrado) para os quatro sorotipos de dengue em orifícios distintos (Ex. monoclonal de DENV-1 no orifício 1; monoclonal de DENV-2 no orifício 2; e sucessivamente até o monoclonal de DENV-4. No orifício 5 pingou PBS pH 7,2 (1x concentrado) e no orifício 10 pingou o “pool” de monoclonais ou MIAF). As lâminas foram incubadas em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, em seguida, retirou o excesso de anticorpos, lavando duas vezes com PBS, pH7,2, e deixou secar em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC- Antibodies Incorporated, Davis, USA) diluído em 1:20 de preto de naftaleno 12B 0,1%, incubando em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, retirou o excesso do conjugado, lavando duas vezes com PBS, pH7,2, e deixou secar em temperatura ambiente. Em seguida, enxaguou-se rapidamente em água tipo II, para a montagem da lâmina com lamínula em glicerol tamponado, para posterior observação em microscópio de imunofluorescência.

### ***3.4.3 Detecção de antígenos virais (anti-DENV) pela imuno-histoquímica de tecidos.***

Confirmação do diagnóstico de dengue através de imuno-histoquímica pelo Instituto Evandro Chagas (IEC-PA), que realizou o estudo imuno-histoquímico em fígado fixado em formalina 10%, pela técnica estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina (SAAP), para amostras incluídas em parafina.

A técnica foi constituída, inicialmente, por cortes de tecido de aproximadamente de 3 a  $4\mu$  de espessura, com montagem em lâminas silanizadas. O bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu com leite desnatado a 10% em água destilada por 15 minutos. O bloqueio da fosfatase alcalina endógena foi realizado em solução de fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico e proteases 0.100g (11U/ml) por 20 minutos. Incubado com anticorpos primários policlonais anti-DENV-2 (produzidos em camundongos pelo Setor de Arboviroses do IEC-PA), por uma hora; seguida de lavagem em PBS por três vezes, durante três minutos cada. Aplicado o anticorpo secundário Vectastain (Peroxidase Mouse IgG PK-4002) por uma hora. Foi

lavado novamente por 3 vezes em PBS, por 3 minutos cada. Incubado com Estreptavidina - Biotina - Fosfatase alcalina (SAAP - 3 mg/2ml - e invitrogen) por uma hora. Após, a solução TRIS pH 7.4-7.6 foi permutada por 3 vezes, com duração de 3 minutos. Aplicado o revelador HistoMark RED Phosphatase System (Kirkegaard and Perry Labs Inc., Gaithersburg, MD) por uma hora, obedecendo a proteção da luz. Na contra-coloração foi utilizada com Hematoxilina de Harris. O antígeno viral foi identificado em citoplasma de células de Kupffer com imunoexpressão em rosa-fúcsia. Foram realizados controles negativo e positivo para cada grupo de amostras testadas.

#### ***3.4.4 Detecção de antígenos virais (NS1) pela técnica ELISA no sangue e/ou liquor.***

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

O teste utiliza anticorpo monoclonal anti-NS1 conjugado com peroxidase. Se o antígeno NS1 estiver presente na amostra, um complexo imune-MAb-NS1-MAb/peroxidase será formado. Para o uso, os reagentes e os espécimes clínicos deverão estar em temperatura ambiente (21-22°C). Adicionaram-se 100µL dos espécimes clínicos e controles diluídos em seus respectivos orifícios e estes foram incubados por 60 min a 37°C.

As placas foram lavadas 6 vezes e 100 µL do conjugado anti-NS1 MAb HRP foram adicionados em cada orifício. Após incubação por 60 min a 37°C, as placas foram lavadas 6 vezes. Cem microlitros do substrato (Tetrametilbenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram adicionados a cada orifício e as placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente em câmara escura. A presença de imunocomplexos é demonstrada pelo desenvolvimento de uma cor azul e a reação enzimática é interrompida pela adição de 100µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 1 M.

A densidade óptica (DO) foi obtida pela leitura em espectrofotômetro com filtro de 450-620nm e a quantidade de antígeno NS1 presente na amostra sérica foi determinada pela comparação do DO da amostra com a DO do controle.

O valor de corte corresponde ao valor médio das densidades ópticas dos três calibradores vezes o fator de calibração, fornecido pelo fabricante. Os resultados são expressos sob a seguinte forma, divide-se o valor da densidade óptica da amostra pelo valor de corte e em seguida multiplica-se por dez, onde obtém-se a unidade PanBio. Os resultados foram calculados como "unidades Panbio", com resultados  $<9,0$ ,  $9,0-11,0$ , e  $\geq 11,0$  definidos como negativo, inconclusivo e positivo, respectivamente. Amostras que inicialmente obtiveram resultado inconclusivo foram novamente testadas para confirmação do resultado.

### **3.4.5 Diagnóstico molecular feito pelo RT-PCR.**

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

Em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 560  $\mu$ L de Tampão de Lise AVL+ 5,6  $\mu$ L de Carrier/AVE; 140  $\mu$ L do soro ou do líquido. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 560  $\mu$ L de álcool etílico PA à 100% e a suspensão foi homogeneizada. 630  $\mu$ L da mistura foram transferidos para uma coluna previamente numerada. Após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído do tubo coletor foi desprezado. Novo tubo coletor foi colocado na coluna e os 630  $\mu$ L restantes da mistura foram transferidos para a coluna. Após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo coletor. Adicionou-se 500  $\mu$ L do Tampão de lavagem AW1 e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído foi descartado. Adicionou-se 500  $\mu$ L do Tampão de lavagem AW2 e após centrifugação por 3 minutos a 14000 rpm o eluído foi descartado. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e após centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm, a coluna foi transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml previamente identificado. Adicionou-se 60  $\mu$ L de Tampão de eluição (AVE) e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm a coluna foi descartada e o RNA a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Após a extração do RNA foi realizada a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase, para isto foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al. (1992) para detecção e tipagem dos DENV a partir dos espécimes clínicos. Este protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento “semi-nested”, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos em pares de base (pb) para cada sorotipo dos DENV. Em uma primeira etapa, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as seqüências dos genes C e prM. No procedimento nested, são utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente (Tabela 2). Os produtos obtidos após a amplificação por RT-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo, revelados em luz UV.

**Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue (Lanciotti et al. 1992).**

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

### 3.5 Análise macroscópica do coração

A análise macroscópica foi realizada utilizando o peso do coração, o único parâmetro que constava nos protocolos de necrópsia.

### 3.6 Análise histopatológica

Os fragmentos de tecido cardíaco após fixação em formol a 10% foram submetidos a processamento histológico e emblocados em parafina. A partir dos blocos foram realizadas micro secções em micrótomo com espessura de 5



micrômetros e corados pela hematoxilina e eosina (HE), para serem analisados sob microscopia de luz. Os parâmetros morfológicos avaliados foram hemorragia, edema, fibrose, necrose e infiltrado inflamatório intersticial. Os parâmetros hemorragia, edema, fibrose e necrose foram quantificados por histomorfometria (Gundersen et al. 1988) e para a avaliação e quantificação do infiltrado inflamatório foi utilizada a observação semiquantitativa.

Para o diagnóstico histopatológico de miocardite foi utilizado o critério de Dallas nas lâminas coradas pelo HE (Aretz 1987; Aretz et al. 1987) e o consenso da Sociedade Europeia de Cardiologia (WHO/ISFC) (Caforio et al. 2013) para a análise imunológica e imuno-histoquímica com os imunomarcadores CD4, CD8, CD68 e CD45, nas lâminas de TMA.

### **3.7 Microarranjos de tecidos (*tissue microarray*)**

Em virtude do tamanho da nossa amostra a técnica de “**microarranjos de tecidos**” (TMA, sigla em inglês para ***tissue microarray***), foi utilizada para a quantificação da expressão dos imunomarcadores. Esta técnica foi realizada no Laboratório Multiusuário no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

A partir das lâminas coradas pelo HE foram selecionadas cinco áreas de cada caso. A mesma área em correspondência à esta marcação foi identificada no cassete. Posteriormente cada uma dessas áreas foi extraída para serem utilizadas nos blocos de TMA (Figura 11). Inicialmente foram elaboradas quatro planilhas utilizando o programa *Microsoft Word* versão 2003, com 13 colunas e 12 linhas (Figura 13 e 14). Nas quatro primeiras células das primeiras linhas das planilhas foram dispostas amostras de um controle, sendo utilizado fragmentos de rim, em sequência foram destinadas cinco células para cada amostra, até a completa disposição das 117 amostras nas quatro planilhas. Estas planilhas foram utilizadas como referência para a realização dos quatro blocos/cassetes de TMA. Cada uma das 117 amostras de tecido miocárdico passou a ser representada por 5 *spots* de 1mm diâmetro cada, perfazendo um total de 3,925mm<sup>2</sup> de área analisada em cada amostra. As 117 amostras de tecido cardíaco foram então dispostas em 4 blocos/cassetes, dos

quais foram feitas as micro secções histológicas com espessura de 3 micrômetros e colocadas em lâminas silanizadas, a partir destas lâminas de TMA foram realizadas as imunomarcações histoquímicas e a técnica do TUNEL (Figura 12).

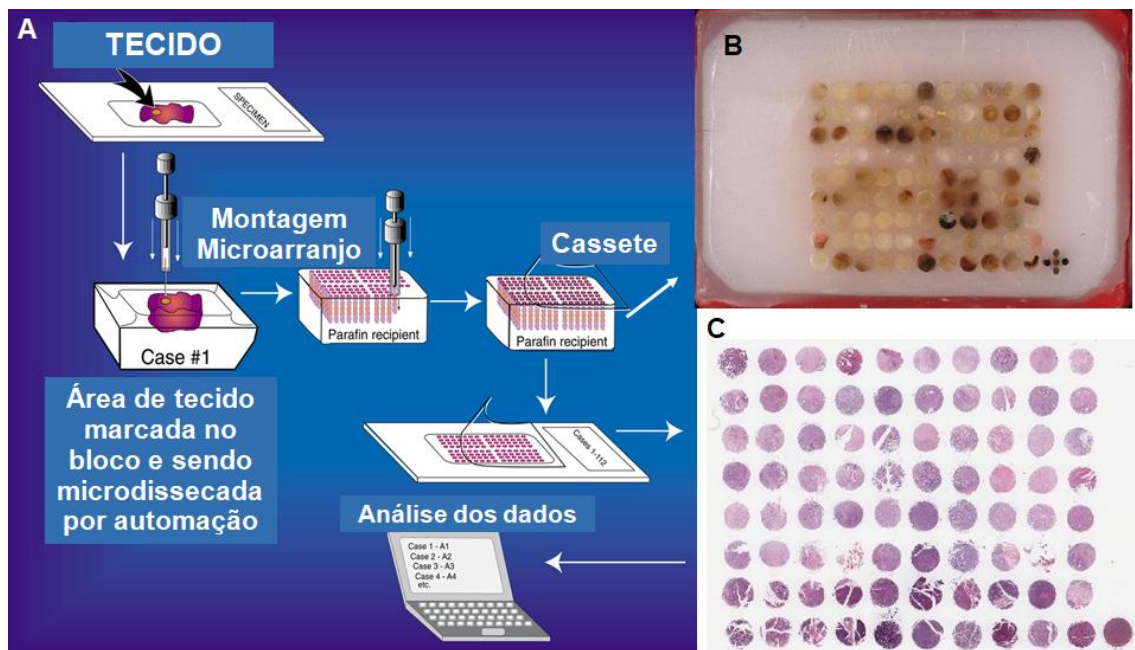


Figura 11 Desenho esquemático da obtenção do bloco de TMA (Adaptado do Blog: Pathology of John's Hopkins Medicine. A) Técnica de TMA B) Bloco de TMA C) Corte histológico do bloco de TMA

As lâminas foram examinadas por dois observadores e, quando houve divergência, as células CD 4+, CD8+, CD68+, CD45+ e as apoptóticas, marcadas pela técnica do TUNEL, foram novamente contadas numericamente em toda a área dos cinco spots, sendo o resultado final do total de células convertido em células/mm<sup>2</sup>.

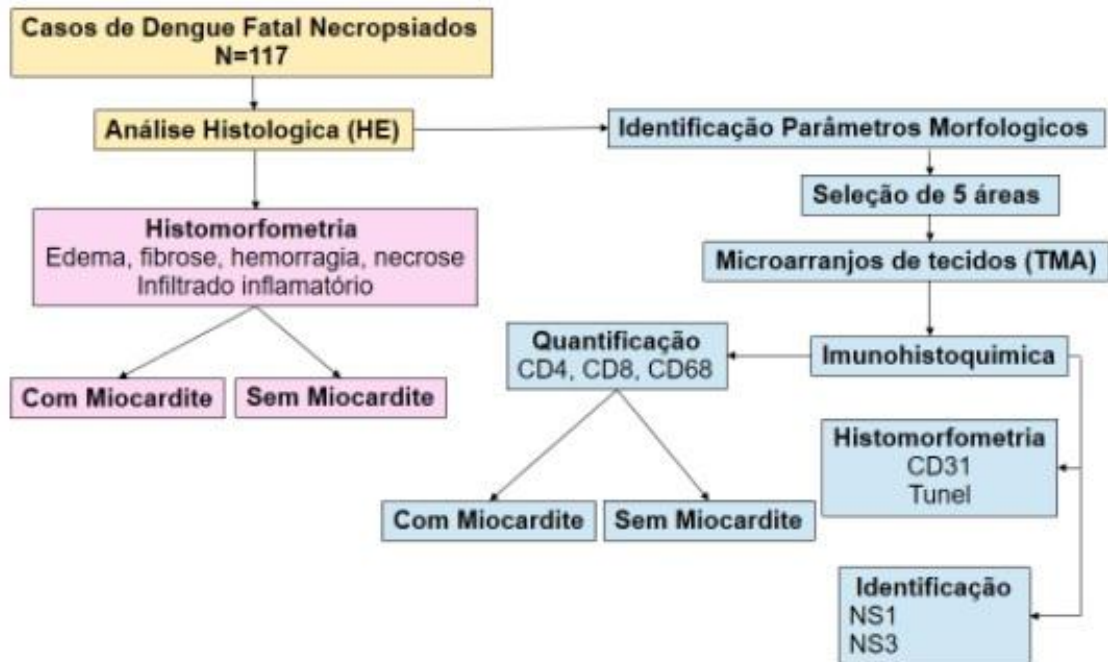


Figura 12 Desenho esquemático da sequência da realização da seleção das áreas para a realização do bloco de TMA e da leitura das lâminas após a e reações de IHQ e TUNEL.

Bloco 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	CONT	CONT	CONT	CONT	0095/11	0095/11	0095/11	0095/11	0095/11	0154/12	0154/12	0154/12	0154/12
2	0154/12	0243/12	0243/12	0243/12	0243/12	0243/12	0328/11	0328/11	0328/11	0328/11	0328/11	0331/11	0331/11
3	0331/11	0331/11	0331/11	0407/12	0407/12	0407/12	0407/12	0407/12	0529/11	0529/11	0529/11	0529/11	0529/11
4	0544/11	0544/11	0544/11	0544/11	0544/11	0555/12	0555/12	0555/12	0555/12	0555/12	0584/12	0584/12	0584/12
5	0584/12	0584/12	0661/12	0661/12	0661/12	0661/12	0661/12	0669/11	0669/11	0669/11	0669/11	0669/11	0684/12
6	0684/12	0684/12	0684/12	0684/12	0704/12	0704/12	0704/12	0704/12	0790/11	0790/11	0790/11	0790/11	0790/11
7	0790/11	0838/11	0838/11	0838/11	0838/11	0838/11	0843/11	0843/11	0843/11	0843/11	0843/11	0855/11	0855/11
8	0855/11	0855/11	0855/11	0876/11	0876/11	0876/11	0876/11	0876/11	0897/11	0897/11	0897/11	0897/11	0897/11
9	0910/11	0910/11	0910/11	0910/11	0910/11	0933/11	0933/11	0933/11	0933/11	0933/11	0941/11	0941/11	0941/11
10	0941/11	0941/11	0945/11	0945/11	0945/11	0945/11	0945/11	0956/11	0956/11	0956/11	0956/11	0956/11	0995/11
11	0995/11	0995/11	0995/11	0995/11	1014/12	1014/12	1014/12	1014/12	1014/12	1025/11	1025/11	1025/11	1025/11
12	1025/11	1067/11	1067/11	1067/11	1067/11	1067/11	1087/12	1087/12	1087/12	1087/12	1087/12		

Bloco 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	CONT	CONT	CONT	CONT	1090/12	1090/12	1090/12	1090/12	1090/12	1153/12	1153/12	1153/12	1153/12
2	1153/12	1154/11	1154/11	1154/11	1154/11	1154/11	1194/11	1194/11	1194/11	1194/11	1194/11	1205/11	1205/11
3	1205/11	1205/11	1205/11	1271/12	1271/12	1271/12	1271/12	1293/12	1293/12	1293/12	1293/12	1293/12	1293/12
4	1338/12	1338/12	1338/12	1338/12	1338/12	1343/12	1343/12	1343/12	1343/12	1343/12	1374/11	1374/11	1374/11
5	1374/11	1374/11	1386/11	1386/11	1386/11	1386/11	1386/11	1428/12	1428/12	1428/12	1428/12	1428/12	1494/11
6	1494/11	1494/11	1494/11	1494/11	1514/12	1514/12	1514/12	1514/12	1514/12	1515/12	1515/12	1515/12	1515/12
7	1515/12	1569/11	1569/11	1569/11	1569/11	1569/11	1584/12	1584/12	1584/12	1584/12	1584/12	1637/11	1637/11
8	1637/11	1637/11	1637/11	1690/11	1690/11	1690/11	1690/11	1690/11	1699/11	1699/11	1699/11	1699/11	1699/11
9	1711/11	1711/11	1711/11	1711/11	1711/11	1724/11	1724/11	1724/11	1724/11	1724/11	1724/11	1764/11	1764/11
10	1764/11	1764/11	1771/11	1771/11	1771/11	1771/11	1771/11	1773/12	1773/12	1773/12	1773/12	1773/12	1819/11
11	1819/11	1819/11	1819/11	1819/11	1863/12	1863/12	1863/12	1863/12	1865/11	1865/11	1865/11	1865/11	1865/11
12	1865/11	1896/11	1896/11	1896/11	1896/11	1896/11	1899/12	1899/12	1899/12	1899/12	1899/12		

Bloco 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	CONT	CONT	CONT	CONT	1978/12	1978/12	1978/12	1978/12	1978/12	2031/11	2031/11	2031/11	2031/11
2	2031/11	2060/12	2060/12	2060/12	2060/12	2060/12	2103/12	2103/12	2103/12	2103/12	2103/12	2117/12	2117/12
3	2117/12	2117/12	2117/12	2162/11	2162/11	2162/11	2162/11	2162/11	2207/12	2207/12	2207/12	2207/12	2207/12
4	2232/12	2232/12	2232/12	2232/12	2232/12	2262/12	2262/12	2262/12	2262/12	2262/12	2266/12	2266/12	2266/12
5	2266/12	2266/12	2353/11	2353/11	2353/11	2353/11	2353/11	2414/12	2414/12	2414/12	2414/12	2414/12	2476/12
6	2476/12	2476/12	2476/12	2476/12	2509/12	2509/12	2509/12	2509/12	2529/11	2529/11	2529/11	2529/11	2529/11
7	2529/11	2586/11	2586/11	2586/11	2586/11	2586/11	2625/12	2625/12	2625/12	2625/12	2625/12	2902/12	2902/12
8	2902/12	2902/12	2902/12	2914/12	2914/12	2914/12	2914/12	2914/12	2935/11	2935/11	2935/11	2935/11	2935/11
9	2943/11	2943/11	2943/11	2943/11	2943/11	3375/12	3375/12	3375/12	3375/12	3375/12	3406/12	3406/12	3406/12
10	3406/12	3406/12	3426/12	3426/12	3426/12	3426/12	3426/12	3441/12	3441/12	3441/12	3441/12	3441/12	3447/12
11	3447/12	3447/12	3447/12	3447/12	3593/11G	3593/11G	3593/11G	3593/11G	3593/11G	3593/11H	3593/11H	3593/11H	3593/11H
12	3593/11H	3870/12	3870/12	3870/12	3870/12	3870/12	3961/12	3961/12	3961/12	3961/12	3961/12		

Bloco 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	CONT	CONT	CONT	CONT	4009/11	4009/11	4009/11	4009/11	4009/11	4432/11	4432/11	4432/11	4432/11
2	4432/11	4570/11	4570/11	4570/11	4570/11	4570/11	4710/12	4710/12	4710/12	4710/12	4710/12	4828/11	4828/11
3	4828/11	4828/11	4828/11	5006/11	5006/11	5006/11	5006/11	5006/11	5082/11	5082/11	5082/11	5082/11	5082/11
4	5244/11	5244/11	5244/11	5244/11	5244/11	0943/12	0943/12	0943/12	0943/12	0943/12	0993/12	0993/12	0993/12
5	0993/12	0993/12	1149/12	1149/12	1149/12	1149/12	1149/12	1169/12	1169/12	1169/12	1169/12	1169/12	1544/13
6	1544/13	1544/13	1544/13	1544/13	1652/11	1652/11	1652/11	1652/11	1652/11	1685/11	1685/11	1685/11	1685/11
7	1685/11	1696/13	1696/13	1696/13	1696/13	1696/13	1776/12	1776/12	1776/12	1776/12	1776/12	1844/13	1844/13
8	1844/13	1844/13	1844/13	2064/13	2064/13	2064/13	2064/13	2064/13	2356/11	2356/11	2356/11	2356/11	2356/11
9	2562/11	2562/11	2562/11	2562/11	2562/11	2627/11	2627/11	2627/11	2627/11	2627/11	2738/12	2738/12	2738/12
10	2738/12	2738/12	2739/12	2739/12	2739/12	2739/12	2739/12	2756/13	2756/13	2756/13	2756/13	2756/13	3120/13
11	3120/13	3120/13	3120/13	3120/13	4703/13	4703/13	4703/13	4703/13	4703/13	5165/13	5165/13	5165/13	5165/13
12	5165/13												

Figura 13 Figura representativa das planilhas dos blocos de TMA.



