

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS
ALTERAÇÕES CARDÍACAS EM UM MODELO
MURINO DE DENGUE (DENV-3)**

LUCAS MIRANDA KANGUSSU GOMES OLIVEIRA

BELO HORIZONTE

2012

LUCAS MIRANDA KANGUSSU GOMES OLIVEIRA

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS
ALTERAÇÕES CARDÍACAS EM UM MODELO
MURINO DE DENGUE (DENV-3)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura.

BELO HORIZONTE

2012

“ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES CARDÍACAS EM UM MODELO MURINO DE DENGUE (DENV-3)”.

Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **04 de abril de 2012**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DRA. MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE DOS SANTOS
DEPTO FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
ICB/UFMG



PROF. DR. FLÁVIO GUIMARÃES DA FONSECA
DEPTO DE MICROBIOLOGIA
ICB/UFMG



PROFA. DRA. DANIELLA BONAVENTURA
DEPTO DE FARMACOLOGIA
ICB/UFMG – ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 04 de abril de 2012.

**DEDICO ESTE TRABALHO À TIA BILÚ, VÓ DÉIA
E A MINHA MÃE PELO APOIO, INCENTIVO E AMOR INCONDICIONAIS.**

“

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

”

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar.

À Tia Bilú, pelo apoio incondicional. É difícil descrever em palavras o quanto você é especial e contribuiu para que eu chegasse até aqui. Não consigo expressar em palavras minha gratidão. Quantas saudades!

À Vó Déia, alicerce da minha vida, exemplo de ser humano, caráter e amor. Meu agradecimento eterno pelos seus ensinamentos. Quanta falta você me faz!

À minha mãe, um exemplo de coragem e superação, pelo apoio incondicional desde sempre.

Às minhas irmãs Lívia e Lígia, mesmo distantes sempre tão presentes! Obrigado pelas palavras de incentivo, apoio e carinho. Amo vocês!

À Patrícia, por ser a melhor namorada do mundo! Obrigado! Ato de agradecer, de demonstrar gratidão. Jeito de falar que você faz toda a diferença. Reconhecer, com o coração, que com você por perto a vida vira festa! Te Amo!

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente.

À minha orientadora, Profa. Dra. Daniella Bonaventura, sou-lhe eternamente grato pela oportunidade oferecida, pela base científica, por me dar a mão e me mostrar o melhor caminho a ser percorrido, por ser tão presente, pela acolhida, pela competência, pelo convívio, pelo carinho e pelos “puxões de orelha”! É difícil descrever em palavras o quanto você é especial!

À Profa. Dra. Danielle Souza, por disponibilizar a infra-estrutura do Laboratório de Interação Microorganismo Hospedeiro (LIMHO) para o desenvolvimento deste trabalho, por ter me acolhido como se eu fosse seu aluno, pelas discussões, pelo apoio, amizade e sinceridade. Você me apresentou a Imunofarmacologia! Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos, pela colaboração, pelas discussões, agradeço o interesse pelo trabalho.

Ao Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz, por contribuir com o desenvolvimento deste trabalho, pelos experimentos, discussões e interpretação dos resultados de eletrofisiologia.

À Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid, agradeço a disponibilidade, boa vontade, atenção e colaboração. Você contribuiu muito com as análises histopatológicas.

À Profa. Dra. Maria José Campagnole, por disponibilizar a estrutura do seu laboratório, sempre cordial e gentil.

À Profa. Dra. Roberta Lins Gonçalves, por ter me iniciado na pesquisa e me apresentado a Cardiologia básica e clínica, minha gratidão e admiração.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia pelos ensinamentos que foram complementares e fundamentais à minha formação e crescimento pessoal e profissional.

À Vivian Vasconcelos Costa, muito obrigado por ser tão presente, pelos ensinamentos, discussões e colaborações científicas. Devo parte deste trabalho ao seu apoio técnico e intelectual!

Ao Antônio Nei Godin, pela colaboração! Muito obrigado pelo auxílio nos experimentos de eletrofisiologia celular, pelas discussões, análises e interpretação dos resultados de patch clamp.

Ao Marcos Melo, pelo auxílio nos experimentos, análises e interpretação dos resultados de ecocardiografia.

Ao Dr. Frederico Marianetti Soriani, pela ajuda com a RT-PCR, discussões e agradável convivência.

Ao Dr. Celso Queiroz Júnior, pela colaboração! Obrigado pela ajuda com as histologias.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Vascular, Mariana Cirilo Diniz, João Almeida, Sílvia Maiello e Natália Araújo, pela convivência e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Interação Microorganismo Hospedeiro, por me receberem tão bem. Obrigado pelas dicas de bancada e por todo conhecimento que dividiram comigo.

À Vania Olivon, pelas contribuições científicas, e principalmente, pela amizade garantida para qualquer momento!

À Rosária Dias Aires e Maria Cecília Mariano, minha sincera gratidão pela amizade verdadeira, pelo apoio constante e divertidos momentos juntos!

Aos vizinhos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Profa. Dra. Daniele Aguiar, Prof. Dr. Fabrício Moreira, Ana Flávia Almeida e Thércia Guedes Viana pela agradável convivência e amizade.

Aos amigos da Pós-graduação pela convivência nos corredores e nas disciplinas, Marcelo Limborço, José Felipe Pinho da Silva, Lilian Muniz, Brisa Marina, Juliana Amaral, Paulo Lima, Lívia Resende, Lívia Tavares, Dani Bernardes, Talita Ferreira, Lucas Secchim, Raquel Arifa e Lindis Gomides.

Aos amigos do “Café da Fisiologia”, Zezé, Betinha, Flávio, Grace, Márcio e Andrea Haibara, obrigado pela companhia logo cedo, pelo bom dia!

Aos grandes amigos desta vida, Gustavo Kangussu, Rayan Botelho, Rossana Matos, Pedro Grapiuna, João Henrique Miranda, Thaiana Matos, Danilo Capivara, Sanny Miranda, Camila Miranda, André Lopes, Eugênio Guimarães e Jeferson Ferreira.

À coordenação e membros da Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, em especial, Cyntia Menezes e Nilda Laurindo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Vascular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE - *Antibody-dependent enhancement* - Intensificação dependente de Anticorpos

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

APC – *Antigen-presenting cell* – Célula apresentadora de antígenos

BSA – *Bovine serum albumin* – Albumina de soro bovino

CAT- Catalase

cDNA – DNA complementar

CEBIO - Centro de Bioterismo

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CCL2 (MCP-1) - *Monocyte chemoattractant protein-1* - Proteína quimiotática de monócitos-1

cm – centímetro – unidade de comprimento

CO₂ - Dióxido de carbono

CXCL1 (KC) - *keratinocyte derived chemokine*

DAB – Diaminobenzidina

DC- *Dendritic cells* – células dendríticas

DC-SIGN - *Dendritic cell- specific intracellular adhesion molecule 3(ICAM-3)-grabbing nonintegrin* - Molécula de adesão intracelular específica de células dendríticas-3

DENV- Vírus da Dengue

DENV-2 – vírus da Dengue sorotipo 2

DENV-3 - vírus da Dengue sorotipo 3

DL₅₀ - dose necessária para matar 50% de animais (Dose letal 50)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EDTA -*EthyleneDiamineTetracetic acid* - Ácido etilendiamino tetraacético

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay* - Ensaio imunoenzimático

EPM – Erro padrão da média

ERN - espécies reativas de nitrogênio

FC- frequência cardíaca

FD - febre do Dengue

FHD - febre hemorrágica do Dengue

g – grama – unidade de massa

GSH-Px - glutathione peroxidase

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

Hb – hemoglobina

HE - Hematoxilina-Eosina

HETAB - Hexadecil-Trimetil Brometo de Amônia

Hsp - *heat shock protein* – proteína do choque térmico

IFN-γ - interferon gamma

IL- () - *interleucin* – interleucina ()

iNOS - *Inducible Nitric Oxide Synthase* – Óxido nítrico sintase induzida

i.c. - intracerebral

i.p. - intraperitoneal

i.v. – intravenoso

M – molar – unidade de medida de concentração

MEM - *Modified Eagle's Medium*

min. – minutos – unidade de tempo

mL – mililitro – unidade de volume

µg/mL - micrograma por mililitro, unidade de medida de concentração

µL – microlitro – unidade de volume

mm² – milímetro quadrado – unidade de área

MPO – Mieloperoxidase

MTT - *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide Thiazole Blue*

n – número de repetições ou animais

NaCl - Cloreto de sódio

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAG- N-Acetil-β-D-Glicosaminidase

Na₂HPO₄- Fosfato de sódio

ND - não detectável

NI – não infectado

NK – *Natural Killer*

nm – nanômetro – unidade de comprimento

NO – *Nitric oxide* – Óxido nítrico

NOS – *Nitric Oxide Synthase*- Óxido nítrico sintase

°C - grau Celsius, escala de medida de temperatura

OD – *optical density* - Densidade óptica

OPD - *o-phenylenediamine dihydrochloride*

P.A – potencial de ação

PAS - pressão arterial sistólica

PBS - *phosphate-buffered saline* – Tampão fosfato salina

PCR- *polimerase chain reaction* – reação em cadeia polimerase

PFU – *Plaque forming unit* – unidade formadora de placas

pg – picograma – unidade de massa

p/v - peso por volume - unidade de medida de concentração

ROS - Reactive oxygen species - espécies reativas de oxigênio

SCD - Síndrome de choque do Dengue

RNA – Ácido ribonucléico

RE – Retículo endoplasmático

SFB - soro fetal bovino

SOD - superóxido dismutase

SVS- Secretaria de vigilância em saúde

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α - *Tumor necrosis factor-alfa* – Fator de necrose tumoral- α