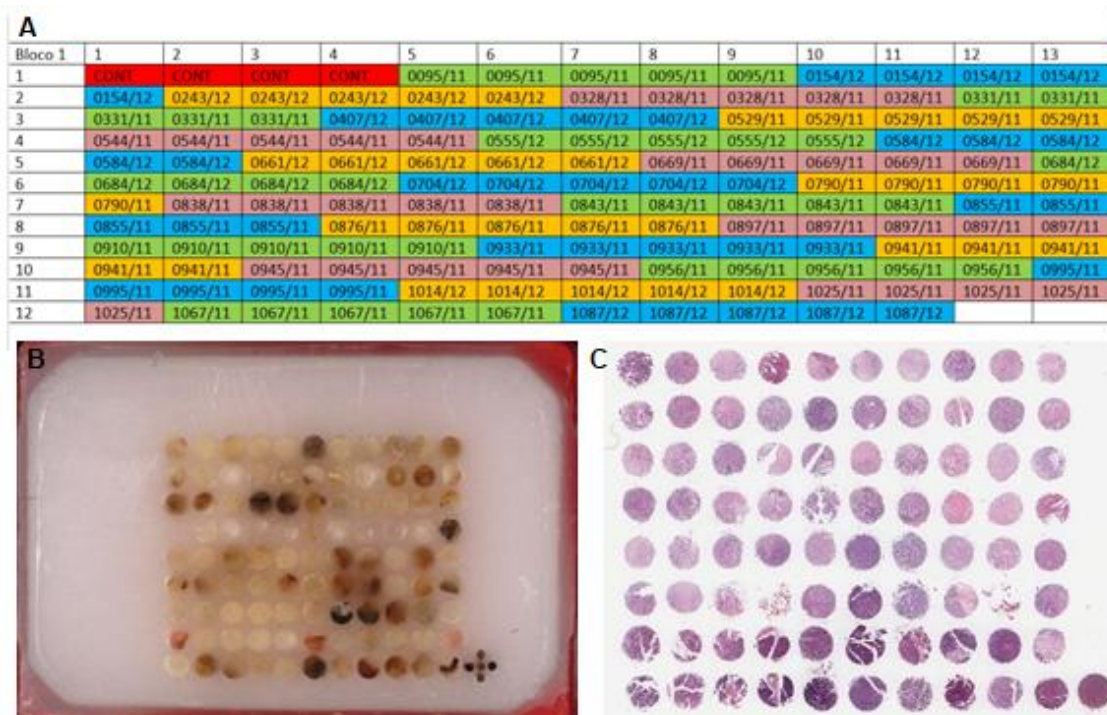


Figura 14 TMA. A. Planilha. B. Bloco. C. Lâmina

### 3.8 Técnica de imuno-histoquímica para identificação e quantificação dos marcadores CD4, CD8, CD68, CD31, NS1 e NS3

Nos blocos de TMA foram realizados cortes de aproximadamente de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de espessura, com montagem em lâminas silanizadas. Para todos os marcadores, a recuperação dos antígenos foi em alta temperatura, em panela de pressão Pascal (Dako) por 3 minutos a 121°C, sendo as lâminas colocadas em solução de citrato, pH 6.0. O bloqueio da peroxidase endógena foi em água oxigenada de 10 volumes a 3%, por 5 minutos, repetindo-se a operação por 4 vezes, e lavando-as com PBS ou TBS, por 3 minutos. O bloqueio de imunoglobulinas inespecíficas foi realizado pelo uso de ProteinBlock, marca Novocastra, ref.RE-7158 por 5 minutos. Foi feita incubação com os anticorpos primários relacionados abaixo:

- CD4 (OPD4), diluição:1:400, marca: Dako, cód M7310
- CD-8(C8/144B), diluição: 1:400, marca: Dako, cód M7103
- CD68 (Clone KP1), diluição:1:3200, marca: Dako, cód M0814
- CD31(Clone JC70A), diluição:1:1000, marca: Dako, cód M0823
- CD45 (clone PD7/26), diluição 1:2000, marca Dako, cód M701

- NS1 (Sigma - Aldrich, produzido a partir de coelho, 1mg/ml, ref. SAB 2700022) diluição: 1:200
- NS3, anticorpo *in house* policlonal anti-DENV-3 produzido em camundongo suíço, diluído 1:400

Em sequência, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com anticorpo secundário (polímero Novolink, marca Leica por 30 minutos a 37°C, nas duas etapas (pós primário e complexo), para os anticorpos CD4, CD8, CD31. Para o anticorpo CD68, utilizou-se o SuperEnhancer, marca Biogenex. Após lavagem com PBS ou TBS, por 3 vezes, as lâminas foram colocadas em solução com cromógeno (70 mg de DAB – diaminobenzidina) em 100 ml de tris-HCL PH 7.6 + 30 microlitros de água oxigenada 30 V. A contra-coloração foi realizada em hematoxilina de Harris. O controle negativo foi realizado para todos os anticorpos. A contagem das células CD45+ foi realizada nos casos em que as contagens de linfócitos T e macrófagos CD68+, juntas, não atingiam o número total de 14 leucócitos/mm<sup>2</sup>, com o objetivo de validar os critérios imuno-histoquímicos de miocardite.

### **3.9 Identificação de Proteína não estrutural 1 (NS1) e Proteína não estrutural 3 (NS3) no tecido cardíaco através de imuno-histoquímica**

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

### **3.10 Detecção in situ de apoptose pela técnica *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (sigla em inglês TUNEL)**

Microsecções dos blocos de TMA de 4µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparanifinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 10 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool a 95% e um banho de álcool a 70%. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água destilada e em tampão fosfato pH 7,4 (PBS). O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada por proteinase K em temperatura ambiente por 30 min. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3% em metanol por 30 minutos a temperatura ambiente e após lavado abundantemente em água corrente, água destilada e PBS. As lâminas foram incubadas com 50 µl da mistura de reação TUNEL (5 µl da solução da enzima desoxinucleotidil-transferase terminal, +45 µl da solução tampão) por amostra em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos com 50 µl do conversor de peroxidase e posteriormente lavadas 3x em PBS em 3 minutos. Foi utilizado como cromógeno a diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, ocorreu a contra-coloração com verde de metila, para todos os casos.

### **3.11 Histomorfometria com retículo para quantificação das alterações morfológicas e da expressão da molécula CD31**

A histomorfometria foi realizada com um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular (Figura 15). Nós escolhemos fazer a medida utilizando a ocorrência dos eventos sob as retas.

A quantificação das alterações morfológicas como edema, hemorragia, necrose e fibrose foi feita pela contagem de retas que estavam sobre áreas que apresentavam as referidas alterações morfológicas, em 10 campos aleatórios

de 400X de aumento, após essa contagem foi calculada a média de eventos por campo, dividindo o valor da contagem por 10, em seguida com valor obtido, foi calculada a área percentual de um determinado evento a partir da seguinte fórmula: Área percentual do evento= (número de áreas do evento sob as retas por campo/50)\*100, o resultado obtido foi dado em percentual.

A pesquisa da imunomarcagem de células ou expressão de moléculas CD31 foi realizada pela contagem de células marcadas sob as retas em 10 campos aleatórios com aumento de 400X, onde o resultado encontrado foi inicialmente dividido por 10, obtendo-se o valor de células marcadas por campo e em percentual, ou seja, Área percentual = (Nº eventos sob as retas/50)\*100, o resultado obtido foi expresso em percentual.

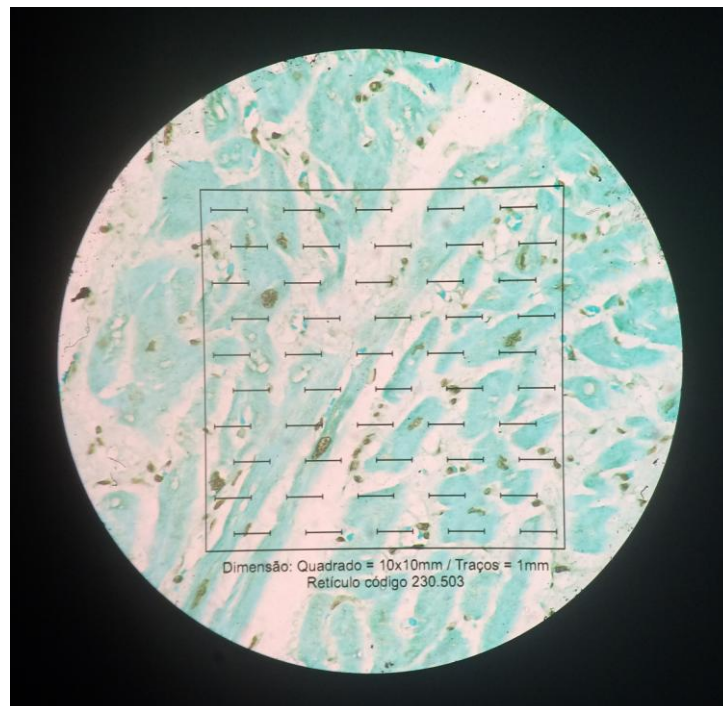


Figura 15 Microfotografia do retículo acoplado à ocular do microscópio ótico. Adaptado de Weibel ER. Stereological Methds. Vol1. Academic Press, INC. London, 1979.

### 3.12 Estratégia de análise de dados e variáveis do estudo

Foram descritas e comparadas as frequências de presença de hemorragia, edema, necrose e fibrose, dos grupos com e sem miocardite. Estas frequências foram comparadas com o teste exato de Fisher. A intensidade das alterações hemorragia, edema, necrose e fibrose nos grupos com e sem miocardite foi também comparada, através do teste de Mann-



Whitney. Nestas situações, trabalhou-se a hipótese de que o grupo de pacientes com miocardite era mais frequentemente e mais intensamente atingido com as alterações histopatológicas acima.

Foi comparada a intensidade da apoptose, expressa em células apoptóticas/mm<sup>2</sup> nos grupos com e sem miocardite. Esta comparação foi realizada através do teste Mann-Whitney. Da mesma forma, a quantidade de linfócitos T CD4, T CD8 e CD68, expressa em células/mm<sup>2</sup>, foi comparada entre os grupos, através do teste Mann-Whitney. A expressão da molécula CD31, quantificada em células endoteliais do miocárdio na unidade percentual/área de 10 campos de 400X foi comparada em pacientes com e sem miocardite. Neste caso, trabalhou-se com a hipótese de que este marcador seria expresso de forma mais intensa em pacientes com miocardite.

Desta forma, considerando como variável dependente a presença/ausência de miocardite, foi elencado o seguinte rol de variáveis independentes:

- a) Hemorragia: categórica (presença ou ausência) e contínua, em percentual de área atingido
- b) Edema: categórica (presença ou ausência) e contínua, em percentual de área atingido
- c) Necrose: categórica (presença ou ausência) e contínua, em percentual de área atingido
- d) Fibrose: categórica (presença ou ausência) e contínua, em percentual de área atingido
- e) Apoptose: contínua, em células apoptóticas/mm<sup>2</sup>
- f) Expressão de células T CD4: contínua, em mm<sup>2</sup>
- g) Expressão de células T CD8: contínua, em mm<sup>2</sup>
- h) Expressão de células CD68: contínua, em mm<sup>2</sup>
- i) O percentual da expressão de células CD31/mm<sup>2</sup>

A estratégia de análise incluiu ainda as variáveis idade, sexo, peso do coração e presença de comorbidades como hipertensão arterial, obesidade e diabetes mellitus.

Para averiguar as quantidades relativas dos diferentes tipos de leucócitos no tecido cardíaco, realizamos a análise da frequência diferencial das células

CD4, CD8 e CD68 presentes no tecido cardíaco dos casos com miocardite e sem miocardite. Para a análise estatística foi realizado o teste de Kruskal-Wallis utilizando o programa GraphPad Prism v.6.

### **3.13 Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Christus, local de trabalho de um dos coordenadores da pesquisa (protocolo 078/2011) (Anexo 1). E recebeu carta de anuência do Laboratório Central do Estado do Ceará (Anexo 2) e do Serviço de Verificação de Óbitos Dr Rocha Furtado (Anexo 3).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Descrição das características demográficas, clínicas e laboratoriais de todos os casos fatais de dengue nos anos de 2011 a 2013

#### 4.1.1 Diagnóstico laboratorial

Duzentos e vinte oito casos suspeitos de dengue foram autopsiados no SVO no período de anos 2011 à 2013 (Cavalcanti et al. 2016). A infecção pelo DENV foi confirmada laboratorialmente por técnicas imunológicas e moleculares (Tópico 3.3 Metodologia). Cento e dezessete casos fatais com diagnóstico positivo de infecção pelo dengue foram incluídos neste estudo.

Cinquenta e três por cento (62/117) dos casos foram confirmados por mais de um método. Conforme apresentado na Tabela 3, vinte e quatro casos (24/109, 29,1%) apresentaram anticorpos IgM conforme avaliado pelo MAC-ELISA. A detecção de antígeno viral NS-1 por ELISA no líquido ocorreu em 22,1% dos casos analisados. A infecção também foi confirmada através do isolamento viral em 23 casos (19,8%) enquanto que a detecção do RNA viral por RT-PCR confirmou 31,6% (37/117) dos casos. Cento e oito casos (93,1%) foram positivos através da técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal anti-DENV no tecido.

O teste que mais diagnosticou isoladamente foi a imuno-histoquímica com 36 casos positivos de 117 (30,7%). Três casos foram confirmados por todos os métodos utilizados. Apenas 2 casos foram confirmados por um único teste diagnóstico (detecção do IgM anti-DENV).

Em trinta e sete amostras os sorotipos virais foram identificados usando técnicas moleculares. Foram detectados os sorotipos de DENV-1 (16/117, 13,7%), DENV- 3 (3/117,2,5%) e DENV-4 (18/117,15,3%). Nenhuma das amostras testadas, foi positiva para o sorotipo DENV-2.

**Tabela 3 Diagnóstico Laboratorial de 117 casos fatais autopsiados no SVO 2011-2013, Ceará, Brasil.**

<b>Diagnostico laboratorial</b>	<b>Positivo/Testado (%)</b>
Dengue IgM ELISA	24/109 (22,1) <sup>a</sup>
Dengue NS1 ELISA	28/96 (29,1)
Isolamento viral	23/116 (19,8)
<b>RT-PCR</b>	
DENV-1 <sup>b</sup>	16 /117(13,7)
DENV-3	3 /117 (2,5)
DENV-4	19/117 (15,3)
Imuno-histoquimica <sup>c</sup>	108/116 (93,1)

a) número/total (%)

ELISA IgM ( Panbio Diagnostics) (Araujo et al. 2011)

ELISA NS1 (Panbio Diganostics) (Chen et al. 1991)

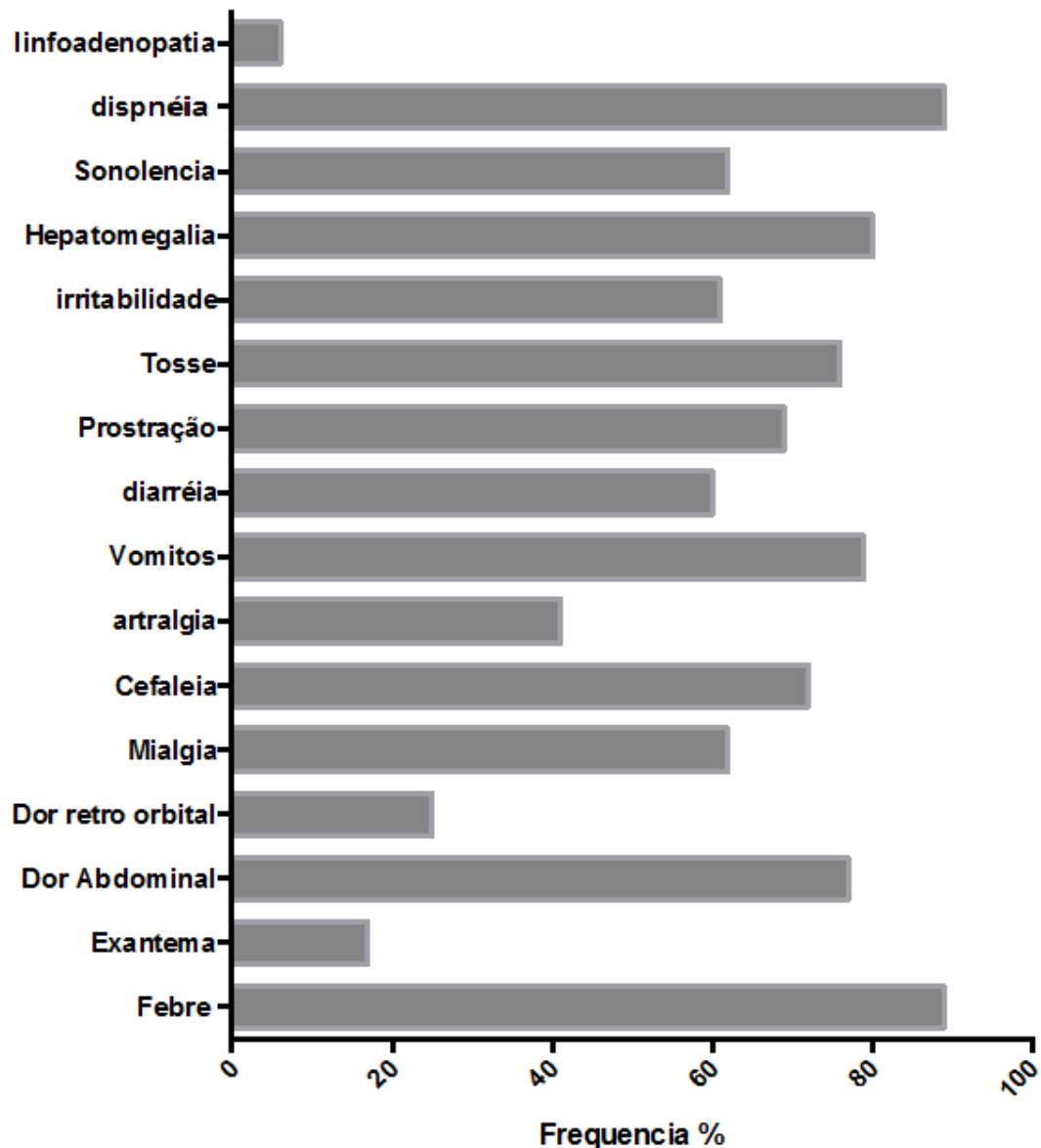
b) RT-PCR convencional (Lanciotti et al. 1992) e Real Time RT-PCR (Johnson et al. 2005).

Isolamento viral em células C6/36 e tipagem imunofluorescência por indireta (Gubler et al. 1984)

c) Imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal anti-DENV do tecido hepático.

Na avaliação dos dados demográficos houve predomínio do sexo masculino (59,8%; 70/117). Apesar do maior número de homens afetados, essa diferença não foi significativa. A análise da distribuição de casos positivos por faixa etária demonstrou que a faixa etária com maior número de casos confirmados foi a de 46-65 com 29% (34/117), seguida pelas faixas de 0-12 (20%; 24/117), 31-45 (20%; 24/117), 13-30 (17,9%; 21/117) e >64 (11,9%; 14/117).

Análise dos sinais e sintomas revelou que os pacientes estudados apresentaram sinais e sintomas característicos de infecção pelo dengue tais como febre (89%; 114/117), mialgia (62%; 72/117), dor retro orbitaria (25%; 29/117), artralgia (41,1%; 48/117), vômitos (79%; 92/117), diarreia (60%; 70/117) e prostração (69%). Além disso, alta frequência de tosse (76%; 88/117) e dispneia (89%; 114/117) foi observada conforme demonstrado na Figura 16.



**Figura 16 Principais Sinais e sintomas**  
**Sinais e sintomas de 117 casos fatais autopsiados com diagnóstico laboratorial confirmado de infecção pelo vírus dengue nos anos de 2011, 2012 e 2013, Ceará/CE.**

A classificação dos pacientes foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, Organização mundial de saúde (OMS), 1997(WHO 1997), que eram as classificações vigentes do período 2011-2013. Desta forma, 97/117 (82,9%) dos casos foram classificados como DCC e 20/117 (17,1%) como FHD. Em 2014, o Brasil passou a adotar a nova classificação revisada pela OMS em 2009. De acordo com a nova classificação, todos os casos foram classificados como Dengue Grave (DG).

Os sinais de alarme (WHO 2009) mais frequentes foram dor abdominal (77%), hepatomegalia (80,5%), sinais de acúmulo de líquido (54,2%) e irritabilidade (61,4%). As manifestações hemorrágicas identificadas foram: epistaxe (61%), hematoma (17%) equimose (23%) melena (17%) e hematemese (45%). Os sinais de acúmulo de líquido foram: ascite (23%), derrame pleural (47,1%), derrame cavitário (52,8%) e derrame pericárdico (34,3%). Foram também relatadas hemorragias graves (67,1%) tais como digestiva e pulmonar. Setenta e seis pacientes foram hospitalizados (76/109; 69,7%). Cinco pacientes (7,2%, 5/69) receberam hidratação venosa. Um caso fatal apresentou co-infecção com vírus H1N1.

Considerando os três anos estudados não foram observadas diferenças significativas em relação ao gênero e faixa etária. A maioria dos casos fatais originários dos anos 2011-2012 foram classificados como DCC [2011 (52/57, 91%), 2012 (45/52, 87%)]. Todos os pacientes analisados da epidemia de 2013 foram classificados como FHD [2013 (8/8,100%)]. Levando em consideração a nova classificação da OMS, todos os casos analisados foram classificados em DG (Tabela 4).

Considerando manifestações associadas a um risco de desfecho desfavorável, os pacientes originários da epidemia de 2011 apresentaram maior frequência de extravasamento plasmático comparados aqueles provenientes da epidemia de 2012 [2011 (38/53; 71%) vs 2012 (23/50; 46%),  $p= 0.0096$ ]. Além disso, os pacientes originários da epidemia de 2011 foram mais hospitalizados quando comparados aos pacientes originários da epidemia de 2012 [2011 (44/56; 78,5%) vs 2012 (26/48; 54,1%),  $p= 0,0116$ ]. Tabela 4.

Conforme demonstrado na Tabela 4, o sorotipo predominantemente detectado em 2011 foi o DENV-1, representando 66,0% (10/15) dos casos positivos, seguido do DENV-4 com 20,0% (3/15) e do DENV-3 com 13,0% (2/15). Em 2012, a predominância foi do sorotipo DENV-4 com 70,0% (14/20) dos casos positivos, enquanto o sorotipo DENV-1 representou 25,0% (5/20) e o sorotipo DENV-3 foi identificado em apenas 5% (1/20) dos casos. Já no ano de 2013, apenas os sorotipos DENV-1 e DENV-4 foram detectados (DENV-1 1/2, 50% e DENV-4 1/2, 50%).

Trinta e quatro pacientes apresentaram comorbidade (31,1%; 34/109). As comorbidades estavam presentes em 43,1% (19/44) dos casos originários da epidemia de 2011 e em 42,8% (15/35) dos casos originários da epidemia de 2012. As comorbidades levadas em consideração foram o diabetes mellitus, a obesidade e a hipertensão (Tabela 4).

**Tabela 4. Características demográficas, clínicas e laboratoriais de 117 casos fatais de dengue autopsiados no SVO nos anos de 2011, 2012 e 2013.**

<b>Ano</b>	<b>2011 n=57</b>	<b>2012 n=52</b>	<b>2013 n=8</b>
<b>Gênero</b>			
Feminino	22 (39,0%)	22 (42,3%)	3 (38,0 %)
Masculino	35 (61,0%)	30 (57,6%)	5 (63,0 %)
<b>Faixa etária</b>			
0-12	15 (26,0%)	9 (17,0%)	0 (0)
13-30	11 (19,0%)	9 (17,0%)	1 (13,0%)
31-45	12 (21,0 %)	10 (19,0%)	2 (25,0%)
46-65	16 (28,0%)	13 (25,0%)	5 (63,0%)
>65	3 (05,0%)	11 (21,0%)	0 (0)
<b>Classificação dengue</b>			
Dengue com complicações- DCC	52 (91,0%)	45 (87,0%)	0 (0)
Febre Hemorrágica do Dengue FHD OMS,1997	5 (8,7%)	7 (13,0%)	8 (100%)
Dengue grave, OMS 2009	57 (100%)	52 (100%)	8 (100%)
<b>Fatores associados à gravidade</b>			
Hospitalização	44/56 ( <b>78,5%</b> )	26/48 (54,1%)	-
Extravasamento vascular	38/53 ( <b>71,6%</b> )	23/50 (46,0%)	-
Hemorragias graves	30/43 (69,7%)	18/29 (62,0%)	-
Ascite	12/40 (30,0%)	11/20 (35,4%)	
Derrame pleural	20/42 (47,2%)	15/31 (48,3%)	
Derrame cavitário	19/40 (47,5%)	19/32 (59,3%)	
Derrame pericárdico	11/29 (37,9%)	13/31 (41,9%)	
<b>Sorotipo<sup>a</sup></b>			
DENV-1	10/15 (66,0%)	5/20 (25,0%)	1/2 (50,0%)
DENV-2	0	0	0
DENV-3	2/15 (13,3%)	1/20 (5,0%)	0
DENV-4	3/15 (20,0%)	14/20 (70,0%)	1/2 (50,0%)
<b>Comorbidade<sup>b</sup></b>			
	19 /44 (43,1%)	15/35 (42,8%)	-

a) Protocolos utilizados na tipagem dos sorotipos de dengue: RT-PCR convencional (Lanciotti et al. 1992) e Real Time RT-PCR (Johnson et al. 2005).

b) Comorbidades consideradas: Diabetes mellitus, obesidade e hipertensão



#### 4.1.2 Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Em relação aos parâmetros hematológicos observamos que os pacientes apresentaram baixas contagens de plaquetas (abaixo de  $100.000/\text{mm}^3$ ), considerado como plaquetopenia grave (WHO 1997). A mediana da contagem de leucócitos totais esteve dentro dos parâmetros de normalidade. O percentual do hematócrito revelou sua maior mediana no ano de 2012. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os casos fatais apresentaram níveis elevados de transaminases aspartato aminotransferase (AST) / transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e de alanina aminotransferase (ALT) / transaminase glutâmico pirúvica (TGP). Não foi observada diferença estaticamente significativa entre os casos fatais de 2011 e 2012, (Tabela 5).

Não foram obtidos dados de parâmetros hematológicos e bioquímicos de casos procedentes da epidemia de 2013.

**Tabela 5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos de casos fatais com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV autopsiados no SVO durante os anos 2011, 2012 e 2013.**

Ano	2011	2012	2013
Parâmetros	M (IC) <sup>a</sup>	M (IC)	M (IC)
Laboratoriais	N	n	N
Plaquetas x $10^3/\text{mm}^3$	87 (75,2-145,9) n=30	79,8 (76-170,6) n=26	63,4 (35,2-97,9) n=7
HT	36,5 (33,2-40,3) n=32	41,3 (37,8-43,7) n=14	- <sup>c</sup>
Leucócitos x $10^3/\text{mm}^3$	9500 (10154-15903) n=57	10490 (10921-20196) n=27	-
AST/TGO IU/L <sup>b</sup>	120 (179-588,5) n=37	117,5(54,4-947,3) n=12	-
ALT/TGP IU/L <sup>b</sup>	69,5 (68,7-695,5) n=36	107 (175,8-1197) n=11	-

a) M - mediana, intervalo de confiança (IC) 95%.

b) Aspartato aminotransferase (AST)/transaminase glutâmico oxalacética (TGO); alanina aminotransferase (ALT)/transaminase glutâmico pirúvica (TGP)

c) - Ignorado

#### 4.2 Miocardite: classificação e diagnóstico dos casos fatais

Após análises histológica e imuno-histoquímicas, utilizando os critérios histopatológicos de Dallas e os imuno-histoquímicos da WHO/ISFC (Caforio et al.

2013), 40.2% (47/117) dos casos fatais foram diagnosticados com miocardite. Setenta (59.2%) casos não apresentaram miocardite de acordo com as análises realizadas (Figura 17 e 18).

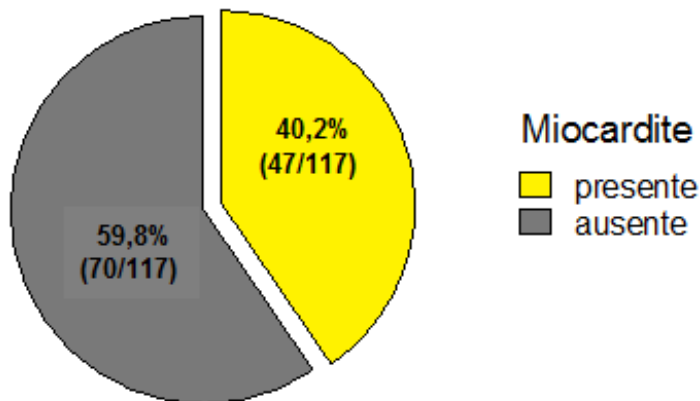


Figura 17 Frequência de miocardite nos casos fatais com diagnóstico laboratorial confirmado de infecção pelo DENV autopsiados no SVO.

**Análise histopatológica do tecido cardíaco de 117 casos foi feita através da contagem de células CD4, CD8, CD68 e CD45 marcadas por imunohistoquímica. Os casos foram agrupados de acordo com critério de Caforio e colaboradores (Caforio et al. 2013).**

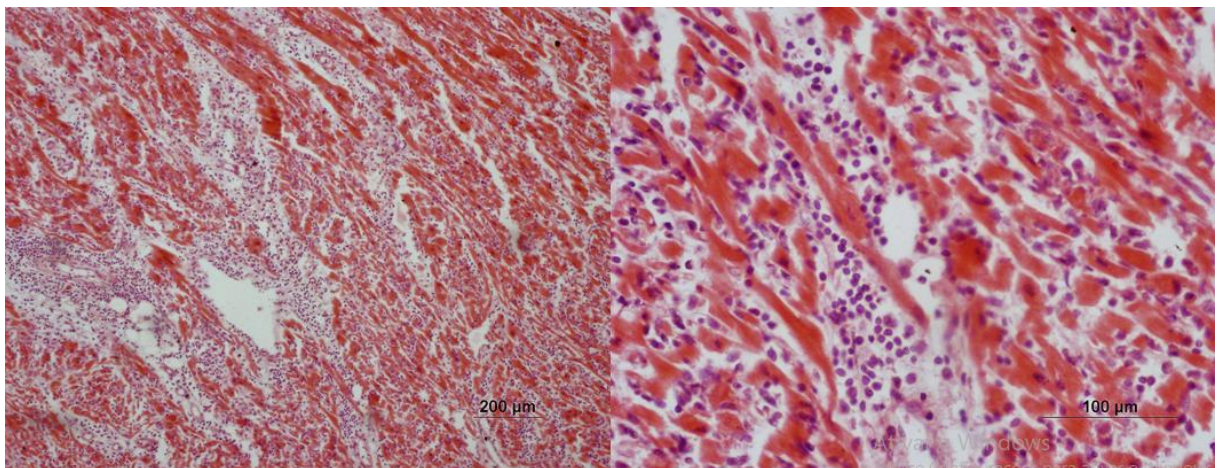


Figura 18 Figura representativa com identificação de infiltrado de células mononucleares no tecido cardíaco de casos fatais com diagnóstico positivo de infecção pelo DENV autopsiado no SVO.

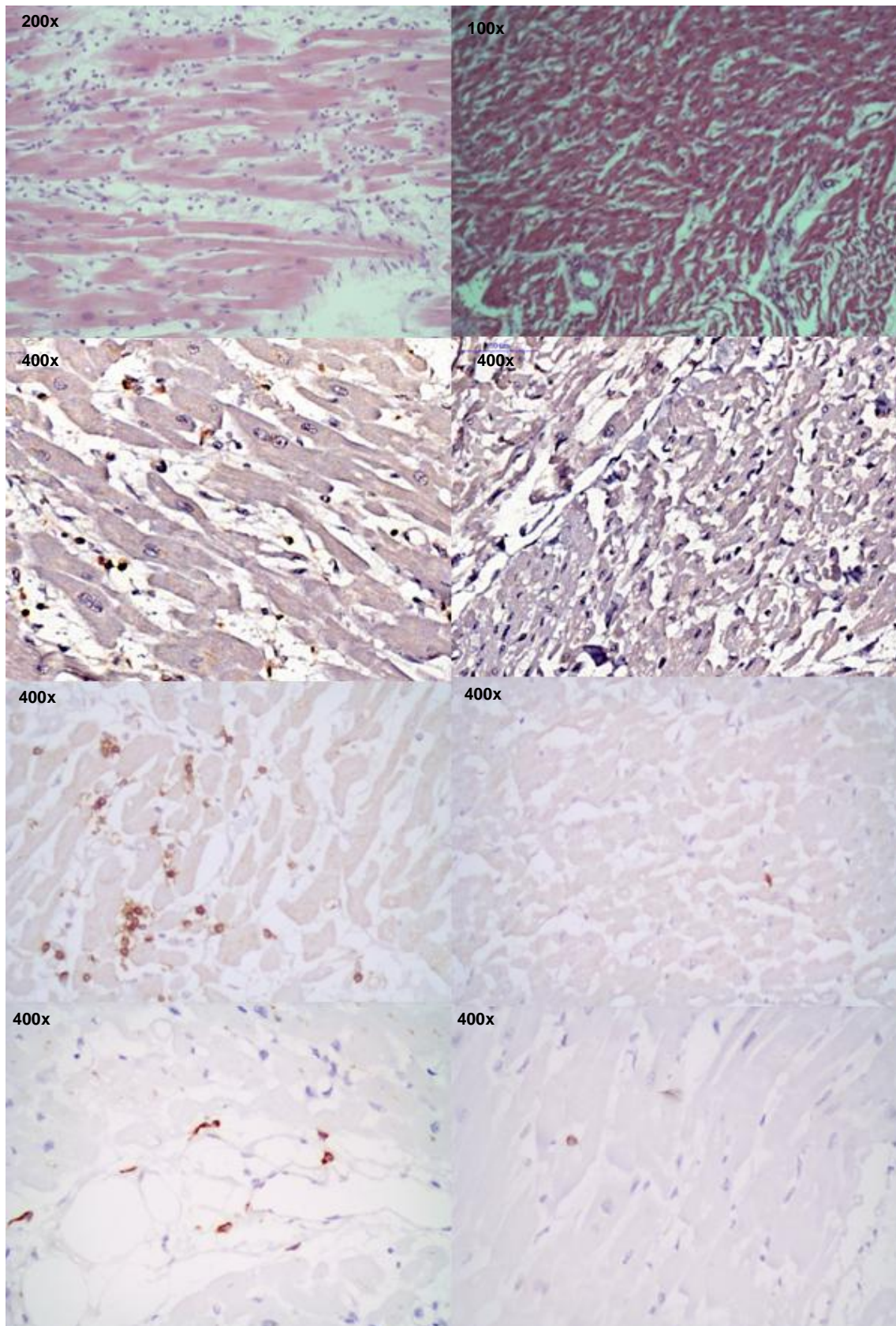


Figura 19 Células mononucleares no miocárdio de casos fatais de dengue. Figura representativa com identificação e quantificação de infiltrado de células mononucleares no tecido cardíaco de caso fatal com diagnóstico positivo de infecção pelo DENV autopsiado no SVO. Coluna esquerda = hematoxilina-eosina (HE), marcações com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD68 de

**caso fatal com diagnóstico de miocardite. Coluna Direita = hematotxilina-eosina (HE), marcações com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD68 de caso fatal sem diagnóstico de miocardite.**

#### **4.3 Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos casos fatais com miocardite**

Uma vez que encontramos alta frequência de casos com miocardite (40,2%), o próximo passo foi realizar a análise das características demográficas, clínicas e laboratoriais entre os grupos (sem miocardite e com miocardite).

Conforme podemos observar na Tabela 6, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre gênero, faixa etária, sinais e sintomas clínicos nos dois grupos avaliados. Da mesma forma, nenhuma diferença foi observada quanto aos diferentes sorotipos de DENV detectados. No entanto, podemos observar que a faixa etária 45-66 (38,2%) foi mais frequente nos casos acometidos pela miocardite.

Não encontramos diferença estatisticamente significativa na frequência de sinais de alarme ou outros fatores associados com mau prognóstico, tais como extravasamento vascular, derrames cavitário e/ou pleural, ascite, convulsão e hemorragias graves.

Apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa na frequência de hepatomegalia entre os grupos, observamos uma tendência de maior frequência deste sinal nos casos com miocardite, onde foi encontrada em 70,9% (22/31) e em 58,8% (20/34) nos casos sem miocardite. Observamos maior frequência de hospitalização nos casos com miocardite (35/42,83,3%) quando comparado com os casos sem miocardite (35/62,56,4%) com  $p= 0.0054$ .



**Tabela 6 Características demográficas, clínicas e laboratoriais de 117 casos fatais com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV 1, 3 e 4, autopsiados no SVO nos grupos com miocardite e sem miocardite, anos 2011-2013**

	Dengue com miocardite N=47	Dengue sem miocardite N=70	p
<b>Gênero</b>			
Feminino	21 (45,0%)	27 (38,5%)	
Masculino	26 (55,0%)	43 (61,4%)	
<b>Faixa etária</b>			
0-12 anos	9/47 (19,1%)	15/70 (21,4%)	
13-30	6/47 (12,7%)	15/70 (21,4%)	
31-45	11/47 (23,4%)	13/70 (18,5%)	
46-65	18/47 (38,2%)	16/70 (22,8%)	
>65	3/47 (6,3%)	11/70 (15,7%)	
<b>Sorotipo</b>			
DENV-1	8/16 (50,7%)	8 /21(38,1%)	
DENV-2	0	0	
DENV-3	1/16 (6,2%)	2 /21 (9,5%)	
DENV-4	7/16 (43,7%)	11/21 (52,3%)	
<b>Sintomas/sinais</b>			
<b>clínicos</b>			
Febre	36/40 (90,0%)	54/63 (85,7%)	
Exantema	3/25 (12,0%)	7/30 (23,3%)	
Dor abdominal	23/32 (71,8%)	38/48 (79,1%)	
Dor retro orbitária	7/23 (30,4%)	9/22 (40,9%)	
Irritabilidade	15/29 (51,7%)	29/42 (69,1%)	
Mialgia	20/31 (64,5%)	23/37 (62,1%)	
Sonolência	20/31 (64,5%)	21/34 (61,7%)	
Artralgia	10/25 (40,0%)	12/28 (42,2%)	
Diarreia	10/25 (40,0%)	20/34 (58,8%)	
Cefaleia	20/28 (71,4%)	31/44 (70,4%)	
Vômitos	28/35 (80,0%)	37/48 (77,1%)	
Prostração	18/21 (85,7%)	21/34 (61,7%)	
Tosse	27/33 (81,8%)	31/43 (72,1%)	

Tabela 7. Frequência da distribuição de comorbidades nos grupos com e sem miocardite.

Variável	Com miocardite n (%)	Sem miocardite n (%)	p
<b>Obesidade</b>			
Sim (n=19)	10 (52,6)	9 (47,4)	0,352
Não (n=43)	28 (65,1)	15 (34,9)	
<b>Hipertensão</b>			
Sim (n=25)	11 (44)	14 (56)	0,660
Não (n=39)	15 (38,5)	24 (61,5)	
<b>Diabetes</b>			
Sim (n=12)	7 (58,3)	5 (41,7)	0,327
Não (n=47)	20 (42,6)	27 (57,4)	

A presença de comorbidades foi relatada em 43% dos casos fatais estudados, sendo hipertensão arterial, obesidade e diabetes mellitus as mais frequentes. No entanto, não foram encontradas diferenças nos grupos quando a presença ou ausência de comorbidades (Tabela 7).

Tabela 8 Sinais de alarme e fatores associados com as formas graves de dengue nos casos fatais com miocardite e sem miocardite.

	Dengue com miocardite	Dengue sem miocardite	P
Hospitalização	35/42 (83,3%) <sup>***a</sup>	35/62 (56,4%)	0,005
Irritabilidade	15/29 (51,7%)	29/42 (69,1%)	
Hepatomegalia	22/31 (70,9%)	20/34 (58,8%)	0,097
Desconforto respiratório	27/30 (90,0%)	41/47 (87,2%)	
Dispneia	35/39 (89,7%)	41/45 (91,1%)	
Derrame cavitário	16/10 (50,0%)	23/18 (56,1%)	
Derrame Pleural	11/32 (34,3%)	23/41 (53,1%)	
Ascite	9/30 (30,0%)	15/41 (36,5%)	
Derrame pericárdico	11/32 (34,3%)	12/40 (30,0%)	6
Extravasamento vascular	26/40 (65,0%)	36/67 (53,7%)	
Hemorragia grave	18/30 (60,0%)	29/43 (67,4%)	
Convulsão	7/24 (29,1%)	13/34 (38,2%)	

a) Na análise estatística foi utilizado o teste exato de Fisher  $p=0.0054$

Em relação aos parâmetros hematológicos (Tabela 9), observamos que os casos fatais apresentaram baixas contagens de plaquetas, porém não houve diferença estatística entre os grupos. Não foram observadas diferenças nas contagens dos leucócitos e nos valores do hematócrito. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os casos fatais apresentaram maiores níveis de transaminases hepáticas. De acordo com a tabela 9, observamos que ambos grupos apresentaram maiores níveis de AST/TGO e ALT/TGP respectivamente.

**Tabela 9 Parâmetros hematológicos e bioquímicos de casos fatais com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV 1, 3 e 4 autopsiados no SVO com ou sem miocardite.**

	<b>Dengue com miocardite</b>	<b>Dengue sem miocardite</b>
<b>Parâmetros Laboratoriais</b>	m (IC 95%) <sup>a</sup>	m (IC 95%) <sup>a</sup>
<b>Hematológicos</b>		
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	63 (64-124,1)	98 (90,1-177,1)
HT <sup>b</sup>	36,1 (31,6-41,9)	37,9 (32,6-42,1)
Leucócitos x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	9450 (8876-16544)	9280 (9078-17503)
<b>Bioquímicos</b>		
AST/TGO IU/L <sup>c</sup>	103 (99-465,1)	117,5 (96,1-754,2)
ALT/TGP IU/L	79 (8,2-447,6)	49,1 (32,8-1027)

a) Mediana, intervalo de confiança IC 95%.

b) Hematócrito

c) Aspartato aminotransferase (AST) / transaminase glutâmico oxalacética (TGO) alanina aminotransferase (ALT) / transaminase glutâmico pirúvica (TGP).

Vinte e três (23/63, 36,5%) casos fatais apresentaram algum tipo de cardiopatia. A análise destes casos, demonstrou que apenas uma frequência de 30,5% (7/23) dos casos apresentava miocardite.

#### 4.4 Identificação e quantificação das alterações histopatológicas no miocárdio, incluindo edema, necrose e hemorragia, em pacientes com dengue necropsiados

Realizamos análises comparativas entre dois grupos em relação ao peso do coração (Figura 20), e quanto a intensidade das alterações histopatológicas como, hemorragia, edema, necrose, fibrose e infiltrado inflamatório (Figura 25).

As análises demonstraram que não houve diferença estatística entre os casos com e sem miocardite em relação ao peso do coração entre os sexos, ou seja, a ocorrência de miocardite não influenciou o peso do coração.

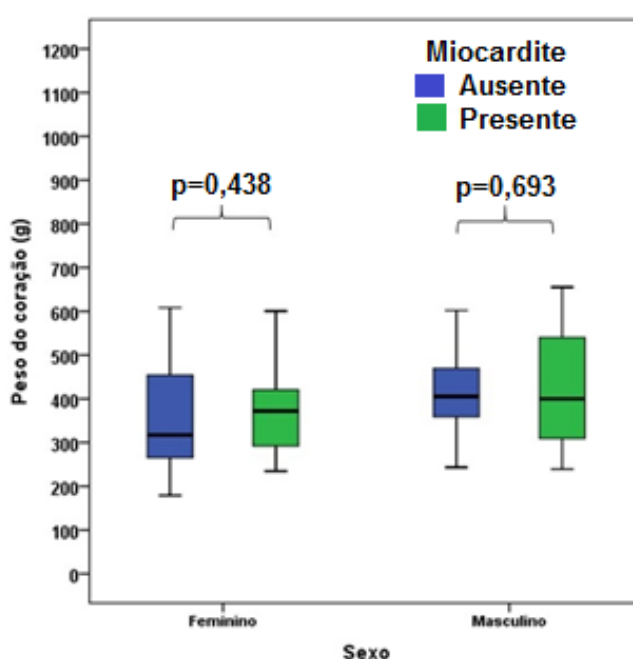


Figura 20. Peso do coração nos casos fatais com e sem miocardite e em relação ao gênero. Na análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos

Em relação às alterações morfológicas, encontramos um percentual de área de hemorragia (Figura 21) entre os casos com miocardite foi de no mínimo nulo e no máximo 11,2%, com mediana de 0,2%. Em 75% dos casos que não apresentaram miocardite a hemorragia estava ausente, e desta forma, os pacientes com miocardite apresentaram uma frequência estatisticamente significativa de hemorragia ( $p = 0,002$ ) (Figura 25A).