U/mL - unidade por mililitro, unidade de medida de concentração

VE – Ventrículo esquerdo

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Mudança na distribuição dos sorotipos de dengue no mundo.....	32
Figura 02. Sorotipos de Dengue isolados no Brasil por estado, janeiro-agosto 2011.....	33
Figura 03. Ciclo de transmissão do vírus da Dengue.....	34
Figura 04. a) Microscopia eletrônica de linhagem de células derivadas de hepatócitos humanos (Huh7) infectadas por dengue vírus, 24 horas após a infecção b) partícula viral c) O genoma do vírus da dengue.....	36
Figura 05. Representação esquemática do contato inicial do DENV com o hospedeiro.....	37
Figura 06. Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da Dengue.....	39
Figura 07. Letalidade e perda de peso após infecção com DENV-3.....	72
Figura 08. Determinação da carga viral após infecção com a DL ₅₀ do vírus DENV-3 adaptado.....	73
Figura 09. Alterações hematológicas após infecção com DENV-3.....	75
Figura 10. Níveis de Mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil-β-D-Glicosaminidase (NAG) no pulmão, fígado e baço de animais NI e infectados com DENV-3.....	77
Figura 11. Avaliação de lesão hepática e hemorragia tecidual induzida pela infecção com DENV-3.....	78
Figura 12. Análise histológica de pulmões de animais infectados ou não com DENV-3.....	80
Figura 13. Níveis de citocinas e quimiocinas no soro de animais infectados ou não com DENV-3.....	81
Figura 14. Avaliação do perfil hemodinâmico.....	83

Figura 15. Avaliação da permeabilidade vascular em animais não infectados e infectados com DENV-3.....	84
Figura 16. Determinação da carga viral e níveis de MPO e NAG após infecção com DENV-3.....	86
Figura 17. Análise histológica de corações de animais infectados ou não com DENV-3.....	87
Figura 18. Imuno-histoquímica (IHQ) anti-NS3.....	88
Figura 19. Níveis de citocinas e quimiocinas no coração após infecção com DENV-3.....	89
Figura 20. Avaliação do estresse oxidativo no coração dos camundongos após infecção com DENV-3.....	91
Figura 21. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) no coração de animais NI e infectados com DENV-3.....	92
Figura 22. Avaliação da função cardíaca por ecocardiograma.....	94
Figura 23. Avaliação da função cardíaca por ecocardiograma.....	95
Figura 24. Fluxo mitral. Relação E/A.....	96
Figura 25. Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo provenientes de animais NI e infectados com DENV-3.....	98
Figura 26. Corrente de Cálcio ($I_{Ca,L}$) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animais NI e infectados com DENV-3.....	99

SUMÁRIO

I. Introdução.....	28
1.1 Dengue no mundo e nas Américas: aspectos históricos e epidemiológicos.....	29
1.2 Transmissão da doença.....	33
1.3 O vírus, a infecção e o ciclo de replicação dos DENV.....	35
1.4 Patogênese da doença.....	39
1.5 Dengue: características clínicas e diagnóstico.....	42
1.6 A resposta inflamatória na infecção pelo Dengue.....	44
1.7 Dengue: alterações cardíacas.....	46
II. Objetivo.....	49
2.1 Objetivo geral.....	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
III. Material e Métodos.....	51
3.1 Animais experimentais e indução da Dengue com o DENV-3.....	52
3.2 Vírus.....	52
3.3 Determinação da DL ₅₀ do vírus DENV-3.....	53
3.4 Titulação do vírus da Dengue.....	53
3.5 Avaliação de alterações hematológicas.....	55
3.5.1 Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes.....	55
3.5.2 Análise do hematócrito.....	55
3.5.3 Avaliação dos níveis da albumina plasmática.....	55
3.6 Determinação dos níveis das transaminases hepáticas no soro.....	56

3.7 Determinação da migração celular para tecidos alvos e quantificação de citocinas e quimiocinas.....	56
3.7.1 Dosagem da atividade de mieloperoxidase e N-Acetil-β-D-Glicosaminidase.....	56
3.7.2 Processamento dos tecidos para os ensaios de MPO e NAG.....	56
3.7.3 Dosagem da atividade da mieloperoxidase.....	57
3.7.4 Dosagem da atividade da N-Acetil-β-D-Glicosaminidase.....	58
3.7.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas.....	58
3.7.6 Processamento dos tecidos para quantificação de citocinas e quimiocinas.....	58
3.7.7 Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas.....	59
3.8 Quantificação da hemorragia intestinal e pulmonar através da dosagem de hemoglobina (Hb).....	60
3.9 Análise Histopatológica.....	60
3.9.1 Escore histopatológico.....	61
3.10 Avaliação de alterações hemodinâmicas.....	61
3.10.1 Avaliação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca.....	62
3.10.2 Avaliação da permeabilidade vascular.....	62
3.11 Imuno-histoquímica.....	63
3.12 Determinação do status redox cardíaco após a infecção experimental pelo DENV-3.....	63
3.12.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica no coração.....	63
3.12.2 Determinação da atividade enzimática da glutathione peroxidase no coração.....	64