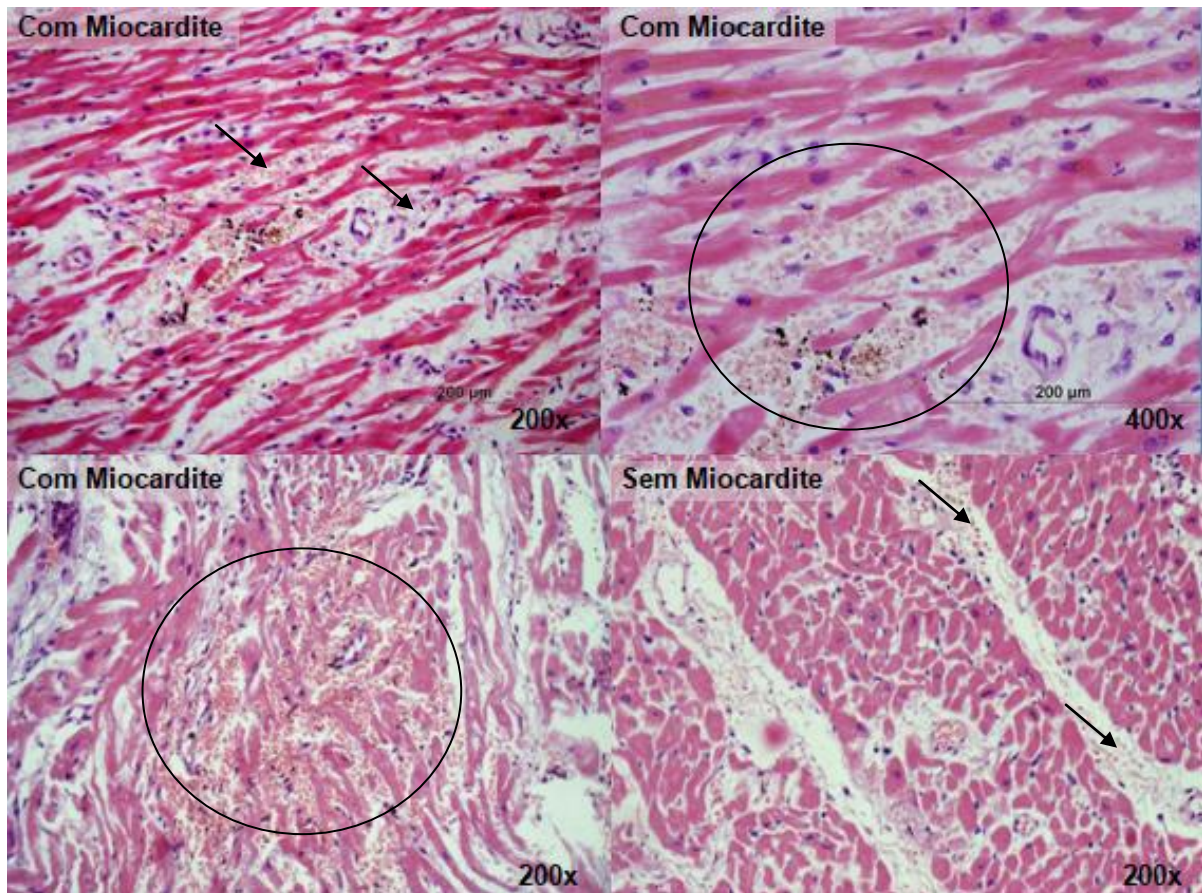
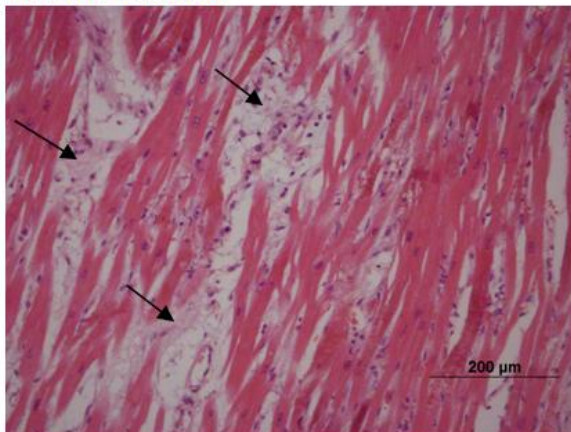


Figura 21 Microfotografias de áreas exibindo hemorragia no miocárdio dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO-Ce, setas pretas e círculos.

O percentual de área de edema (Figura 22) foi no mínimo e no máximo de 4,4 e 30,4% respectivamente com mediana de 15,2%, entre os casos com miocardite. Nos casos sem miocardite o percentual de área de edema variou de 2,6 a 30,4% com mediana de 13% (Figura 25B)

A. Com miocardite



B. Sem miocardite

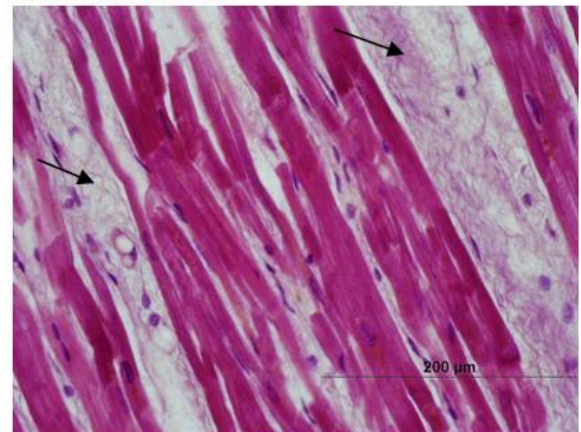


Figura 22: Microfotografias de áreas exibindo edema no miocárdio, dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO-Ce, setas pretas.



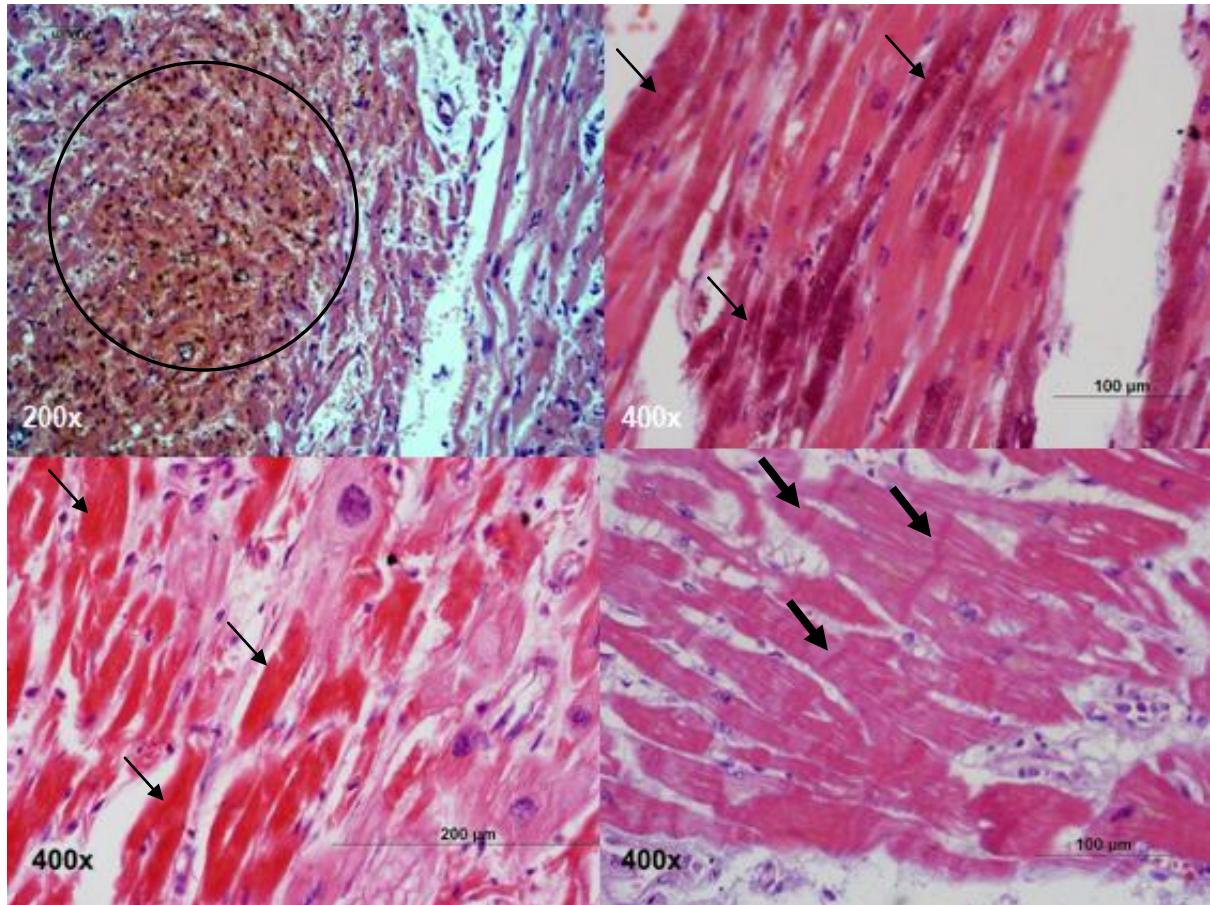
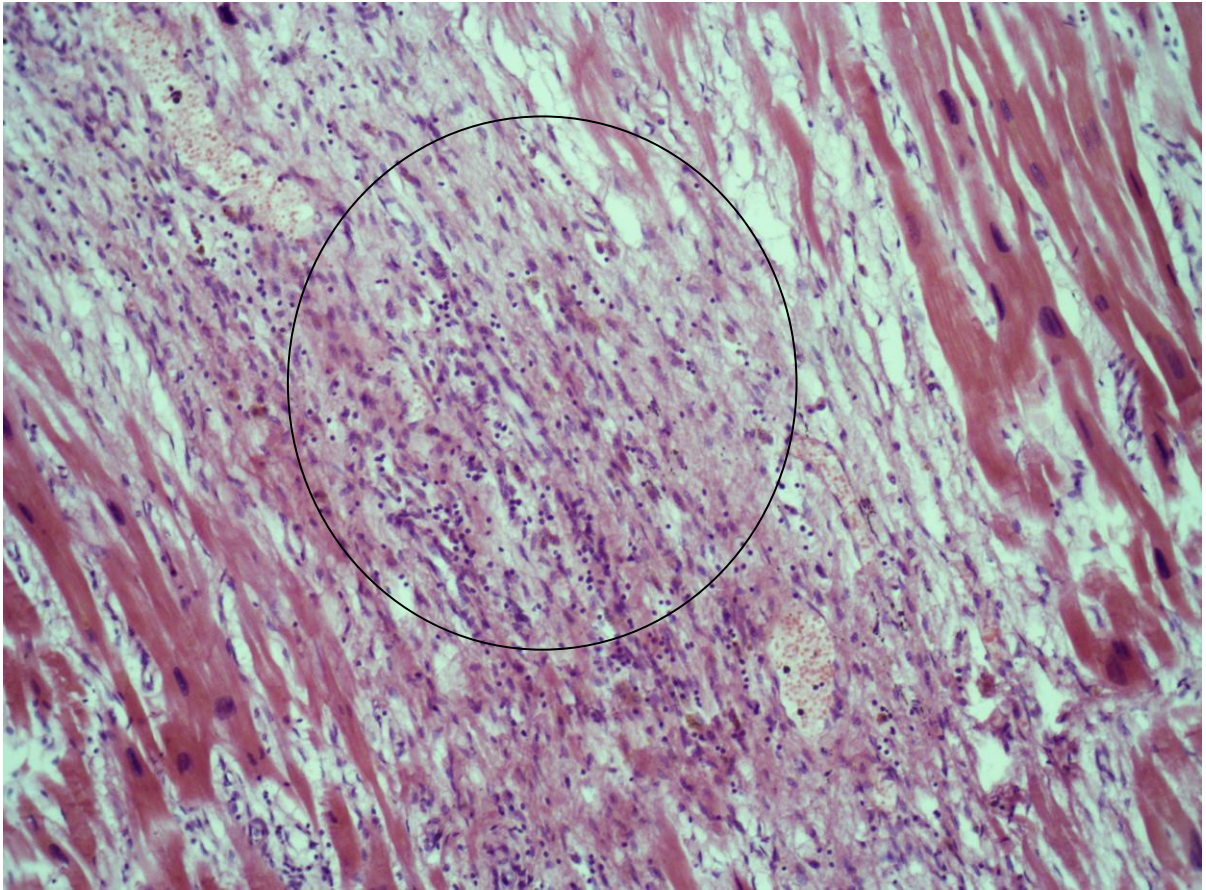


Figura 23 . Microfotografias de áreas exibindo necrose no miocárdio, dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO-Ce, setas pretas finas indicam necrose recente (entre 6 e 12h), o círculo indica necrose mais avançada (após 12h) e setas grossas indicam necrose em bandas de contração.

Apesar dos baixos percentuais de necrose tecidual (Figura 23), nos casos fatais estudados observamos uma diferença estatisticamente superior de necrose nos casos com miocardite (Figura 25C). O percentual de fibrose (Figura 24) foi muito baixo nos casos fatais e não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 25D).



**Figura 24** Microfotografias de áreas exibindo fibrose no miocárdio, dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO-Ce, círculo preto

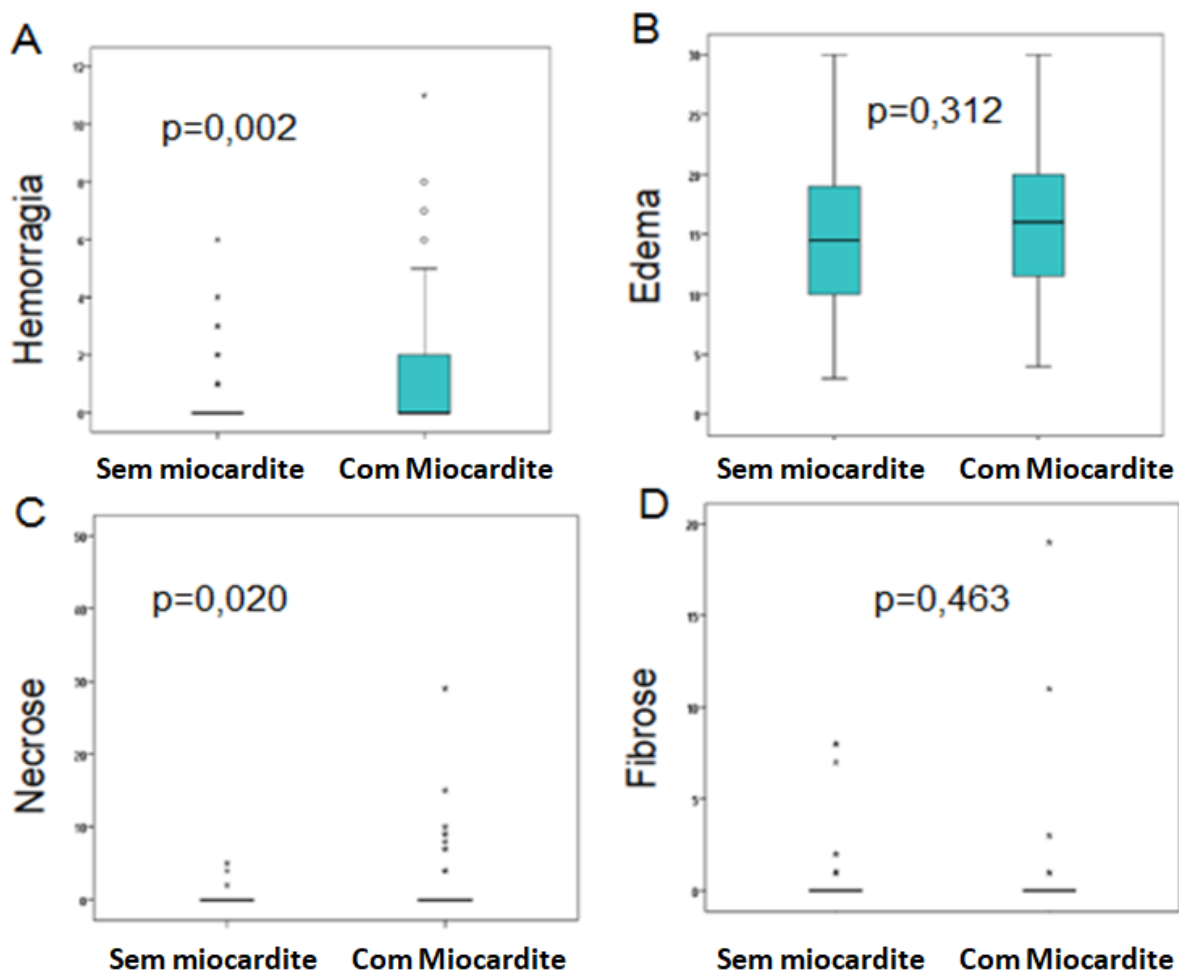


Figura 25 Percentual das alterações histopatológicas no miocárdio dos casos fatais de dengue autopsiados no SVO.

A) Percentual de área de hemorragia. B) Percentual de área de edema. C) Percentual de área de Necrose. D) Percentual de área de fibrose. Na análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

#### 4.4.1 Quantificação de linfócitos T CD4 e CD8 e macrófagos CD68 presentes no infiltrado inflamatório no miocárdio

Conforme demonstrado nas Figuras 26 e 27, anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD68 foram usados na identificação de linfócitos TCD4, TCD8 e macrófagos respectivamente por imuno-histoquímica e em seguida os casos fatais foram classificados quanto a presença ou ausência de miocardite.

As análises comparativas dos diferentes subtipos de células mononucleares foram realizadas entre os grupos conforme demonstrado na Figura 28.

##### **Quantificação de linfócitos T CD4**

Em relação às células CD4 positivas, observamos maiores contagens nos casos apresentando miocardite (Figura 26A,  $p < 0,001$ ). A estratificação por faixa etária também demonstrou maiores contagens no grupo com miocardite. (Figura



26B). Nos pacientes com miocardite os valores totais de linfócitos T CD4 variaram de 2,8 a 22,6 células/mm<sup>2</sup>, com mediana de 7,1 células/mm<sup>2</sup>, e os valores discrepantes foram excluídos. Cinquenta por cento dos valores das contagens de linfócitos T CD4/mm<sup>2</sup> nos casos com miocardite ficaram entre 4 e 12 células/mm<sup>2</sup>. Nos pacientes sem miocardite a contagem de linfócitos T CD4 foi de no mínimo 1,2 e no máximo 9,1 células/mm<sup>2</sup>.

A Figura 26B mostra a distribuição das contagens de células T CD4 positivas por faixa etária e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias nos casos com miocardite. No entanto, A faixa etária >65 anos apresentou baixas contagens de células T CD4 positivas/mm<sup>2</sup>.

#### **4.4.2 Quantificação de linfócitos T CD8**

De modo similar ao que observamos para as células CD4 (Figura 26C), as contagens células T CD8 positivas foram significativamente maiores no grupo com miocardite ( $p < 0,001$ ). Neste grupo as contagens de células T CD8 positivas variaram de 1,2 a 26,4 células/mm<sup>2</sup>, com mediana de 5,6 células/mm<sup>2</sup>. Cinquenta por cento das contagens de linfócitos T CD 8/mm<sup>2</sup> nos casos com miocardite ficaram entre 3 e 13,7 células/mm<sup>2</sup>. Nos pacientes sem miocardite os valores mínimo e máximo das contagens de células T CD8 positivas/mm<sup>2</sup> foram de 0,2 e 9,6, com mediana de 2,2 células/mm<sup>2</sup> respectivamente.

A estratificação por faixa etária demonstrou maiores contagens de células T CD8 positivas nos casos com miocardite (Figura 26D). Foi observada uma tendência de queda da mediana nas faixas etárias de 31-45 e 46-65 com exceção dos pacientes acima de 65 anos, que apresentaram uma mediana elevada.

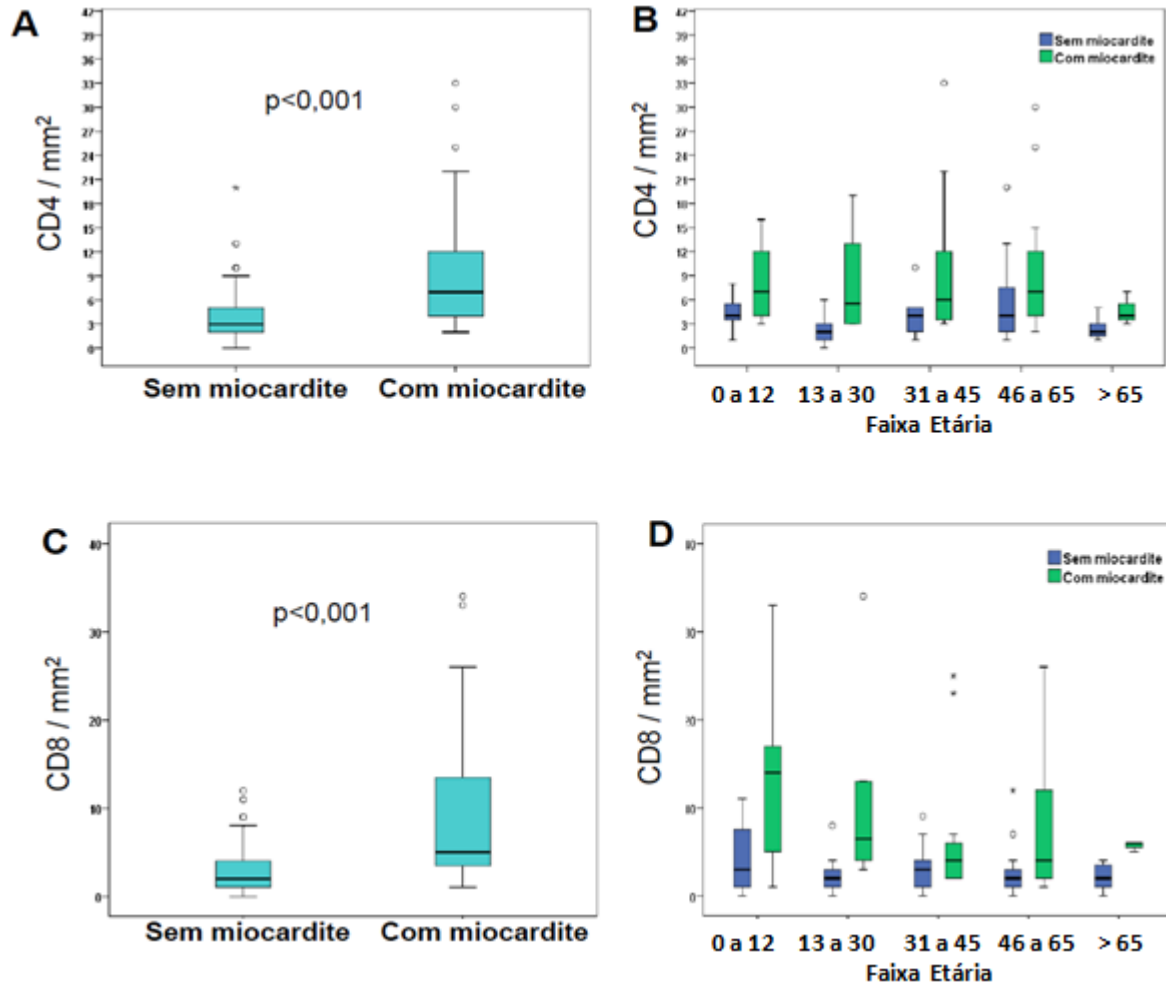


Figura 26 Quantificação de linfócitos CD4 e CD8 no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV 1, 3 e 4.

**A) Contagem de células CD4+ no tecido cardíaco na presença ou ausência de miocardite. B) Contagem de células CD4+ no tecido cardíaco entre os grupos de acordo com a faixa etária. C) Contagem de células CD8+ no tecido cardíaco na presença ou ausência de miocardite. D) Contagem de células CD8+ no tecido cardíaco entre os grupos e de acordo com a faixa etária.** Anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 foram usados na identificação de linfócitos TCD4, TCD8 por imuno-histoquímica. As contagens foram realizadas por microscopia ótica. Foram examinados 10 campos de grande aumento aleatórios e sua área convertida em milímetros quadrados (mm<sup>2</sup>). Em seguida foi calculado o valor total de células positivas para cada marcador/mm<sup>2</sup> em cada paciente. Na análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.4.3 Quantificação de células CD68 positivas

As contagens de células CD68 positivas foram significativamente maiores no grupo com miocardite, comparadas ao grupo sem miocardite (p<0,0001). A contagem total de células CD68 nos pacientes com miocardite variou de 4 a 35,1 células/mm<sup>2</sup>. Nos pacientes sem miocardite o valor mínimo e máximo da quantidade de células CD68 positivas/mm<sup>2</sup> foi de zero e 5,3, respectivamente, com mediana de

9,1 células/mm<sup>2</sup>. Cinquenta por cento dos valores da quantidade de macrófagos CD68/mm<sup>2</sup> nos casos com miocardite ficaram entre 7,6 e 20,8 células/mm<sup>2</sup>. (Figura 27A).

A Figura 27B mostra a distribuição das contagens de células CD68 positivas nos grupos por faixa etária. A estratificação por idade demonstrou maiores contagens de células CD68 positivas no grupo com miocardite. Foi notado um equilíbrio entres as medianas nas diferentes faixas etárias.

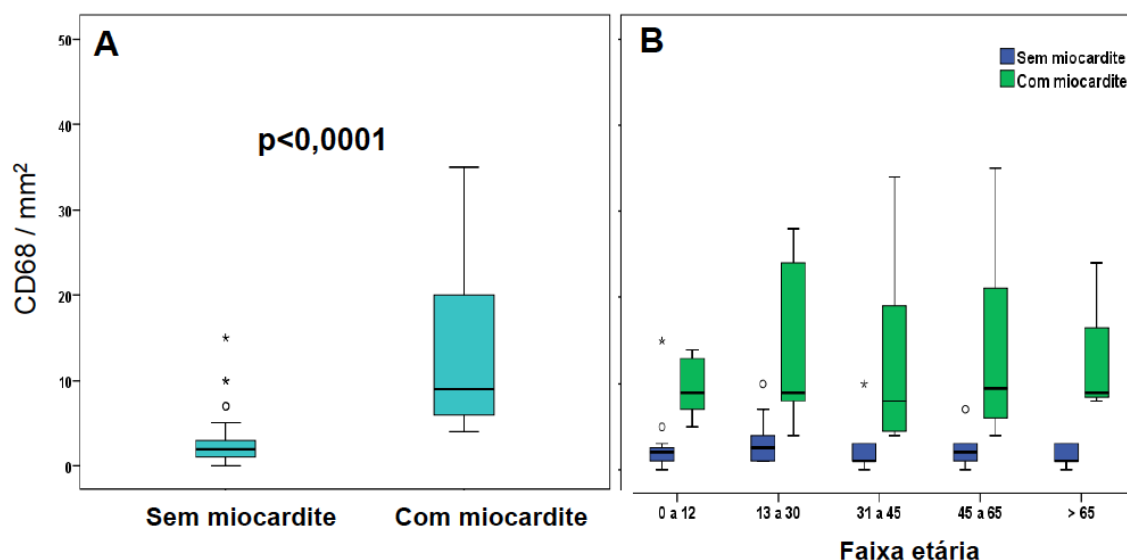


Figura 27 Quantificação de macrófagos CD68+ no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV. **A) Contagem de células CD68+ no tecido cardíaco na presença ou ausência de miocardite. B) Contagem de células CD68+ no tecido cardíaco entre os grupos de acordo com a faixa etária.** Anticorpos monoclonais anti-CD68 foram usados na identificação de macrófagos CD68+ por imuno-histoquímica. As contagens foram realizadas por microscopia ótica. Foram examinados 10 campos de grande aumento aleatórios e sua área convertida em milímetros quadrados (mm<sup>2</sup>). Em seguida foi calculado o valor total de células positivas para cada marcador/mm<sup>2</sup> em cada paciente. Na análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

Com intuito de averiguar as quantidades relativas dos diferentes tipos de leucócitos no tecido cardíaco, realizamos a análise da frequência diferencial das células CD4, CD8 e CD68 presentes no tecido cardíaco dos casos com miocardite e sem miocardite. Como demonstrado na Figura 28, nós observamos aumento significativo na frequência de células CD68 positivas em relação as células T (CD4 e CD8, respectivamente) nos pacientes com miocardite. Interessantemente, o grupo

sem miocardite apresentou aumento significativo na frequência de células T CD4 e CD8 quando comparadas às células CD68 positivas. Ainda, a análise entre os subtipos de células T demonstrou maior percentual de células CD4 nesses pacientes.

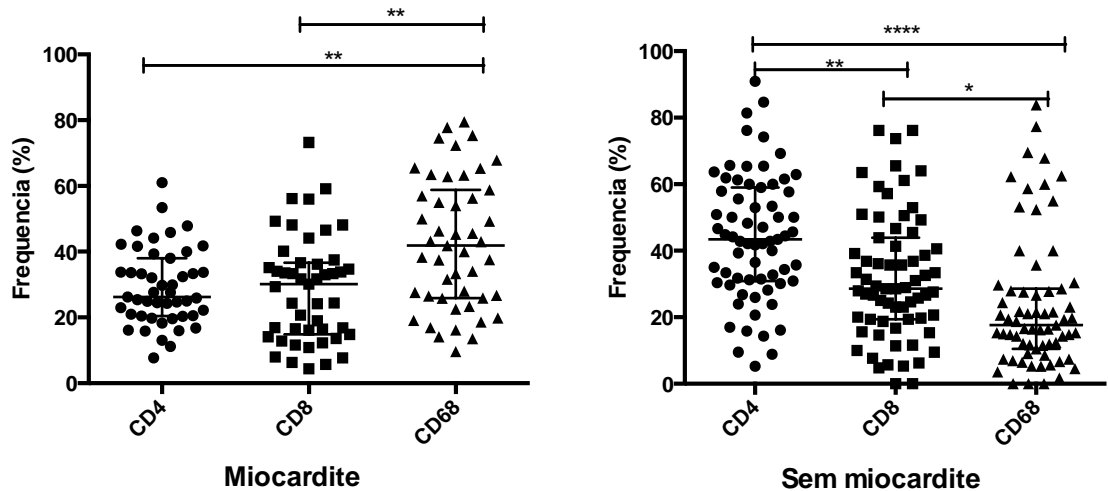


Figura 28 Frequência de linfócitos T CD4 e CD8 e macrófagos CD68 presentes no infiltrado inflamatório no miocárdio na presença ou ausência de miocardite.

Para a análise estatística foi realizado o teste de Kruskal-Wallis utilizando o programa GraphPad Prism v.6. Linhas verticais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25 – 75%). \* representa  $P < 0,05$ .

#### 4.5 Expressão da molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1/CD31) no tecido miocárdico dos casos estudados

A molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1) também conhecida como CD31 foi avaliada no miocárdio nos casos fatais infectados pelo DENV. Em ambos os grupos de pacientes, com e sem miocardite, observamos células CD31 positivas no miocárdio (Figura 29). No grupo com miocardite, a mediana do percentual de células CD31 positivas foi de 8,8%, variando entre 2,2 e 18,4%. Nos pacientes sem miocardite, a mediana foi de 7,2% com valores mínimo e máximo de 0 e 15,4% respectivamente. Como demonstrado na Figura 29, os casos fatais infectados pelo DENV e com miocardite apresentaram frequência significativamente maior de células CD31 positivas em comparação com os casos sem miocardite ( $p=0,05$ ).



(A) Com miocardite

(B) Sem Miocardite

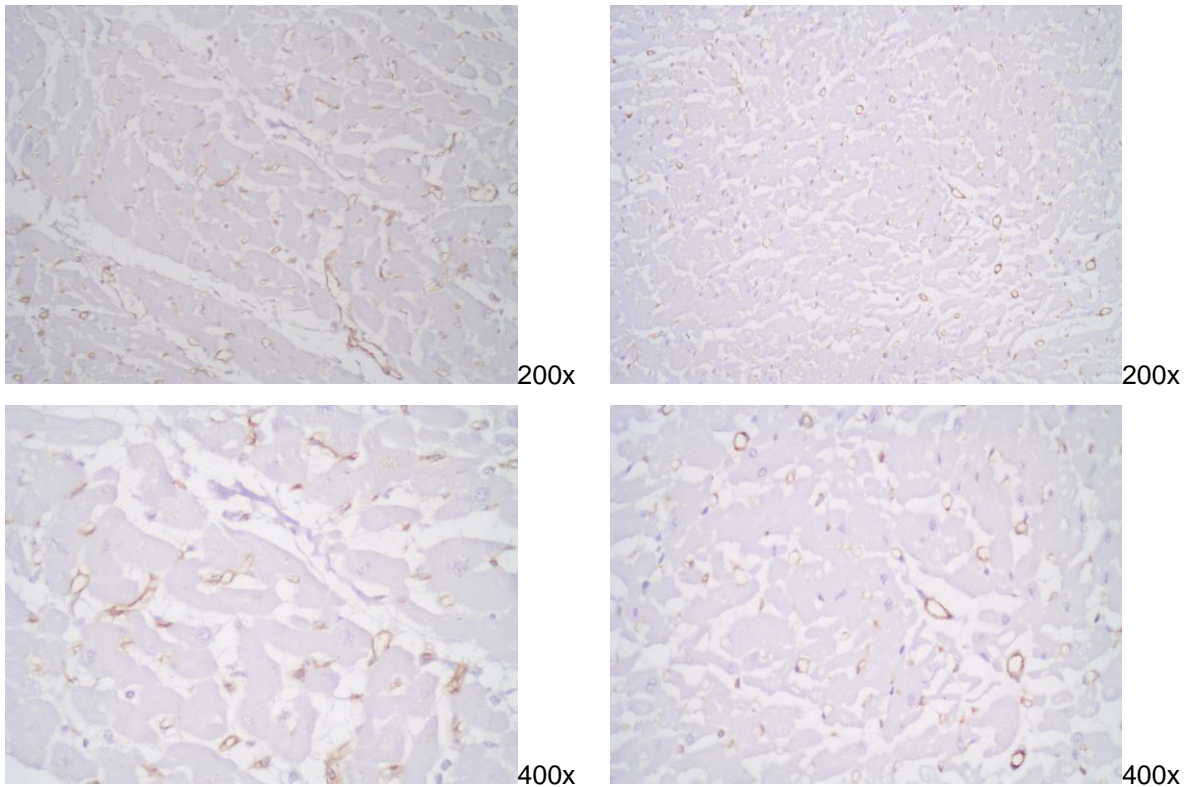


Figura 29 Expressão de PECAM-1/CD31 no tecido cardíaco de caso fatal infectado pelo DENV

A) Expressão de PECAM-1/CD31 no tecido cardíaco de caso fatal infectado pelo DENV apresentando miocardite. B) Expressão de PECAM-1/CD31 no tecido cardíaco de caso fatal infectado pelo DENV sem miocardite. Anticorpos monoclonais anti-CD31 foram usados na identificação de células CD31+ por imuno-histoquímica. A frequência de células CD31 positivas no miocárdio foi avaliada com utilização de um retículo de 1x1mm, com 50 retas e 100 pontos, acoplado a ocular do microscópio ótico.

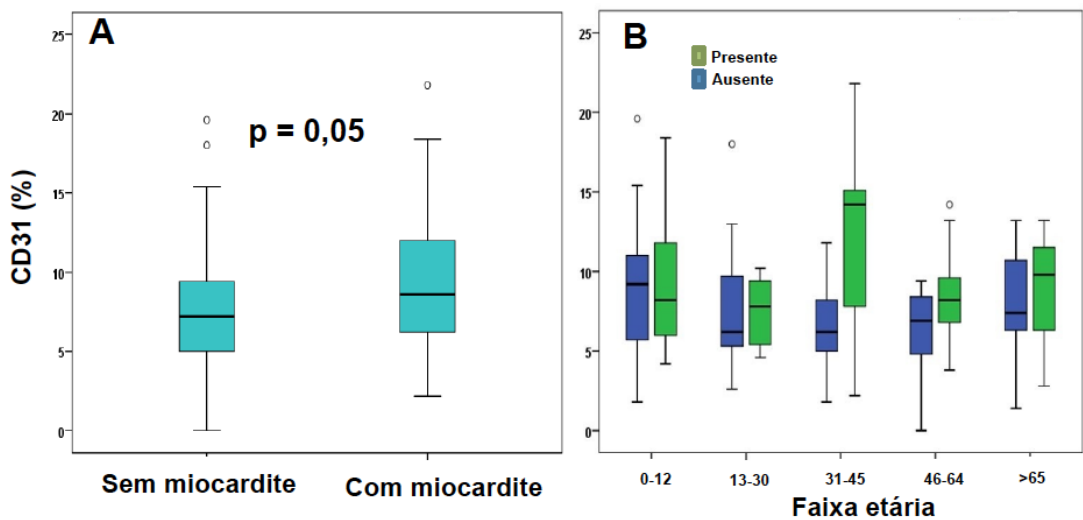


Figura 30 Expressão de PECAM-1/CD31 no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV.

A) Frequência de células CD31 positivas nos grupos sem miocardite e com miocardite. B) Frequência de células CD31+ nos grupos sem miocardite e com miocardite e de acordo com a faixa etária. Na análise estatística foi utilizado o

teste de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.6 Descrição da frequência e da intensidade de apoptose no tecido cardíaco nos casos fatais infectados pelo DENV

A presença de apoptose no tecido cardíaco foi avaliada pela técnica TUNEL (terminal deoxynucleodyl transferase dUTP nick end labeling). Em ambos os grupos de pacientes, com miocardite e sem miocardite, foram observadas células marcadas por TUNEL no miocárdio (Figura 31). Entre os pacientes classificados sem miocardite, a mediana do número de células marcadas por TUNEL/mm<sup>2</sup> foi de 5,3, valor que variou entre zero e 12,2. Entre os pacientes com miocardite, a mediana foi de 3,8 células/mm<sup>2</sup> com variação de 0,25 a 9,7 células/mm<sup>2</sup>.

A presença de apoptose, foi observada em 97% (68) dos pacientes sem miocardite e em 100% (47) dos pacientes com miocardite.

Com miocardite

Sem miocardite

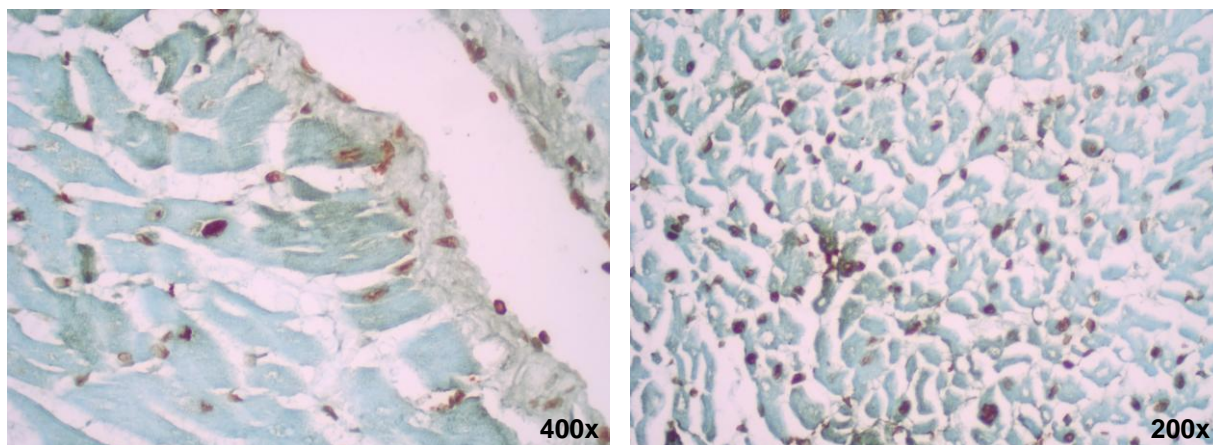


Figura 31 Miocárdio de caso fatal infectado pelo DENV com célula apoptótica marcada por TUNEL.

**A) Célula apoptótica marcada pela técnica TUNEL no tecido cardíaco de caso fatal infectado pelo DENV apresentando miocardite. B) Célula apoptótica marcada pela técnica TUNEL no tecido cardíaco de caso fatal infectado pelo DENV sem miocardite. As lâminas foram incubadas com 50  $\mu$ l da mistura de reação TUNEL (5  $\mu$ l da solução da enzima desoxinucleotidil-transferase terminal, +45  $\mu$ l da solução tampão). A frequência de células apoptóticas no miocárdio foi avaliada com utilização de um retículo de 1x1mm, com 50 retas e 100 pontos, acoplado à ocular do microscópio ótico.**

Como demonstrado na Figura 32, as contagens de células apoptóticas foram significativamente maiores nos tecidos obtidos de pacientes sem miocardite

( $p=0,032$ ). Em relação à faixa etária, observamos maior frequência de células marcadas por túnel nos casos com idade superior a 65 anos.

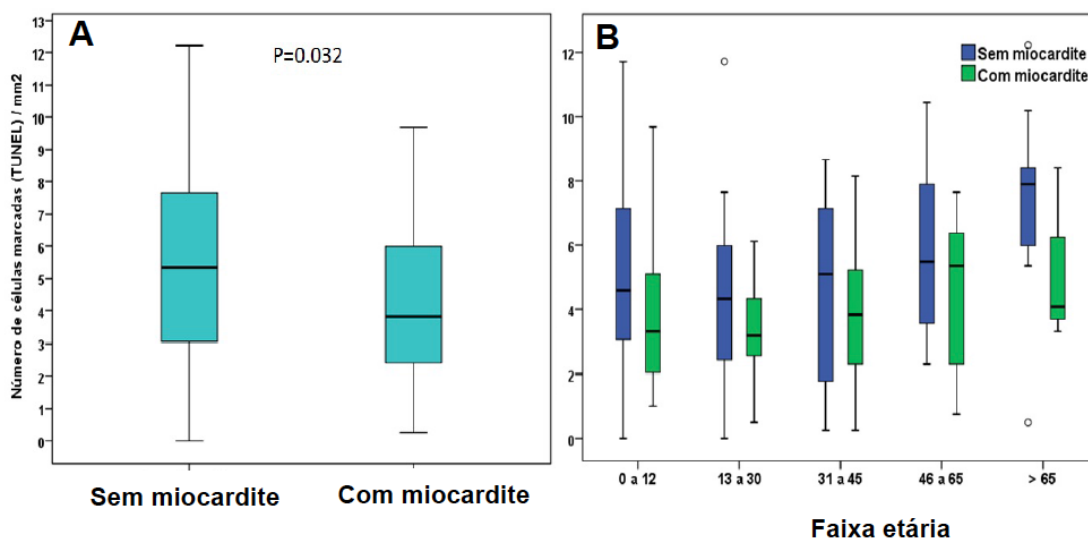


Figura 32 Células apoptóticas marcadas por TUNEL no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV.

**Numero de células apoptóticas nos grupos com miocardite e sem miocardite. B) Presença de células apoptóticas de acordo com a faixa etária. Na análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Valores de  $p<0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.**

#### 4.7 Detecção das proteínas NS1 e NS3 no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV

Por fim, avaliamos a presença das proteínas NS1 e NS3 no tecido cardíaco dos casos fatais utilizando anticorpos anti-NS1 e anti-NS3 através da técnica de imuno-histoquímica. Na figura 33 podemos observar tecido cardíaco apresentando marcação positiva para NS1 e NS3 em macrófagos.

Nossos resultados demonstraram que a proteína a NS1 foi detectada no tecido cardíaco de 17 dos 47 (36%) casos fatais com miocardite. Em relação a proteína NS3, a detecção foi de 66% (31/47). A detecção da NS1 e da NS3 nos casos fatais sem miocardite foi de 46% (32/70), e 69 % (49/70) respectivamente (Tabela 9).