3.12.3 Determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) no coração.....	64
3.12.4 Determinação da atividade enzimática da catalase no coração.....	65
3.12.5 Determinação da concentração de proteína nas amostras.....	65
3.12.6 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) no coração.....	65
3.13 Ecocardiograma de alta resolução.....	66
3.14 Eletrofisiologia celular.....	67
3.14.1 Isolamento dos cardiomiócitos.....	67
3.14.2 Estudo do potencial de ação de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo.....	68
3.14.3 Avaliação da corrente de cálcio no ventrículo esquerdo.....	68
3.15 Análise Estatística.....	69
IV. Resultados.....	70
4.1 Modelo de infecção experimental pelo vírus da Dengue (DENV-3).....	71
4.1.2 Padronização da curva de letalidade pelo vírus da Dengue (DENV-3)....	71
4.1.3 Determinação da carga viral no terceiro e sexto dia após a infecção com o inóculo de 01 PFU (DL ₅₀ do vírus).....	71
4.1.4 Avaliação das alterações hematológicas.....	74
4.1.5 Cinética da resposta inflamatória.....	76
4.1.6 Caracterização dos parâmetros hemodinâmicos após a infecção pelo DENV-3 adaptado.....	82
4.1.7 Caracterização da resposta inflamatória no coração.....	84

4.1.7.1 Avaliação da carga viral e migração de células para o coração de animais infectados com DENV-3.....	84
4.1.7.2 Análise de alterações histopatológicas no coração de animais infectados com DENV-3.....	85
4.1.7.3 Localização do vírus DENV-3 no coração de animais NI e infectados..	85
4.1.7.4 Análise do perfil de citocinas observadas no coração de animais infectados com DENV-3.....	88
4.1.8 Avaliação do status redox cardíaco dos animais após a infecção pelo DENV-3.....	90
4.1.9 Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos após a infecção pelo DENV-3.....	93
4.2 Avaliação de parâmetros eletrofisiológicos em cardiomiócitos após a infecção pelo DENV-3 adaptado.....	97
4.3 Sumário dos resultados.....	100
V. Discussão.....	102
VI. Conclusão.....	117
VII. Referências.....	119
VIII. Anexo.....	141
Artigo desenvolvido durante o mestrado em colaboração submetido para publicação na PLoS Neglected Tropical Diseases.....	141

RESUMO

O vírus da Dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e é classificado em quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV 1-4). A Dengue é a principal arbovirose que acomete o homem na atualidade e, além disso, a virose urbana mais difundida no mundo. Estima-se que aproximadamente três bilhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença em regiões tropicais e subtropicais, representando um grave problema de saúde pública. Não obstante, não há tratamento específico, tão pouco vacinas disponíveis para a prevenção desta doença. Esses fatores se associam a uma escassa compreensão da patogênese devido a falta de modelos animais que mimetizem a infecção observada em humanos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi identificar se há alterações cardíacas em um modelo murino de Dengue (DENV-3), bem como caracterizar os mecanismos envolvidos nestas alterações. Para isso foi caracterizado um modelo de infecção murino utilizando um isolado clínico do sorotipo-3 do vírus (DENV-3) e camundongos da linhagem BALB/c. Os camundongos infectados com o vírus da Dengue perderam peso, sucumbiram à infecção de maneira inócua dependente, apresentaram importantes alterações hematológicas, carga viral detectável em órgãos alvo e no sangue, dano hepático e hemorragia tecidual nos pulmões e intestino. O sorotipo-3 do vírus da Dengue adaptado ao camundongo utilizado neste estudo foi eficaz em induzir a infecção e mimetizar os sinais e sintomas observados na forma grave da doença em humanos. Sabe-se que o desenvolvimento de resposta inflamatória sistêmica descontrolada ao vírus é causa de maior morbidade/mortalidade associada à infecção. No modelo em estudo, ocorreu uma resposta inflamatória sistêmica, caracterizada por aumento de permeabilidade vascular, recrutamento e ativação de leucócitos e produção marcante de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Observou-se também importante redução da pressão arterial, aumento de frequência cardíaca, intenso aumento de permeabilidade vascular e hipovolemia, sugerindo que os camundongos após a infecção apresentam choque hipovolêmico. Foi detectada carga viral no coração dos animais infectados, recrutamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o coração, além de intensa produção de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-17) e quimiocinas (CXCL1/KC, CCL2/MCP-1). A infecção com DENV-3 desencadeou pericardite, miocardite e intenso estresse oxidativo, levando a alterações eletrofisiológicas nos cardiomiócitos e culminando com disfunção cardíaca. Baseado nestes resultados pode-se sugerir que o coração é alvo da infecção pelo vírus da Dengue, sofrendo intenso processo inflamatório, estresse oxidativo e alterações eletrofisiológicas que culminam em disfunção cardíaca.

Palavras-chave: Dengue, inflamação, choque, pericardite, miocardite, estresse oxidativo, insuficiência cardíaca.