Tabela 10 Frequência de marcação das proteínas NS1 e NS3 em macrófagos de casos com e sem miocardite e mediana de células apoptóticas no tecido cardíaco.

	<b>Com miocardite</b> % (nº casos marcados/total)	<b>Sem miocardite</b> % (Nº de casos marcados/total)
<b>NS1</b>	<b>36 (17/47)</b>	<b>46 (32/70)</b>
<b>NS3</b>	<b>66 (31/47)</b>	<b>69 (49/70)</b>
<b>Células apoptóticas<sup>a</sup></b>	<b>3,8</b>	<b>5,3</b>

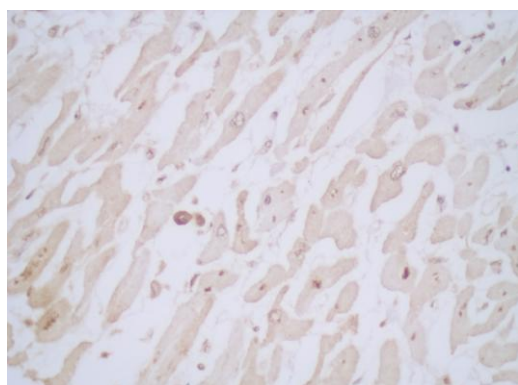
a) Mediana (células/mm<sup>2</sup>)

Com miocardite

**A**

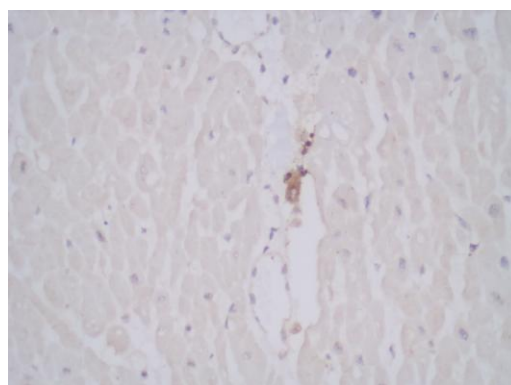
Sem miocardite

**B**



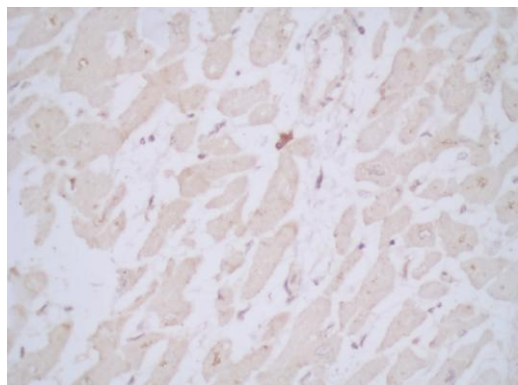
NS1 400x

**C**

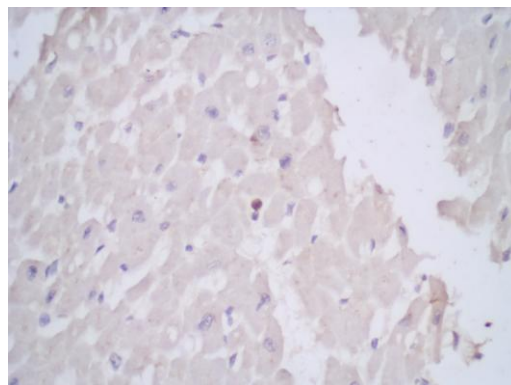


NS1 400x

**D**



NS3 400x



NS3 400x

Figura 33 Microfotografias das marcações imunohistoquímicas das proteínas não estruturais NS1 e NS3. **A e C) Expressão de NS1 e NS3 no tecido cardíaco de caso fatal infectado pelo DENV apresentando miocardite. B) Expressão de NS1 e NS3 no tecido cardíaco de caso fatal infectado pelo DENV sem miocardite.** Anticorpos monoclonais anti-NS1 e anti-NS3 foram usados na identificação de macrófagos NS1+ e NS3+ respectivamente por imuno-histoquímica. A identificação de células NS1 e NS3 positivas no miocárdio foi realizada com utilização do microscópio ótico.

## 5 DISCUSSÃO

Nesse estudo investigamos as alterações anatomopatológicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas do miocárdio de 117 pacientes autopsiados e que foram a óbitos por dengue. Também foi realizada a análise comparativa dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre os pacientes que obedeceram aos critérios preconizados para o diagnóstico de miocardite e naqueles sem diagnóstico de miocardite.

### **Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos casos fatais infectados pelo dengue**

Nosso estudo foi realizado numa das regiões mais atingidas pela dengue nos anos de 2011-2012 com 222.432 casos notificado seguido da reintrodução do DENV-1 em 2011 e introdução do DENV-4 em 2012 (Ceará 2016). Analisamos as características clínicas, laboratoriais e demográficas de 117 casos fatais com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV. De acordo com o Ministério da Saúde, pacientes que apresentavam alterações graves do sistema nervoso, disfunção cardiorrespiratória, insuficiência hepática, plaquetopenia igual ou inferior a  $50.000/\text{mm}^3$  e que não se enquadravam nos critérios da OMS 1997 eram então classificados em DCC (Brasil 2008). A maioria dos casos estudados foram classificados em DCC e uma minoria deles em FHD demonstrando a dificuldade na classificação segundo critérios da OMS, 1997 (WHO 1997).

De acordo com a nova classificação clínica proposta pela OMS no ano 2009, o manejo adequado dos pacientes depende do reconhecimento precoce dos sinais de alarme. Esses sinais são importantes, uma vez que surgem antes do estabelecimento da dengue grave e devem ser observados na prevenção de casos fatais. O Brasil adotou oficialmente a nova classificação a partir de janeiro de 2014. Neste estudo, observamos que todos os casos estudados foram classificados em DG. Além disso, de acordo com a nova classificação, pudemos observar que grande parte dos casos apresenta sinais de alarmes sendo os mais frequentes hepatomegalia (80,5%), sinais de acúmulo de líquido (54,2%) e irritabilidade (61,4%) em concordância com outros estudos usando a nova classificação (Cavalcanti et al. 2014; Leo et al. 2013).



As análises demonstraram que pacientes originários da epidemia de 2011 apresentaram maior frequência de extravasamento plasmático e de hospitalização comparados aqueles provenientes da epidemia de 2012. De fato, houve a co circulação do DENV-1, DENV-3 em 2011 e introdução do DENV-4 em 2011-2012 no estado. As infecções pelo DENV-4 geralmente são caracterizadas por um quadro clínico mais brando em comparação aos outros sorotipos (Vaughn et al. 2000). No entanto, vários estudos têm relatado casos de FHD (Nisalak et al. 2003; Pichyangkul et al. 2003) e óbitos (Limonta et al. 2012) com o sorotipo 4, principalmente nas infecções secundárias. A introdução do DENV-4 certamente teve muita importância epidemiológica principalmente pelo aumento nos números de casos, mas também pelo aumento na gravidade dos mesmos.

Noventa por cento dos casos apresentaram sintomas como dispnéia, desconforto respiratório, hepatomegalia e tosse. Esse fato chama a atenção pois eram pacientes, em sua maioria, referenciados de unidades de saúde, apesar disso, em apenas 76% havia relato de hospitalização, e em 7,2% havia a informação de hidratação na assistência hospitalar, enfatizando a importância da nova classificação 'no manejo clínico dos pacientes infectados pelo DENV.

### **Diagnostico clínico dos pacientes com miocardite**

Nosso estudo demonstrou elevada frequência de miocardite nos casos fatais autopsiados. Dos 117 pacientes estudados, 47 tiveram o diagnóstico de miocardite, revelando uma frequência de 40,2%. Estudo prévio realizado no SVO-CE, encontrou moderada frequência de miocardite 18% (8/44) em casos fatais de dengue (Torres et al. 2013), utilizando o critério de Dallas com a análise histopatológica na coloração de H&E. Contrastando com esse trabalho, encontramos uma prevalência de 136,5% a mais casos de miocardite em pacientes que foram a óbitos por dengue no Ceará. Essa grande diferença poderia ser explicada, pelo tamanho da nossa amostra e, principalmente, pela diferença entre os critérios e métodos utilizados para o diagnóstico de miocardite.

O diagnóstico de miocardite obedeceu durante muitos anos o critério de Dallas, proposto em 1986 (Baughman 2006), baseado na categorização histopatológica. Nos últimos anos, muitas discussões foram levantadas sobre a sensibilidade do diagnóstico de miocardite por apenas constatar no tecido cardíaco

infiltrado inflamatório em torno de miócitos, associado a necrose ou lesão celular não característico de fenômeno isquêmico (Baughman 2006).

Foi demonstrado em biópsias cardíacas pós-mortem de pacientes com diagnóstico clínico de miocardite, que a partir de uma única biópsia endomiocárdica, a miocardite poderia ser demonstrada histologicamente em apenas 25% das amostras. Utilizando-se os critérios de Dallas, e com mais de 5 biópsias, a possibilidade de diagnóstico aumentou para dois terços dos pacientes. O critério de Dallas se mostrou pouco sensível num estudo multicêntrico, com um índice de efetividade de 5% em pacientes com suspeita clínica de miocardite (Hauck et al. 1989). Além da limitação da amostra, outra limitação do critério de Dallas é a dificuldade de objetivar a análise histopatológica em relação à quantificação do infiltrado inflamatório, que é observador dependente, com grandes discrepâncias de diagnóstico entre patologistas gerais e patologistas experientes em patologia cardíaca (Aretz et al. 1987; Baughman 2006; Shanes et al. 1987).

Em nosso trabalho adotamos como critério diagnóstico o consenso da Sociedade Europeia de Cardiologia que estabelece a associação dos achados morfológicos vistos sob microscopia ótica na coloração de H&E e o perfil imunohistoquímico das populações de células do infiltrado inflamatório, exigindo também critérios quantitativos claros: 14 leucócitos/mm<sup>2</sup>, incluindo 7 linfócitos T/mm<sup>2</sup> e até 4 monócitos CD68 positivos/mm<sup>2</sup> (Caforio et al. 2013).

O achado de nossa casuística além de ser contundente em relação à diferença na sensibilidade dos métodos diagnóstico de miocardite, aponta para a necessidade na definição da especificidade de cada exame. Porém, constata, em nossa população, uma alta prevalência de miocardite em pacientes com dengue grave que foram a óbito.

Independentemente da etiologia, a miocardite não é uma doença fatal, ao contrário é autolimitada (Kytö et al. 2007) e a fatalidade ocorre em 2% dos casos estando frequentemente relacionada aos casos de miocardite fulminante. A frequência elevada de miocardite na dengue e em especial na dengue grave como um fator de letalidade, pode estar relacionada às alterações vasculares da microcirculação que acompanha a patogênese da dengue, promovendo o extravasamento vascular intenso, levando à dissociação das fibras pelo edema subsequente e diminuição na condução elétrica em sincício, como normalmente ocorreria no músculo cardíaco hígido (Yacoub et al. 2014).

A maioria dos trabalhos associando dengue e miocardite tem o diagnóstico da alteração cardíaca com base em achados clínicos e laboratoriais com uma frequência de até 37,5%, assim a análise histopatológica miocárdica realizada no nosso estudo, confirmou a alta frequência clínica de miocardite (Arora and Patil 2016). Complicações cardíacas e miocardite ocasionada pelo DENV são consideradas raras, no entanto existem relatos de miocardite durante a infecção pelo DENV desde a década de 1970 (Nagaratnam et al. 1973). Os mecanismos propostos incluem efeitos diretos do DENV no miocárdio bem como efeitos indiretos da resposta inflamatória desencadeada pela infecção (Li et al. 2016).

Não foi encontrada diferença estatística na frequência de casos com miocardite por faixa etária e sexo, em contraste com achados na literatura que encontraram uma prevalência maior na faixa etária de 12 a 30 anos e de 2:1 entre o sexo masculino e feminino (Satarasinghe et al. 2007). No entanto, nossos resultados mostraram que igualmente crianças, adultos e idosos foram acometidos pela miocardite induzida pelo DENV. A influência da faixa etária no envolvimento cardíaco nos pacientes infectados pelo dengue ainda é desconhecida. Observamos um percentual de 38,2% de casos com miocardite na faixa de 45-66 anos. Esses pacientes, assim como idosos, normalmente possuem algum tipo de comorbidade e desta forma devem ser cuidadosamente monitorados. Embora dados da literatura apontem que cerca de 36,6% dos pacientes tem sintomas clínicos relacionados à alteração cardíaca (Arora and Patil 2016), não encontramos na revisão dos prontuários dos 117 pacientes nenhum relato de suspeita clínica de envolvimento cardíaco.

Estudos prévios encontraram associação significativa com manifestações de comprometimento cardíaco e a presença de sinais de alarme e gravidade tais como hepatomegalia e hemorragias em pacientes infectados (Li et al. 2016). No entanto, não encontramos diferença estatística entre os grupos de pacientes do nosso estudo (Tabela 8). Interessantemente, a hospitalização foi mais frequente nos pacientes com miocardite em concordância com o estudo de (Li et al. 2016). Esses resultados enfatizam a necessidade da inclusão do comprometimento cardíaco como critério de gravidade conforme nova classificação da OMS de 2009 (WHO 2009).

Em relação aos sinais e sintomas clínicos, não encontramos diferenças entre os grupos analisados. A tosse foi o sintoma com maior diferença de percentual entre os pacientes do grupo com miocardite (81,8%) em contraste com 72% dos



pacientes sem miocardite. Embora esse sintoma não seja relatado nos estudos clínicos que correlacionam dengue com miocardite, nos chama a atenção para a possibilidade de ser devido à congestão passiva pulmonar secundária à disfunção cardíaca (Marques et al. 2017).

Pacientes com as formas graves da doença apresentam frequentemente anormalidade homeostáticas incluindo deficiências em fatores da coagulação sanguínea, trombocitopenia e disfunção plaquetária (Azeredo et al. 2015). Além disso, envolvimento hepático é uma das características da infecção pelo DENV e são observadas alterações hepáticas, incluindo hepatomegalia e aumentos das transaminases nos casos graves e fatais.

Estudo recente demonstrou menores contagens de plaquetas e maiores níveis séricos de AST/TGO nos pacientes infectados pelo DENV e com miocardite (Li et al. 2016). Nosso estudo demonstrou que ambos os grupos, com e sem miocardite, apresentaram baixas contagens de plaquetas. Não observamos diferenças nas contagens de leucócitos ou nos valores do hematócrito. Além disso, maiores níveis de AST/TGO e ALT/TGP foram observados dois grupos, mas sem diferença estatística entre eles. Uma das limitações do nosso estudo foi a falta de dados de todos os casos incluídos dificultando as análises estatísticas.

Estudos já relataram casos de miocardite em pacientes infectados pelo DENV-2 e DENV-3 (Lee et al. 2010). Demostramos casos de miocardite em pacientes infectados com DENV-1, DENV-3 ou DENV-4 sugerindo que estes sorotipos apresentam o potencial no desenvolvimento de miocardite. Ainda, este é o primeiro estudo a reportar miocardite em pacientes infectados pelo DENV-4. A presença do sorotipo DENV 4 pode estar relacionado à endemia na nossa região com grande recirculação de vários sorotipos e um grande percentual de dengue secundária, favorecendo a ocorrência de doença mais grave mesmo com um sorotipo de menor virulência.

Não encontramos diferenças estatísticas quanto à presença de comorbidades entre os grupos, diferentemente dos trabalhos que confirmam o estado pró-inflamatório do obeso (Redinger 2007), que mantém níveis elevados de citocinas, além de estudos que mostraram a obesidade como fator de risco para gravidade, sendo encontrado em 30% dos pacientes que foram a óbito por dengue (Cavalcanti et al. 2016). A hipertensão arterial sistêmica e o diabetes mellitus não se mostraram estatisticamente mais presentes no grupo com miocardite, o que já havia sido

afirmado por outros autores que viram associação entre essas patologias e a dengue grave (Limonta et al. 2008).

### **Identificação e quantificação das alterações histopatológicas no miocárdio**

Os achados histopatológicos avaliados neste estudo foram aqueles relacionados com as manifestações teciduais da dengue em outros sítios, tais como infiltrado inflamatório, edema, hemorragia e necrose. O infiltrado inflamatório, a hemorragia e a necrose foram associados à miocardite confirmando o que ocorre em outros órgãos estudados, como o fígado, que nos casos de dengue grave mostra lesão irreversível de hepatócitos com níveis das dosagens de AST/TGO e ALT/TGP alcançando patamares acima de 1000UI/L (Póvoa et al. 2014; WHO 2009).

As células dendríticas e os macrófagos são os principais alvos do DENV *in vivo*, no entanto, grande quantidade de tipos celulares, além dos já mencionados acima, também podem ser infectados *in vitro*, como linfócitos, hepatócitos, células endoteliais (CE) e mastócitos. Embora o papel dessas células na infecção pelo DENV permaneça menos claro *in vivo*, a ativação de células T de memória resultando em cascatas de citocinas inflamatórias e outros mediadores químicos que desencadeiam a morte da célula infectada através da apoptose é um elemento crítico que contribui para a ocorrência da dengue grave. Assim a disfunção endotelial proporciona as respostas de aumento da permeabilidade vascular, ocasionando os diversos edemas cavitários e intraparenquimatosos, além de ser ativado pelas citocinas liberadas pelas células inflamatórias ativadas, como os linfócitos T.

As células endoteliais ativadas pelo DENV produzem quimiocinas e citocinas que ativam ou recrutam células imunes ao próprio endotélio. Esta ativação descontrolada e persistente do endotélio leva ao intenso aumento da permeabilidade vascular na microcirculação visceral e de serosas, além de estimular a trombose de pequenos vasos e inflamação local (John et al. 2015).

Neste estudo, o edema ocorreu em diferentes graus nos dois grupos e não discriminou os casos com miocardite e afetou até 30% da área do tecido examinada em alguns casos mais intensos. O edema consagra-se como um parâmetro importante da infecção pelo DENV, especialmente nos casos de maior gravidade, já que ambos os grupos de pacientes foram a óbito. Independentemente de qualquer outro parâmetro, o edema foi o achado mais frequente em todos os casos.

Foi demonstrado que edema é inerente a todos os casos com e sem miocardite, mas que o processo inflamatório e todas as repercussões vasculares, relacionadas à célula endotelial e à ativação de linfócitos T e macrófagos com liberação de mediadores químicos no miocárdio, que levaram a uma maior repercussão tecidual. Nesse mesmo trajeto segue a hemorragia que à semelhança do edema é ocasionada pelo agravamento da lesão endotelial, que passa a permitir além do extravasamento plasmático, o extravasamento celular. A partir deste entendimento, observamos uma intensidade de necrose e hemorragia significativamente superior nos casos com miocardite. Nossos resultados corroboram os achados de Póvoa et al 2014, que observaram extensas áreas de hemorragia e edema em vários órgãos de 4 casos fatais por DENV-3 (Póvoa et al. 2014). Autopsias de pacientes do Sri Lanka também, demonstraram presença de edema, inflamação e necrose do tecido cardíaco (Weerakoon et al. 2011).

#### **Quantificação de linfócitos T CD4 e CD8 e macrófagos CD68 presentes no infiltrado inflamatório no miocárdio**

Existem poucos estudos relacionados ao perfil imuno-histoquímico das populações de células do infiltrado inflamatório na miocardite induzida pelo DENV. Miranda e colaboradores demonstraram infiltrado de células mononucleares edema generalizado inflamação em amostras de dois casos fatais no Brasil (Miranda et al. 2013b). Nosso estudo demonstrou intenso infiltrado de células mononucleares nos casos fatais infectados pelo dengue e com miocardite. A análise da frequência de células mononucleares nos diferentes grupos demonstrou maior frequência de células CD68 positivas nos casos com miocardite.

Na dengue, o vírus se replica principalmente nas células da linhagem monocítica, e nossos resultados demonstraram uma intensa infiltração de macrófagos no tecido cardíaco sugerindo importante papel para estas células durante a miocardite. Miagostovich et al 1997 também demonstram a presença de células CD68 positivas no cérebro de 3 casos fatais de dengue no Brasil (Miagostovich et al. 1997). No entanto ainda são necessários estudos na elucidação do papel destas células na patogênese da miocardite induzida pelo dengue.

De modo contrário, os casos sem miocardite apresentaram menor frequência de células CD68 positivas e maior frequência de células CD4 e CD8

respectivamente. Estudos prévios demonstraram maior frequência de linfócitos T CD4 e CD8 expressando o receptor de quimiocina CCR5 com baixos níveis da quimiocina CCL5/RANTES (ligante do CCR5) no sangue. No entanto, elevada expressão foi encontrada fígado de casos fatais sugerindo a migração das células para o tecido hepático (De-Oliveira-Pint et al. 2012). De fato, uma redução no número de linfócitos T CD4 circulantes com inversão da taxa CD4/CD8 é descrita na fase aguda da doença principalmente nos casos mais graves de dengue (Azeredo et al. 2001; Green et al. 1999). As causas da redução de linfócitos no sangue periférico são discutidas e parecem envolver mecanismos de migração e apoptose. Provavelmente os linfócitos T de pacientes infectados migram para os sítios inflamados e sofrem apoptose nestes locais.

A resposta imune celular tem importante papel na lesão e disfunção miocárdica. A miocardite viral é dividida em fase aguda, subaguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se pela presença de viremia ocorrendo perda de miócitos por necrose graças a ação direta do vírus, efeitos citotóxicos de linfócitos T citotóxicos, mediadores inflamatórios, produtos do estresse oxidativo além de disfunção endotelial (Kawai 1999).