ABSTRACT

The dengue virus, which belongs to the *Flavivirus* genus within the *Flaviviridae* family, has been classified into four serotypes, DENV 1-4, which are genetically and antigenically different. Nowadays, dengue disease is the major arbovirolosis that affects human beings; moreover, it is the most widespread viral infection in urban tropical and sub-tropical areas, constituting an important world health problem. In addition, there is no effective treatment or vaccines available for the prevention of this disease. These factors are associated with a poor understanding of the pathogenesis of the disease due to the lack of animal models that mimic the infection seen in humans. Thus, the purpose of this study was to identify whether there are cardiac abnormalities in a murine model of dengue (DENV-3) and to characterize the mechanisms involved in these changes. Initially, a murine model of infection induced by a clinical isolate of the serotype 3 viruses (DENV-3) was characterized in BALB/c mice. The serotype-3 of Dengue virus adapted to mice was effective in inducing infection and mimicking the signs and symptoms observed in severe illness in humans and thus, represents a murine model for the study of the pathogenesis of this disease. Dengue virus-infected mice lost weight and succumbed to the infection in an inoculum-dependent manner. Significant hematologic changes, detectable viral load in target organs and blood, liver damage and bleeding in the lungs and gut tissue were also observed. It is known that the development of systemic inflammatory responses to uncontrolled virosis is the cause of significant morbidity / mortality associated with infection. In our experimental model, the systemic inflammatory response was characterized by increased vascular permeability, recruitment and activation of leukocytes and markedly production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. There was also a significant reduction in blood pressure, increased heart rate, dramatic increase in vascular permeability and hypovolemia, suggesting that infected mice had hypovolemic shock. Viral load was detected in the heart of infected animals, as well as leukocyte infiltration and production of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-17) and chemokines (CXCL1/KC, CCL2/MCP-1). The infection with DENV-3 triggered pericarditis, myocarditis and oxidative stress, leading to electrophysiological changes in cardiomyocytes which culminated in cardiac dysfunction. Based on these results we may suggest that the heart is an important target of infection by Dengue virus, suffering intense inflammation, oxidative stress and electrophysiological changes that culminate in cardiac dysfunction.

Keywords: Dengue, inflammation, shock, pericarditis, myocarditis, oxidative stress, heart failure.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Dengue no mundo e nas Américas: aspectos históricos e epidemiológicos

Não existe um consenso de quando a Dengue surgiu pela primeira vez na população humana, possivelmente pela inespecificidade dos seus sintomas. Contudo, as primeiras descrições clínicas de uma síndrome “tipo-dengue” (“dengue-like syndrome”) são sugeridas em uma Enciclopédia Médica Chinesa datada de 992 anos d.C. (Gubler, 1998; Kyle e Harris, 2008). Entretanto, os primeiros casos de epidemias bem documentadas nos quais realmente se acreditavam tratar-se de dengue ocorreram em 1779/80, em três continentes (Ásia, África e América do Norte) (Gubler, 1998; Ligon, 2004). A doença foi chamada de “veneno da água” pelos Chineses que acreditavam estar ligada de alguma forma a insetos associados à água (Gubler, 1998).

Benjamin Rush descreveu na Filadélfia, em 1780, uma epidemia caracterizada por febre, dor de cabeça, náusea e vômitos, além de intensas dores musculares e articulares, com eventuais manifestações hemorrágicas. Esta síndrome foi denominada “febre quebra-ossos” (Rigau-Perez, 2006).

Uma síndrome similar foi descrita em Madrid, na Espanha em 1801 e recebeu o nome de “Dengue”, que em espanhol significa melindre, manha ou lamúria. O nome faz referência ao estado de moleza e prostração apresentado pelo indivíduo infectado pelo vírus desencadeador da doença. No entanto, é aceito que no final do século XVIII, uma doença caracterizada como dengue causara epidemias intermitentes na Ásia, em Java e nos Estados Unidos, na Filadélfia (Monath, 1994; Rigau-Perez, 1998). Entre os séculos XIX e XX o vírus se disseminou por áreas tropicais e subtropicais do globo (Hayes e Gubler, 1992; Monath, 1994).

A etiologia viral da dengue foi sugerida experimentalmente há um século, mas não confirmada até a II guerra mundial, onde os avanços nas técnicas desenvolvidas por pesquisadores japoneses e americanos permitiram o isolamento do vírus. Os dois primeiros sorotipos do vírus da dengue (DENV-1 e DENV-2) foram identificados em 1944 por Kimura e Hotta, seguidos dos sorotipos 3 e 4 (DENV-3 e DENV-4) quando a Febre hemorrágica do Dengue/Síndrome do choque do Dengue (FHD/SCD) emergiu nos centros urbanos, das Filipinas e Tailândia, por volta de 1953/1954 (Hotta *et al.*, 1981;

Gubler, 1998; Kyle e Harris, 2008). Nas Américas, a partir de 1963, foi comprovada a circulação do vírus da Dengue em vários países (Holmes e Twiddy, 2003).

Relatos sugerem que a primeira epidemia no continente americano ocorreu no Peru, no início do século XIX, com sucessivos surtos no Caribe, Estados Unidos, Colômbia e Venezuela (Pinheiro e Corber, 1997). No Brasil há referências de epidemias desde o século XIX. No século passado, há relatos em 1916 em São Paulo e em 1923 em Niterói, Rio de Janeiro, porém sem diagnóstico laboratorial. (Schatzmayr, 2000; Nogueira *et al.*, 2007).

A partir de 1963, houve circulação comprovada dos vírus DENV-1 e DENV-3 em vários países. Após a década de 60, a circulação do vírus da dengue intensificou-se nas Américas. A partir de 1980, foram notificados surtos e epidemias em vários países (Pinheiro e Corber, 1997). A epidemia que afetou Cuba, em 1981, é de extrema importância na história da dengue nas Américas. Ela foi causada pelo sorotipo-2 do vírus (DENV-2), tendo sido o primeiro relato da forma hemorrágica da dengue fora do sudoeste Asiático e do pacífico ocidental, onde ocorreram as primeiras formas graves da doença, ainda nos anos 60 (Pinheiro e Corber, 1997; Schatzmayr, 2000). A primeira epidemia bem documentada clínica e laboratorialmente no Brasil ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista, Roraima (Schatzmayr, 2000; Siqueira *et al.*, 2005).

A Dengue é considerada a principal arbovirose (doença transmitida por artrópodes) que acomete o homem na atualidade. Além disso, é a virose urbana mais difundida no mundo. Ao longo das últimas décadas tornou-se um grave problema à saúde pública. Com exceção da Europa, esta doença atinge todos os continentes. É uma doença de áreas tropicais e subtropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento do mosquito transmissor (Guzman *et al.*, 2010).

Em todo o mundo estima-se que aproximadamente três bilhões de pessoas, 2/5 da população mundial, estão sob risco de contrair dengue e que ocorram anualmente cerca de 50 milhões de casos. Desse total, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem em consequência da doença (Guzman e Kouri, 2002).

Nas últimas décadas, a incidência de dengue no mundo tem apresentado uma tendência ascendente. As áreas geográficas em que ocorre a

transmissão do vírus da dengue se expandiram consideravelmente e todos sorotipos do vírus (DENV 1-4) estão circulando na Ásia, África e Américas, um cenário totalmente diferente do que se observava na década de 70 (figura 01) (Guzman *et al.*, 2010).

Há consideráveis fatores envolvidos na propagação e manutenção do vírus nas áreas endêmicas, dentre eles: a transição rural urbana, fatores ambientais como mudanças climáticas, crescimento populacional sem precedente, urbanização não controlada nem planejada e ampliação das viagens internacionais. Todos esses fatores podem explicar o processo de propagação e persistência da dengue no século XX e início do século XXI (Halstead, 1990; Ligon, 2004; 2005; Kyle e Harris, 2008).

No Brasil a Dengue representa um grave e alarmante problema de saúde pública, sendo uma doença endêmica com períodos epidêmicos. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, apenas no ano de 2011, até a 39ª semana epidemiológica, foi notificado um total de 721.546 casos de dengue no país (Brasil, 2011).

A Região Sudeste apresenta o maior número de casos (343.731 casos; 47,6%), seguida da Região Nordeste (184.663 casos; 25,6%), Norte (113.638 casos; 15,7%), Centro-Oeste (44.552 casos; 6,2%) e Sul (34.962 casos; 4,8%). Os estados com maior incidência da doença durante o período foram o Acre (2.551,74 casos por 100 mil habitantes), Amazonas (1758,84 casos por 100 mil habitantes), Espírito Santo (1092,50 casos por 100 mil habitantes), Rio de Janeiro (973,96 casos por 100 mil habitantes), Ceará (739,78 casos por 100 mil habitantes) e Tocantins (729,19 casos por 100 mil habitantes) (Brasil, 2011).

Ainda segundo a SVS, as atividades de monitoramento da circulação do Dengue vírus (vigilância virológica) demonstram a circulação de todos os sorotipos do vírus (DENV 1-4) (figura 02). Ressalta-se a importante co-circulação dos sorotipos 2 e 4. Este cenário alerta para a possibilidade de casos graves e persistência da transmissão em níveis elevados no verão de 2012 (Brasil, 2011).