#### **Expressão da molécula de adesão celular endotelial plaquetaria (PECAM-1/CD31) no tecido miocárdico**

Sabe-se que na patogênese do processo inflamatório agudo, inicialmente ocorrem fenômenos vasculares relacionados à vasodilatação mediada pela histamina num primeiro momento e em seguida pela serotonina, por proteínas plasmáticas (proteínas ativadas do sistema complemento e cininas), pelas prostaglandinas, entre outros mediadores, e que estes são liberados por mastócitos teciduais, plaquetas, macrófagos e leucócitos. Neste segundo momento vê-se o fenômeno do aumento da permeabilidade vascular. Estes eventos vasculares têm por objetivo facilitar o aporte de células inflamatórias, proteínas plasmáticas e citocinas para o local onde está havendo a lesão tecidual, e ocorrem em minutos após o contato do tecido com o agente agressor e se estendem por algumas horas e até alguns dias. À medida que o tempo passa, o nível de organização do processo inflamatório evolui com participação de proteínas e enzimas da matriz extracelular. Na sequência de eventos o endotélio vascular passa a receber novos estímulos,

agora mediados principalmente pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Este fator é expresso em baixos níveis numa variedade de tecidos, mas em maiores níveis nos podócitos do glomérulo e nos miócitos cardíacos. Dar-se, então a partir do estímulo do VEGF o início da angiogênese, que à semelhança de outras etapas do processo inflamatório na presença de DENV ocorre de uma forma mais exacerbada, contribuindo com o extravasamento vascular já elevado (Inyoo et al. 2017).

O CD31/PECAM-1 além de exibir propriedades adesivas durante a diapedese, é uma molécula de sinalização eficiente para demonstrar a angiogênese (Woodfin et al. 2007). O percentual da marcação endotelial pelo CD31/área de tecido examinada mostrou-se significativamente maior nos casos com miocardite ( $p=0,05$ ) em comparação com os casos sem miocardite, confirmando a importante associação do processo inflamatório induzido pelo DENV como potencializador dos efeitos angiogênicos de origem inflamatória e sua contribuição no aumento do extravasamento vascular.

### **Descrição da frequência e da intensidade de apoptose no tecido cardíaco nos casos fatais infectados pelo DENV**

A apoptose, também chamada de morte celular programada, é um evento que ocorre durante o desenvolvimento até o envelhecimento de uma célula, além de contribuir para a homeostase das populações celulares nos tecidos. É um processo controlado de morte celular, orquestrado por uma cascata de eventos bioquímicos, liderando com mudanças morfológicas e finalmente morte celular (Elmore 2007).

Duas vias, uma intrínseca e outra extrínseca, podem ativar a apoptose. Elas podem funcionar independentemente, porém existem muitas convergências, o que permite a amplificação do sinal de morte. Na via extrínseca, a célula responde a sinais dados através do ambiente pelos receptores de morte, como por exemplo, o Fas e o TNF-alfa, e na via intrínseca esses sinais são dados através da via mitocondrial. As duas vias de ativação culminam na ativação das caspases, uma classe específica de cisteína-protease, que clivam proteínas celulares, culminando na destruição celular. Os genes da família bcl-2 participam da via intrínseca e são de grande importância, pois codificam duas classes de proteínas: aquelas com

atividade anti-apoptótica, como o Bcl-2, e as com atividade pró-apoptóticas (Feig and Peter 2007).

A apoptose ocorreu em diferentes graus nos dois grupos, no entanto foi mais intensa nos casos de dengue sem miocardite. Alguns fatores são capazes de induzir a apoptose no tecido cardíaco, como a dilatação e a hipertrofia ventriculares. A dilatação ventricular quando aguda pode estar associada a elevação súbita da pressão diastólica final do VE, promovendo deslizamento de cardiomiócitos, com deslocamento de células em direção ao epicárdio. Esse deslocamento parece induzir a apoptose, ou seja, a morte celular é mediada por fenômeno mecânico que ativariam genes apoptóticos. A dilatação ventricular aguda também pode aumentar a expressão do Fas e elevar os níveis endógenos do superóxido nos cardiomiócitos, que por ser um radical livre causa dano direto às células ou, indiretamente, ativa genes envolvidos no apoptose. A apoptose já foi relatada em pacientes com insuficiência cardíaca (Cheng et al. 1995; Olivetti et al. 1997). A hipertrofia ventricular que ocorre em resposta à sobrecarga exercida pela hipertensão arterial sistêmica, causa alterações na circulação coronária, e está associada a alterações intersticiais, como hiperplasia de fibroblastos e aumento na deposição de colágeno (Hamet et al. 1995).

A morte celular que acompanha a hipertrofia era implicada à necrose que eventualmente poderia ocorrer por comprometimento do fluxo coronariano já mencionado. No entanto, mais recentemente a apoptose foi demonstrada em miócitos de ratos submetidos hipertensão arterial sistêmica crônica (Teiger et al. 1996).

A apoptose de cardiomiócitos também pode ocorrer em associação com distúrbios arritmogênicos, tendo sido demonstrada em modelos animais com uso de marcapasso para aumentar a frequência cardíaca (Liu et al. 1995). Esse fenômeno permitiu que fosse levantada a hipótese de morte por apoptose nos casos de dilatação atrial em pacientes com fibrilação atrial crônica (Haendchen 1998).

A apoptose é descrita em diversas infecções causadas por flavivírus. Mais do que isso, ela vem sendo responsável por um mecanismo citopatológico em resposta à infecção por DENV *in vitro* e *in vivo* sugerindo que, não só a infecção, mas também um ambiente inflamatório gerado possa contribuir para a indução de morte em células infectadas e/ou não (Limonta et al. 2007; Matsuda et al. 2005).

Recentemente, Torrentes-Carvalho e colaboradores observaram que a infecção pelo DENV-2 aumenta a expressão de Fas tanto em monócitos humanos infectados *in vitro* quanto em monócitos e linfócitos de pacientes DENV+ de fase aguda (Torrentes-Carvalho et al. 2014; Torrentes-Carvalho et al. 2009).

Além disso, comorbidades ou fatores de risco podem estar associados a um aumento da apoptose relacionada à infecção pelo DENV como por exemplo o *diabetes mellitus*. Sabe-se que há uma disfunção endotelial e uma produção exacerbada de citocinas no diabetes com níveis elevados de TNF, VEGF e MCP-1 . Em estudo de autópsias de cinco casos fatais por DENV-2 em 1997 demonstrou apoptose de células endoteliais da micro vasculatura do trato digestivo (Limonta et al. 2008).

Por fim, o processo inflamatório, a infecção pelo DENV, a hipertrofia cardíaca, as comorbidades como o diabetes mellitus, a obesidade e a isquemia cardíaca podem induzir a apoptose. Para melhor compreensão da sua repercussão sobre o miocárdio precisaríamos fazer um estudo pareado onde todos esses fatores fossem levados em consideração na amostra.

### **Deteccção das proteínas NS1 e NS3 no tecido cardíaco de casos fatais infectados pelo DENV**

No presente estudo, o antígeno NS1 foi detectado em macrófagos do tecido cardíaco por imuno-histoquímica em 41 dos 117 casos fatais por dengue examinados e em 36% dos casos de miocardite e 66% dos casos sem miocardite. De fato, Lima et al 2011 sugeriram o coração como um órgão adequado para a deteção da proteína NS1. Estudos recentes demostram o papel patogênico da proteína NS1 na infecção pelo DENV (Beatty et al. 2015; Modhiran et al. 2015). A proteína NS1 na forma secretada forma imunocomplexos podendo ativar a via do sistema complemento, contribuindo na patogênese (Avirutnan et al. 2006; Cheng et al. 2009). De fato, a proteína do capsídeo NS1 e o RNA viral foram identificados por RT-PCR em amostras do tecido cardíaco de casos fatais de dengue, assim como em outros tecidos tais como fígado, pulmão, baço e linfonodos (de Araújo et al. 2009; Lima et al. 2011).

A replicação viral foi investigada pela deteção da proteína NS3 no tecido cardíaco por imunohistoquímica. Os resultados revelaram de fato, a presença da

NS3 no tecido cardíaco dos casos fatais com miocardite e sem miocardite. A NS3, assim como RNA de fita negativa, foram observados nos macrófagos alveolares, nas células endoteliais e nos pneumócitos indicando que o DENV é capaz de se replicar nestes sítios (Balsitis et al. 2009; Jessie et al. 2004). Póvoa e colaboradores detectaram a presença da NS3 no coração de casos fatais de dengue corroborando os resultados encontrados neste estudo (Póvoa et al. 2014).



## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho revelou uma alta prevalência de miocardite em casos fatais de dengue, demonstrando um aumento da sensibilidade do diagnóstico com o uso da imunohistoquímica quando comparado com o uso da coloração pelo H&E.

Os sorotipos DENV-1, DENV-3 e DENV-4 foram detectados nos pacientes com miocardite demonstrando o potencial destes na indução de formas graves do DENV associadas com comprometimento cardíaco.

Não foram encontradas diferenças nas manifestações clínicas ou nos parâmetros laboratoriais entre grupos estudados. No entanto, a hospitalização foi mais frequente nos pacientes com miocardite em concordância com estudos prévios.

Intenso infiltrado inflamatório mononuclear foi encontrado nos casos com miocardite e com maior frequência de células CD68, alvos do DENV, sugerindo o envolvimento destas células na patogênese da miocardite induzida pelo DENV.

Análises histopatológicas revelaram áreas com edema, hemorragia e necrose do tecido cardíaco, porém a hemorragia e a necrose foram significativamente maiores nos pacientes com miocardite.

Os resultados demonstraram presença edema no tecido miocárdico nos casos com e sem miocardite, demonstrando que este é um achado comum nos casos graves independentemente de suas complicações.

Células marcadas por TUNEL foram encontradas no tecido cardíaco dos casos fatais infectados pelo DENV, tanto nos com miocardite como nos sem miocardite, com contagens significativamente maiores nos tecidos obtidos de pacientes sem miocardite, sugerindo a indução da apoptose celular no tecido cardíaco durante a infecção.

As manifestações clínicas dos pacientes com dengue e estudos post-mortem fornecem importantes informações sobre a fisiopatologia da infecção, embora existam ainda muitas lacunas quanto os mecanismos envolvidos na miocardite. Nossos resultados sugeriram que o coração é alvo da infecção pelo DENV com intenso processo inflamatório induzido provavelmente pela resposta imune do paciente.



## 7 PERSPECTIVAS

O presente trabalho científico construiu um robusto material de pesquisa que possibilitará o aprofundamento de várias linhas de estudo sobre a miocardite na dengue, ajudando no melhor entendimento da miocardite nas viroses em geral e norteando futuros testes para explicar a lesão.

Diante da pandemia de dengue, houve o aparecimento de formas atípicas da doença e uma variação da gravidade que depende de múltiplos fatores, seja do vírus e/ou das populações. Assim, um maior conhecimento da patogenia de manifestações cardíacas, torna-se imperioso para o efetivo controle dos possíveis e terríveis impactos dessa enfermidade negligenciada.

Os resultados aqui apresentados chamam a atenção para a grande prevalência da miocardite em nosso meio e, conseqüentemente, seu subdiagnóstico. Inexistência de suspeição diagnóstica na abordagem clínica dos pacientes graves, e 15% de subdiagnóstico dos exames realizados apenas com a investigação histopatológica. Em se tratando de regiões que apresentam quadros epidêmicos, levando em conta a limitação econômica para a ampliação de técnicas imunohistoquímicas, e a despeito das várias críticas à clássica técnica diagnóstica de Dallas, sugerimos um melhor aprimoramento da mesma. O material existente poderia ser norteador para a inclusão de critérios mais quantitativos que diminuísse a variação técnico-dependente, para podermos diminuir uma possível subnotificação, e assim estimar melhor a prevalência da doença.

Em termos de controle da morbi-mortalidade da doença em nosso meio, e em virtude da grande e destoante letalidade da dengue grave no Ceará, o reconhecimento da alta prevalência da miocardite na amostra estudada, impõe ação das entidades médicas (Conselho Federal de Medicina/Projeto Diretrizes e da Sociedade Brasileira de Cardiologia) e de órgãos governamentais como o Ministério da Saúde, a revisão dos fluxogramas e protocolos de conduta clínica dos pacientes com dengue grave, no sentido de implementar uma propedêutica efetiva para identificação de manifestações cardíacas e, conseqüentemente seu manejo adequado.

## 8 REFERÊNCIAS

Abbas, A.K., Fausto, N, Kumar VR& C. Patologia - Bases Patológicas da Doenças. 8<sup>a</sup>. Elsevier, editor. Rio de Janeiro; 2008.

Alexander N, Balmaseda A, Coelho ICB, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop. Med. Int. Heal.* [Internet]. 2011 Aug;16(8):936–48. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3156.2011.02793.x>

Araujo FMC, Brilhante RSN, Cavalcanti LPG, Rocha MFG, Cordeiro RA, Perdigão ACB, et al. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* [Internet]. 2011 Oct;177(1):128–31. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093411002916>

de Araújo JMG, Schatzmayr HG, de Filippis AMB, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J. Virol. Methods* [Internet]. 2009 Jan;155(1):34–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951921>

Araújo VEM de, Bezerra JMT, Amâncio FF, Passos VM de A, Carneiro M. Increase in the burden of dengue in Brazil and federated units, 2000 and 2015: analysis of the Global Burden of Disease Study 2015. *Rev. Bras. Epidemiol.* [Internet]. 2017 May;20Suppl 01(Suppl 01):205–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28658384>

Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum. Pathol.* [Internet]. 1987 Jun;18(6):619–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177\(87\)80363-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(87)80363-5)

Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* [Internet]. 1987 Jan;1(1):3–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3455232>

Arora M, Patil RS. Cardiac Manifestation in Dengue Fever. *J. Assoc. Physicians India* [Internet]. 2016 Jul;64(7):40–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27759341>

Aslam M, Aleem NA, Zahid MF, Rahman AJ. Unusual Presentation of Dengue Fever: A child with acute myocarditis. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* [Internet]. 2016 Feb 2;16(1):e101-104. Available from: <http://squmj.org/index.php/squmj/article/view/54>

Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *J. Infect. Dis.* [Internet]. 2006 Apr 15;193(8):1078–88. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/500949>

Azeredo EL, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM. Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators. *Mediators Inflamm.* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:313842. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999666>

Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in

patients with dengue fever. *Immunobiology* [Internet]. 2001 Dec;204(4):494–507. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11776403>

Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect. Ecol. Epidemiol.* [Internet]. 2013 Aug 30;3(1):19839. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/iee.v3i0.19839>

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.* [Internet]. 2009 Mar;80(3):416–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270292>

Basso C, Calabrese F, Angelini A, Carturan E, Thiene G. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail. Rev.* [Internet]. 2013 Nov 25;18(6):673–81. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10741-012-9355-6>

Baughman KL. Diagnosis of Myocarditis: Death of Dallas Criteria. *Circulation* [Internet]. 2006 Jan 31;113(4):593–5. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.589663>

Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci. Transl. Med.* [Internet]. 2015 Sep 9;7(304):304ra141-304ra141. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355030>

Bich TD, Pham OKN, Hai DHT, Nguyen NM, Van HN, The TD, et al. A pregnant woman with acute cardiorespiratory failure: Dengue myocarditis. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;385(9974):1260. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60239-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60239-2)

Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect. Dis.* [Internet]. 2008 Dec 25;8(1):86. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-8-86>

Brasil M da S. *Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose*. 2 ed. Brasil M da S, editor. Brasília; 2008.

Brasil M da S. *Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde*. Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde. 2011.

Brasil M da S. *Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança* [Internet]. 5. ed. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância à Saúde, Departamento de Doenças Transmissíveis, editors. Brasília; 2016. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/dengue-manejo-adulto-crianca-5d.pdf>

Burke A, Tavora F. *Practical Cardiovascular Pathology*. 1st ed. Kluwer W, Lippincott W, Wilkins, editors. Philadelphia; 2011.

Burke AP, Saenger J, Mullick F, Virmani R. Hypersensitivity myocarditis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* [Internet]. 1991 Aug;115(8):764–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1863186>

Byard RW. Lethal Dengue Virus Infection. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* [Internet]. 2016 Jun;37(2):74–8. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27093563>

Caforio ALP, Marcolongo R, Basso C, Iliceto S. Clinical presentation and diagnosis of myocarditis. *Heart* [Internet]. 2015;101(16):1332–44. Available from: <http://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/heartjnl-2014-306363>

Caforio ALP, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* [Internet]. 2013 Sep 1;34(33):2636–48, 2648a–2648d. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824828>

Castro-Mussot ME, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, Salazar MI. Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue. *Gac. Med. Mex.* 2013;149(5):531–40.

Castro MC, Wilson ME, Bloom DE. Disease and economic burdens of dengue. *Lancet Infect. Dis.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017 Mar;17(3):e70–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30545-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30545-X)

Cavalcanti LP de G, Braga DN de M, da Silva LMA, Aguiar MG, Castiglioni M, Silva-Junior JU, et al. Postmortem Diagnosis of Dengue as an Epidemiological Surveillance Tool. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* [Internet]. 2016 Jan 6;94(1):187–92. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.15-0392>

Cavalcanti LP de G, Mota LAM, Lustosa GP, Fortes MC, Mota DAM, Lima AAB, et al. Evaluation of the WHO classification of dengue disease severity during an epidemic in 2011 in the state of Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 2014 Feb;109(1):93–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626308>

Ceará. SESA. Pesquisa para o SUS Ceará: coletânea de artigos do PPSUS [Internet]. GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ-SESA, editor. FORTALEZA; 2016. Available from: <http://www.saude.ce.gov.br/index.php/downloads/category/58-livros-revistas-e-folderes-?download=2813%3Arevista-pesquisa-para-o-sus-ceara-no-4->

Ceará S. Boletim Epidemiológico – Dengue [Internet]. 2016 [cited 2017 Jun 20]. Available from: <http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins?download=2540%3Aboletim->

Ceará S. Boletim Epidemiológico [Internet]. Secr. SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. 2017. p. 1–13. Available from: <http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>

Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J. Med. Res.* [Internet]. 2006 Jan;123(1):25–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567864>

Chau TNB, Quyen NTH, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NTP, et al. Dengue in Vietnamese Infants—Results of Infection-Enhancement Assays Correlate with Age-Related Disease Epidemiology, and Cellular Immune Responses Correlate with Disease Severity. *J. Infect. Dis.* [Internet]. 2008 Aug 15;198(4):516–24. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/590117>

Chen H-R, Chuang Y-C, Chao C-H, Yeh T-M. Macrophage migration inhibitory factor induces vascular leakage via autophagy. *Biol. Open* [Internet]. 2015 Feb

15;4(2):244–52. Available from: <http://bio.biologists.org/cgi/doi/10.1242/bio.201410322>

Chen WJ, Hwang KP, Fang AH. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* [Internet]. 1991 Dec;22(4):659–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1820657>

Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J. Virol.* [Internet]. 1996 Dec;70(12):8765–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971005>

Cheng H-J, Lei H-Y, Lin C-F, Luo Y-H, Wan S-W, Liu H-S, et al. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Mol. Immunol.* [Internet]. 2009 Dec;47(2–3):398–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822367>

Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J. Clin. Invest.* [Internet]. 1995 Nov 1;96(5):2247–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593611>

Chuang Y-C, Lin Y-S, Liu H-S, Yeh T-M. Molecular Mimicry between Dengue Virus and Coagulation Factors Induces Antibodies To Inhibit Thrombin Activity and Enhance Fibrinolysis. *J. Virol.* [Internet]. 2014 Dec 1;88(23):13759–68. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02166-14>

Chuang Y-C, Wang S-Y, Lin Y-S, Chen H-R, Yeh T-M. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *J. Biomed. Sci.* [Internet]. *Journal of Biomedical Science*; 2013;20(1):42. Available from: <http://www.jbiomedsci.com/content/20/1/42>

Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection. *Am. J. Pathol.* [Internet]. 2013 Jun;182(6):1950–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000294401300206X>

Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Hénin D, et al. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum. Pathol.* [Internet]. 1999 Sep;30(9):1106–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10492047>

Cucunawangsih, Lugito N. Trends of Dengue Disease Epidemiology. *Virol. Res. Treat.* [Internet]. 2017;8(0). Available from: <http://insights.sagepub.com/trends-of-dengue-disease-epidemiology-article-a6220>

De-Oliveira-Pint LM, Marinho CF, Povoia TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LDR, 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).