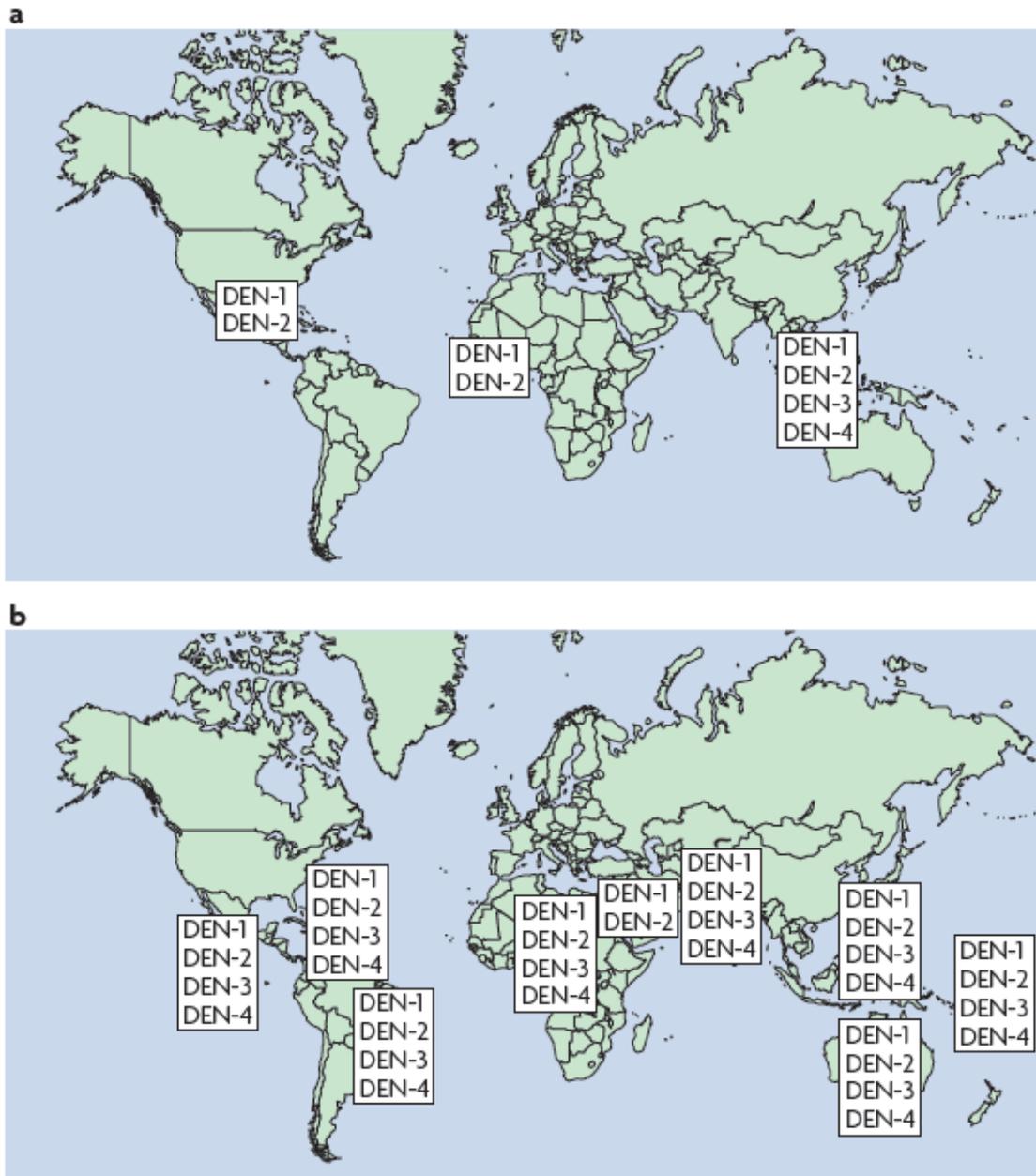


Figura 01. Mudança na distribuição dos sorotipos de dengue no mundo. A figura mostra a distribuição em 1970 (a) e 2004 (b) (Guzman *et al.*, 2010).

Apesar dos investimentos em massa em campanhas de prevenção e combate a Dengue, de tentativas de controle vetorial e do aprimoramento da vigilância epidemiológica e virológica, o quadro epidemiológico do país aponta para a vulnerabilidade de ocorrências de epidemias, bem como para um aumento das formas graves da doença, com uma complexa dinâmica de dispersão do vírus e circulação simultânea de diferentes sorotipos virais (Brasil,

2011). O controle da dengue é uma atividade complexa, tendo em vista os diversos fatores externos ao setor saúde, que são importantes determinantes na manutenção e dispersão tanto da doença quanto de seu vetor transmissor (Teixeira Mda *et al.*, 2005; Barreto e Teixeira, 2008).