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J. Virol. Methods* [Internet]. 2004 Nov;121(2):171–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093404001879>

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with downregulation of vascular endothelial cadherin. *J. Gen. Virol.* [Internet]. 2008 Mar

- 1;89(3):642–52. Available from:  
<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.83356-0>
- Ebi KL, Nealon J. Dengue in a changing climate. *Environ. Res.* [Internet]. Elsevier; 2016;151:115–23. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.026>
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* [Internet]. 2007 Jun;35(4):495–516. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>
- Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, et al. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* [Internet]. 2006 Apr 12;13(4):372–3. Available from:  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb1073>
- Faria NR da C, Nogueira RMR, de Filippis AMB, Simões JBS, Nogueira F de B, da Rocha MQL, et al. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. Powers AM, editor. *PLoS Negl. Trop. Dis.* [Internet]. 2013 Mar 14;7(3):e2095. Available from:  
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002095>
- Feig C, Peter M. How apoptosis got the immune system in shape. *Eur. J. Immunol.* [Internet]. 2007 Nov;37(S1):S61–70. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200737462>
- Furuta T, Murao LA, Lan NTP, Huy NT, Huong VTQ, Thuy TT, et al. Association of Mast Cell-Derived VEGF and Proteases in Dengue Shock Syndrome. Guzman MG, editor. *PLoS Negl. Trop. Dis.* [Internet]. 2012 Feb 21;6(2):e1505. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001505>
- Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Pinto LM de O, Smith N, Despres P, et al. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN- $\alpha$  production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* [Internet]. 2013;7(6):e2257. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23755314>
- Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin E V, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 1989 May 25;17(10):3889–97. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2543956>
- Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanaroj S, Nimmannitya S, Nisalak A, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* [Internet]. 1999 Nov;180(5):1429–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515800>
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* [Internet]. 1998 Jul;11(3):480–96. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665979>
- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* [Internet]. 2002 Feb;10(2):100–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827812>
- Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found. Symp.* [Internet]. 2006;277:3-16-22, 71–3, 251–3. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319151>



Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* [Internet]. 1984 Jan;33(1):158–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6364855>

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* [Internet]. 1988 May;96(5):379–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3288247>

Gutiérrez G, Gresh L, Pérez MÁ, Elizondo D, Avilés W, Kuan G, et al. Evaluation of the Diagnostic Utility of the Traditional and Revised WHO Dengue Case Definitions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7(8):1–9.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* [Internet]. 2010 Dec;8(12):S7–16. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2460>

Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet* [Internet]. 2015 Jan;385(9966):453–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614605729>

Haendchen RV. Apoptose miocárdica. Um novo mecanismo de morte celular. *Arq. Bras. Cardiol.* [Internet]. 1998 Jan;70(1):65–8. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X1998000100014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X1998000100014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

Hamet P, Richard L, Dam T-V V, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* [Internet]. 1995 Oct 1;26(4):642–8. Available from: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.HYP.26.4.642>

Harris E, Videá 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.* [Internet]. 2015;63(1–2):5–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357995>

Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin. Proc.* [Internet]. 1989 Oct;64(10):1235–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2593714>

He Z, Zhu X, Wen W, Yuan J, Hu Y, Chen J, et al. Dengue Virus Subverts Host Innate Immunity by Targeting Adaptor Protein MAVS. Jung JU, editor. *J. Virol.* [Internet]. 2016 Aug 15;90(16):7219–30. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00221-16>

Hurtado-Melgoza ML, Ramos-Ligonio A, Álvarez-Rodríguez LM, Meza-Menchaca T, López-Monteon A. Differential humoral and cellular immunity induced by vaccination using plasmid DNA and protein recombinant expressing the NS3 protein of dengue virus type 3. *J. Biomed. Sci.* [Internet]. *Journal of Biomedical Science*; 2016 Dec 1;23(1):85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27903271>

Iglesias NG, Filomatori C V., Gamarnik A V. The F1 Motif of Dengue Virus Polymerase NS5 Is Involved in Promoter-Dependent RNA Synthesis. *J. Virol.* [Internet]. 2011 Jun 15;85(12):5745–56. Available from:

<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02343-10>

Inyoo S, Suttitheptumrong A, Pattanakitsakul S. Synergistic Effect of TNF- $\alpha$  and Dengue Virus Infection on Adhesion Molecule Reorganization in Human Endothelial Cells. *Jpn. J. Infect. Dis.* [Internet]. 2017;70(2):186–91. Available from:

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub\\_JJID.2016.123/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub_JJID.2016.123/_article)

Jain B, Chaturvedi UC, Jain A. Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; An overview. *Microb. Pathog.* [Internet]. 2014 Apr;69–70:45–52. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401014000370>

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.* [Internet]. 2004 Apr 15;189(8):1411–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073678>

John DV, Lin Y-S, Perng GC. Biomarkers of severe dengue disease - a review. *J. Biomed. Sci.* [Internet]. *Journal of Biomedical Science*; 2015 Oct 14;22(1):83. Available from: <http://www.jbiomedsci.com/content/22/1/83>

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS, Icrobiol JCLINM. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *New York* [Internet]. 2005 Oct 1;43(10):4977–83. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005>

Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, et al. Dengue Virus Inhibits Alpha Interferon Signaling by Reducing STAT2 Expression. *J. Virol.* [Internet]. 2005 May 1;79(9):5414–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827155>

Junqueira, L. C.; Carneiro J. *Histologia básica: texto & atlas*. 12<sup>a</sup>. Guanabara Koogan, editor. Rio de Janeiro; 2013.

Kao C-L, King C-C, Chao D-Y, Wu H-L, Chang G-JJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* [Internet]. 2005 Feb;38(1):5–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15692621>

Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* [Internet]. 1999 Mar 2;99(8):1091–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10051305>

Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, et al. Update on myocarditis. *J. Am. Coll. Cardiol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;59(9):779–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.074>

Kirawittaya T, Yoon IK, Wichit S, Green S, Ennis FA, Gibbons R V., et al. Evaluation of cardiac involvement in children with dengue by serial echocardiographic studies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9(7):1–17.

Ku Y-H, Yu W-L. Fatal Dengue Myocarditis despite the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Case Rep. Infect. Dis.* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016:5627217. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28018687>

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev S V, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* [Internet]. 2002 Mar 8;108(5):717–25. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893341>

Kytö V, Saraste A, Voipio-Pulkki L-M, Saukko P. Incidence of fatal myocarditis: a population-based study in Finland. *Am. J. Epidemiol.* [Internet]. 2007 Mar 1;165(5):570–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237135>

Lan NTP, Hirayama K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Trop. Med. Health* [Internet]. 2011 Dec;39(4 Suppl):73–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500139>

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam A V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* [Internet]. 1992 Mar;30(3):545–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372617>

Lee C-H, Teo C, Low AF. Fulminant dengue myocarditis masquerading as acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* [Internet]. 2009 Aug;136(3):e69–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016752730800733X>

Lee I-K, Lee W-H, Liu J-W, Yang KD. Acute myocarditis in dengue hemorrhagic fever: a case report and review of cardiac complications in dengue-affected patients. *Int. J. Infect. Dis.* [Internet]. International Society for Infectious Diseases; 2010 Oct;14(10):e919–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971210024549>

Lee Y-R, Liu M-T, Lei H-Y, Liu C-C, Wu J-M, Tung Y-C, 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.* [Internet]. 2006 Dec 1;87(12):3623–30. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.82093-0>

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J. Virol.* [Internet]. 1999 Jun;73(6):4738–47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=112516&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Leo Y-S, Gan VC, Ng E-L, Hao Y, Ng L-C, Pok K-Y, et al. Utility of warning signs in guiding admission and predicting severe disease in adult dengue. *BMC Infect. Dis.* [Internet]. 2013 Dec 24;13(1):498. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-498>

Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J. Virol.* [Internet]. 1999 Apr;73(4):3108–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074162>

Li Y, Hu Z, Huang Y, Li J, Hong W, Qin Z, et al. Characterization of the Myocarditis during the worst outbreak of dengue infection in China. *Medicine (Baltimore).* [Internet]. 2016 Jul;95(27):e4051. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201607050-00031>

Libraty DH, Endy TP, Houg H-SH, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity

in secondary dengue-3 virus infections. *J. Infect. Dis.* [Internet]. 2002 May 1;185(9):1213–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001037>

Lima M da RQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, de Filippis AMB, Limonta D, dos Santos FB. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. *PLoS Negl. Trop. Dis.* [Internet]. 2011 May 3;5(5):e1147. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572520>

Limonta D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Guzmán MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J. Clin. Virol.* [Internet]. 2007 Sep;40(1):50–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138665320700159X>

Limonta D, Falcón V, Torres G, Capó V, Menéndez I, Rosario D, et al. Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. *Infection* [Internet]. 2012 Dec 20;40(6):689–94. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s15010-012-0260-7>

Limonta D, Torres G, Capó V, Guzmán MG. Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* [Internet]. 2008 Sep;5(3):213–4. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3132/dvdr.2008.034>

Lin C-F, Wan S-W, Cheng H-J, Lei H-Y, Lin Y-S. Autoimmune Pathogenesis in Dengue Virus Infection. *Viral Immunol.* [Internet]. 2006 Jun;19(2):127–32. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vim.2006.19.127>

Lin T-C, Lee H-C, Lee W-H, Su H-M, Lin T-H, Hsu P-C. Fulminant dengue myocarditis complicated with profound shock and fatal outcome under intra-aortic balloon pumping support. *Am. J. Emerg. Med.* [Internet]. 2015 Nov;33(11):1716.e1-1716.e3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735675715001837>

Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, et al. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab. Invest.* [Internet]. 1995 Dec;73(6):771–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558838>

Loke H, Bethell D, Phuong CXT, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: Evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and FCγ receptor IIA genes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;67(1):102–6.

Londono-Renteria B, Marinez-Angarita JC, Troupin A, Colpitts TM. Role of Mast Cells in Dengue Virus Pathogenesis. *DNA Cell Biol.* [Internet]. 2017 Jun;36(6):423–7. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/dna.2017.3765>

Löwy I. Leaking Containers: Success and Failure in Controlling the Mosquito *Aedes aegypti* in Brazil. *Am. J. Public Health* [Internet]. 2017 Apr;107(4):517–24. Available from: <http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.2017.303652>

Marques LC, Paula RS de, Camilo IL, Aiello VD. Case 1/2017 - 26-Year-old Male with Rapidly Progressive Heart Failure. *Arq. Bras. Cardiol.* [Internet]. 2017 Feb;108(2):173–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28327870>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5344664>

Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue Virus Pathogenesis: an

Integrated View. *Clin. Microbiol. Rev.* [Internet]. 2009a Oct 1;22(4):564–81. Available from: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00035-09>

Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. *Clin. Microbiol. Rev.* [Internet]. 2009b Oct 1;22(4):564–81. Available from: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00035-09>

Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol. Rev.* [Internet]. 2008 Oct;225(1):300–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00678.x>

Matsuda T, Almasan A, Tomita M, Tamaki K, Saito M, Tadano M, et al. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Gen. Virol.* [Internet]. 2005 Apr;86(Pt 4):1055–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784899>

Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira A V, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin. Neuropathol.* [Internet]. 1997;16(4):204–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9266146>

Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 2007 Mar 23;282(12):8873–82. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M609919200>

Miranda CH, Borges M de C, Schmidt A, Pazin-Filho A, Rossi MA, Ramos SG, et al. A case presentation of a fatal dengue myocarditis showing evidence for dengue virus-induced lesion. *Eur. Hear. J. Acute Cardiovasc. Care* [Internet]. 2013a Jun;2(2):127–30. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2048872613475889>

Miranda CH, Borges MDC, Matsuno AK, Vilar FC, Gali LG, Volpe GJ, et al. Evaluation of Cardiac Involvement During Dengue Viral Infection. *Clin. Infect. Dis.* [Internet]. 2013b Sep 15;57(6):812–9. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cit403>

Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci. Transl. Med.* [Internet]. 2015 Sep 9;7(304):304ra142. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355031>

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* [Internet]. 2004 Jan 22;427(6972):313–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02165>

Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* [Internet]. 2001 Apr;30(3):229–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11335143>

Nagaratnam N, Siripala K, de Silva N. Arbovirus (dengue type) as a cause of acute myocarditis and pericarditis. *Br. Heart J.* [Internet]. 1973 Feb;35(2):204–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=458589&tool=pmcentrez&r>

endertype=abstract

Nigam AK, Singh O, Agarwal A, Singh AK, Yadav S. Transient 2<sup>nd</sup> Degree Av Block Mobitz Type II: A Rare Finding in Dengue Haemorrhagic Fever. *J. Clin. Diagnostic Res.* 2015;9(5):OD12-OD13.

Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Vaughn DW. Serotype-Specific Dengue Virus Circulation and Dengue Disease in Bangkok , Thailand From 1973 To 1999. 2003;68(2):191–202.

Noisakran S, Chokeyphaibulkit K, Songprakhon P, Onlamoon N, Hsiao H-M, Villinger F, et al. A Re-evaluation of the Mechanisms Leading to Dengue Hemorrhagic Fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* [Internet]. 2009 Sep;1171(SUPPL. 1):E24–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2009.05050.x>

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the Failing Human Heart. *N. Engl. J. Med.* [Internet]. 1997 Apr 17;336(16):1131–41. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199704173361603>

Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol. Cell Biol.* [Internet]. 2007 Jan 28;85(1):43–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/sj.icb.7100008>

Pichyangkul S, Endy TP, Kalayanarooj S, Nisalak A, Yongvanitchit K, Green S, et al. A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J. Immunol.* [Internet]. 2003 Nov 15;171(10):5571–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607965>

Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat. Q.* 1997;50(3–4):161–9.

Póvoa TF, Alves AMB, Oliveira CAB, Nuovo GJ, Chagas VLA, Paes M V. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: Histopathology, ultrastructure and virus replication. Jin X, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Apr 15;9(4):e83386. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0083386>

Punyadee N, Mairiang D, Thiemmecca S, Komoltri C, Pan-Ngum W, Chomanee N, et al. Microparticles provide a novel biomarker to predict severe clinical outcomes of dengue virus infection. García-Sastre A, editor. *J. Virol.* [Internet]. 2015 Feb 1;89(3):1587–607. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410854>

Redinger RN. The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)*. [Internet]. 2007 Nov 1;3(11):856–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960798>

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* [Internet]. 1996 Mar 1;93(5):841–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598070>

Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal Antibody Mapping of the Envelope Glycoprotein of the Dengue 2 Virus, Jamaica. *Virology* [Internet]. 1998 Jul;246(2):317–28. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682298992005>

Rose NR. Viral myocarditis. *Curr. Opin. Rheumatol.* [Internet]. 2016 Jul;28(4):383–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27166925>

Rothman AL, Medin CL, Friberg H, Currier JR. Immunopathogenesis versus Protection in Dengue Virus Infections. *Curr. Trop. Med. Reports* [Internet]. 2014 Mar 22;1(1):13–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40475-013-0009-0>

Satarasinghe RL, Arulnithy K, Amerasena NL, Bulugahapitiya U, Sahayam D V. Asymptomatic myocardial involvement in acute dengue virus infection in a cohort of adult Sri Lankans admitted to a tertiary referral centre. *Br. J. Cardiol.* 2007;14(3):171–3.

Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, Ferrans VJ, Fenoglio JJ, Edwards WD, et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* [Internet]. 1987 Feb;75(2):401–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3802444>

Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011;84(2):200–7.

Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Stanaway JD. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect. Dis.* [Internet]. 2016 Aug;16(8):935–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916001468>

Shivanthan MC, Navinan MR, Constantine GR, Rajapakse S. Cardiac involvement in dengue infection. *J. Infect. Dev. Ctries.* [Internet]. 2015;9(4). Available from: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/6200>

Singhi S, Kisson N, Bansal A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *J. Pediatr. (Rio. J.)*. [Internet]. 2007 Jun 1;83(2 Suppl):S22–35. Available from: [http://www.jped.com.br/conteudo/Ing\\_resumo.asp?varArtigo=1622&cod=&idSecao=3](http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=1622&cod=&idSecao=3)

Srikiatkachorn A, Green S. Markers of Dengue Disease Severity. 2010. p. 67–82. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-02215-9\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-02215-9_6)

Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet. Infect. Dis.* [Internet]. 2016 Jun;16(6):712–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916000268>

Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J. Clin. Invest.* [Internet]. 1996 Jun 15;97(12):2891–7. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/118747>

Teixeira M da G, Barreto ML. Porque Devemos, de Novo, Erradicar o Aedes Aegypti. *Cien. Saude Colet.* [Internet]. 1996;1(1):122–36. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81231996000100122&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81231996000100122&lng=pt&tlng=pt)

Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SRI, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009 Dec;104(8):1091–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140369>

Torres AF, Braga DN, Muniz F, Mendonça C, Oliveira DN, de Souza ET, et al. Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue. *Immunobiology* [Internet]. 2014 May;219(5):329–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508270>

Torres EM, Anaya ACP, Sandoval EBP. ¿Por qué y cómo mueren los niños con dengue? *Rev Cuba. Med Trop* [Internet]. 2008;60(1):0. Available from: [http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol60\\_1\\_08/mtr06108.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol60_1_08/mtr06108.htm)

Torres EM, Anaya ACP, Sandoval EBP. ¿Por qué y cómo mueren los niños con dengue? *Rev Cuba. Med Trop* [Internet]. 2008;60(1):0. Available from: [http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol60\\_1\\_08/mtr06108.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol60_1_08/mtr06108.htm)

Umareddy I. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J. Gen. Virol.* [Internet]. 2006 Sep 1;87(9):2605–14. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.81844-0>

Vasconcelos PF, de Menezes DB, Melo LP, Pessoa ET, Rodrigues SG, da Rosa ES, et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1995. p. 253–5.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* [Internet]. 2000 Jan;181(1):2–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608744>

Viana DV, Ignotti E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. *Rev. Bras. Epidemiol.* [Internet]. 2013;16(2):240–56. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-790X2013000200240&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2013000200240&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* [Internet]. 1999 Oct;354(9188):1431–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673699040155>

Weerakoon KG, Kularatne SA, Edussuriya DH, Kodikara SK, Gunatilake LP, Pinto VG, et al. Histopathological diagnosis of myocarditis in a dengue outbreak in Sri Lanka, 2009. *BMC Res. Notes* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;4(1):268. Available from: <http://bmcrsnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-4-268>

WHO WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. [Internet]. 2nd ed. WHO, editor. Geneva; 1997. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41988/3/9241542098\\_rus.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41988/3/9241542098_rus.pdf)

WHO WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control [Internet]. Office WHOR, editor. Dengue Guidel. Diagnosis, Treat. Prev. Control New Ed. 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762963>

Wilder-Smith A, Murray, Quam M. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin. Epidemiol.* [Internet]. 2013 Aug;5(1):299. Available from: <http://www.dovepress.com/epidemiology-of-dengue-past-present-and-future-prospects-peer-reviewed-article-CLEP>



Wiwanitkit V. Dengue myocarditis, rare but not fatal manifestation. *Int. J. Cardiol.* [Internet]. 2006 Sep;112(1):122. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016752730501257X>

Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* [Internet]. 2007 Dec 1;27(12):2514–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17872453>

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat. Med.* [Internet]. 2000 Jul;6(7):816–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888933>

Yacoub S, Wertheim H, Simmons CP, Screaton G, Wills B. Cardiovascular manifestations of the emerging dengue pandemic. *Nat. Rev. Cardiol.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 Apr 8;11(6):335–45. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrcardio.2014.40>

Yu I-M, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science* (80-. ). [Internet]. 2008 Mar 28;319(5871):1834–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1153264>

Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat. Struct. Biol.* [Internet]. 2003 Nov 5;10(11):907–12. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nsb990>

Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* [Internet]. 2013 Dec 16;20(1):105–10. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nsmb.2463>

Zompi S, Harris E. Original antigenic sin in dengue revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2013 May 28;110(22):8761–2. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1306333110>

## 9 ANEXOS

### 9.1 Aprovação no Comitê de Ética



CEP INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA - IPADE  
FACULDADE CHRISTUS

---

Of. No. 078/2011

Protocolo do CEP: 078/2011

Pesquisador Responsável: Prof<sup>a</sup> Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

Título do Projeto: Principais achados clínico-patológicos das necropsias dos casos suspeitos de dengue, ocorridos em 2011 no Ceará.

Levamos ao conhecimento de V. Sa que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE analisou e **aprovou** o documento abaixo descrito na reunião do dia 22 (vinte e dois) de agosto de 2011.

- Cronograma das atividades (justificativa para as atividades que foram prolongadas).

Outrossim, gostaríamos de lembrar que:

1. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e suas justificativas.

Fortaleza, 01 de junho de 2012.

Antonio Ribeiro da Silva Filho  
Presidente

CEP/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE

*Lucia Maria Alexandre Falcão*  
0310612012

**CARTA DE APRESENTAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA AO  
CEP INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA – IPADE  
FACULDADE CHRISTUS**

Eu, Prof. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti, conforme orientação do CONEP, **reapresento** o Projeto Pesquisa "**Principais achados clínico-patológicos das necropsias dos casos suspeitos de dengue, ocorridos em 2011 no Ceará**" a este Comitê de Ética em Pesquisa – CEP.

Gostaríamos de **solicitar a prorrogação** do protocolo de pesquisa que deverá ser ampliado até dezembro de 2012.


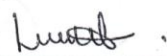
Segue anexo o projeto com as alterações do período no cronograma, nos critérios de inclusão (com 2012) e novo orçamento.

Reafirmamos que o referido projeto já havia sido aprovado, sem pendências, por esse CEP, conforme protocolo nº 078/2011 (anexo) e que nos foi recomendado encaminhar ao CEP para formalizar a prorrogação. Todos os colaboradores permanecem os mesmos, portanto não se fazendo necessário anexar novas declarações, conforme orientação do CEP/CONEP.

Fortaleza (CE), 14 de maio de 2012.

  
Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

Luciano Pamplona de Góes Cavalcante  
Coordenação Adjunta de Pesquisa e Extensão  
Curso de Medicina da Faculdade Christus

	Comitê de Ética em Pesquisa
Protocolo CEP/FChristus: <u>078 / 12</u>	
Data da Entrega: <u>14 / 05 / 12</u>	
Data da Reunião que será apreciado: <u>21 / 05 / 12</u> <span style="float: right;"></span>	

## 9.2 Carta de anuência do Laboratório Central do Estado do Ceará



GOVERNO DO  
ESTADO DO CEARÁ  
Secretaria da Saúde

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA-LACEN-CE

### CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá, Diretor do Laboratório Central do Ceará, LACEN-CE, declaro estar ciente e de acordo com a participação desta instituição na realização do projeto de pesquisa denominado, “**Alterações Histopatológicas Cardíacas em Casos Fatais de Dengue**”, desenvolvido pela doutoranda **Emília Tomé de Sousa**, CPF 315 810 483-00 do curso de Medicina Tropical – Doutorado Interinstitucional (DINTER) da Fundação Oswaldo Cruz com a Universidade Federal do Ceará. Essa aluna não possui vínculo empregatício ou funcional junto ao LACEN-CE.

Afirmo autorizar a referida pesquisadora, a utilização dos resultados de 01 de janeiro de 2011 a 31 de dezembro de 2013 da sorologia, RT-PCR e Imunoistoquímica dos casos de diagnóstico de Dengue que foram necropsiados no Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado do Estado do Ceará (SVO-CE).

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

Fortaleza, 16 de julho de 2014

  
Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá, CPF: 210.559.633-91  
Diretor do Laboratório Central – LACEN-CE.

---

Laboratório Central de Saúde Pública- LACEN-CE - Av. Barão de Studart, 2405  
Aldeota – Fortaleza / CE - CEP: 60.120-002  
Fone: 85- 3101.1472 / 3101.1480 - Fax: 3101.1485 – e-mail: lacen@lacen.ce.gov.br

### 9.3 Carta de anuência do Serviço de Verificação de óbitos Dr Rocha Furtado

#### CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, LUCIANO MONTEIRO FRANCO, Diretor Técnico do Serviço de Verificação de óbitos Dr. Rocha Furtado da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, declaro estar ciente e de acordo com a participação desta instituição na execução do projeto de pesquisa denominado “**Alterações histopatológicas cardíacas em casos fatais de Dengue**”, desenvolvido pela doutoranda Emília Tomé de Sousa, CPF 315810483-00, do curso de Medicina Tropical - doutorado interinstitucional (DINTER) da Fundação Oswaldo Cruz com a Universidade Federal do Ceará. Essa aluna não possui vínculo empregatício ou funcional junto ao Serviço de Verificação de óbitos Dr. Rocha Furtado.

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

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

Fortaleza, 9 julho de 2014.



**LUCIANO MONTEIRO FRANCO**

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