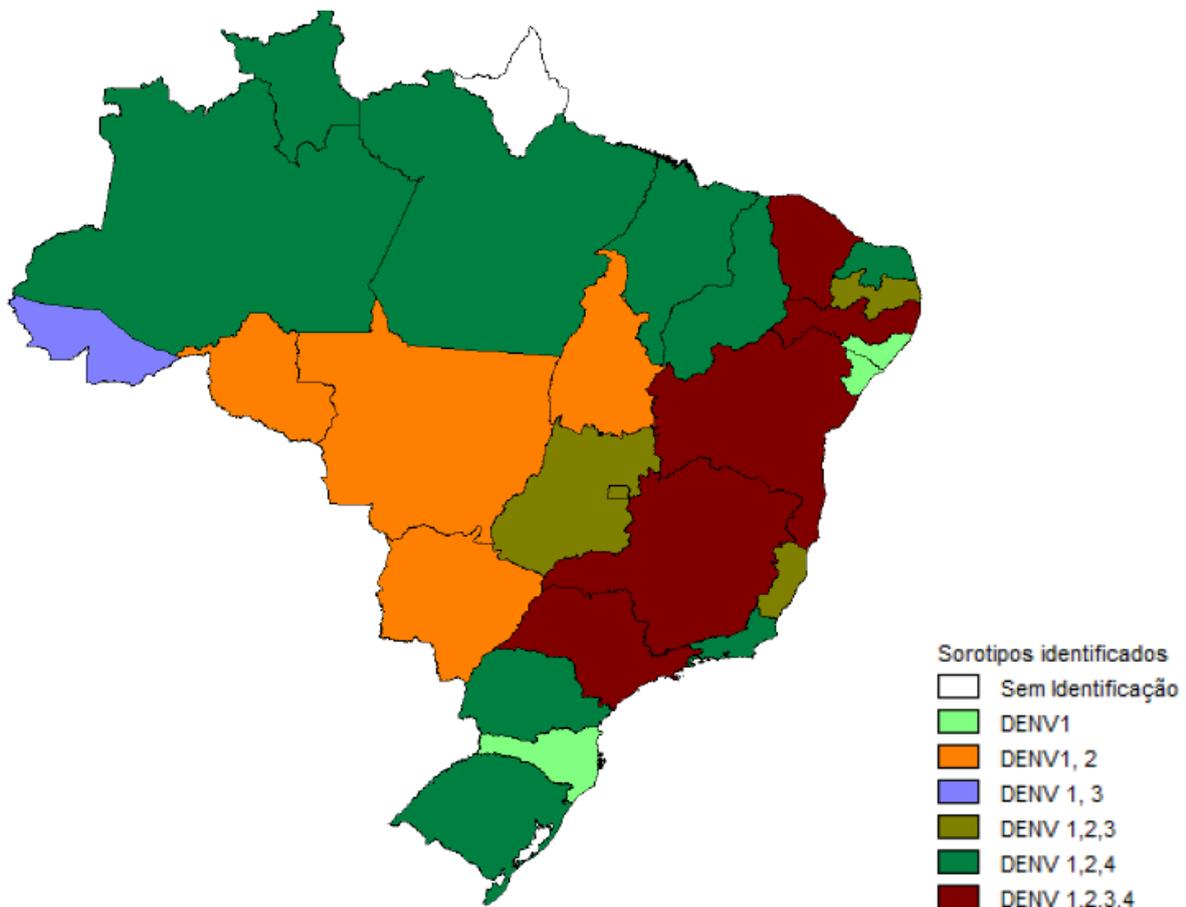


Figura 02. Sorotipos de Dengue isolados no Brasil por estado, janeiro-agosto 2011 (Brasil, 2011).

1.2 Transmissão da doença

O Dengue vírus (DENV) é transmitido a humanos através da picada da fêmea do mosquito vetor infectado. O *Aedes aegypti*, um mosquito altamente domesticado, é o vetor predominante dos DENV (Westaway *et al.*, 1985; Kurane, 2007).

O ciclo de transmissão da doença está representado na figura 03. O DENV é um dos únicos arbovírus que não necessita de um ciclo selvagem para a manutenção da transmissão epidêmica em humanos. Particularmente, a manutenção do vírus é mantida por um ciclo de transmissão humano-mosquito-humano. Um ciclo de transmissão selvagem pode existir nas florestas da Ásia e no oeste da África entre primatas não-humanos e os mosquitos *Aedes*. Contudo, a contribuição deste ciclo selvagem para a transmissão epidêmica urbana é desconhecida (Whitehead *et al.*, 2007).

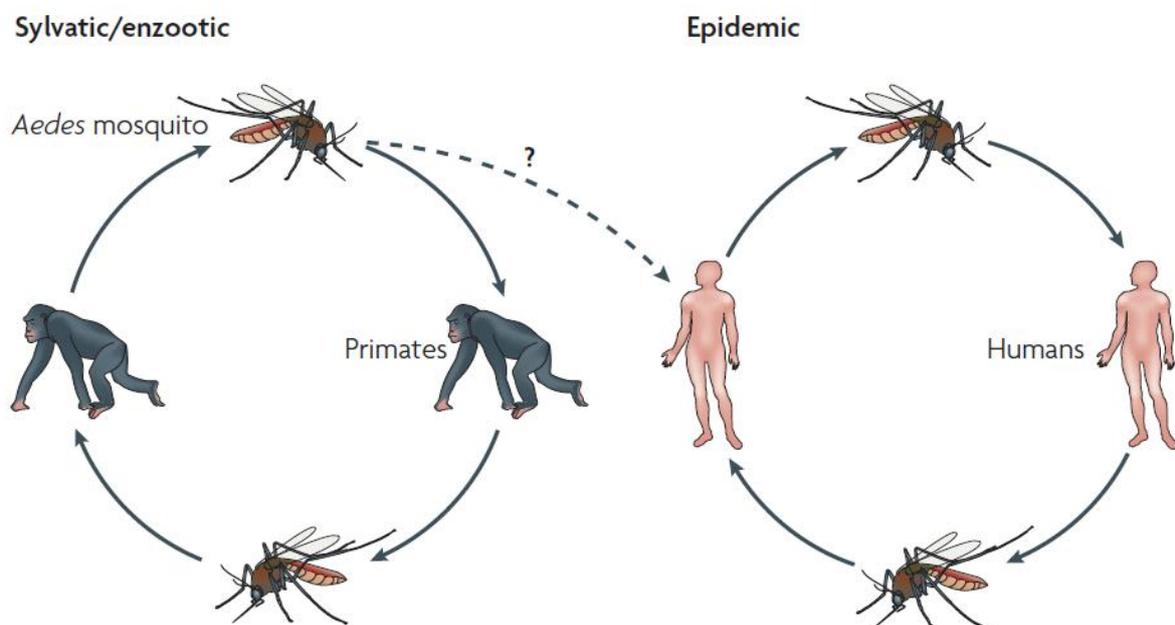


Figura 03. Ciclo de transmissão do vírus da Dengue. Por causa do alto nível de viremia resultante da infecção pelo vírus da dengue (DENV) nos seres humanos, os vírus são eficientemente transmitidos entre seres humanos e mosquitos. Além disso, um ciclo de transmissão silvestre da dengue pode existir. No entanto, a contribuição do ciclo silvestre de transmissão da dengue é desconhecida, mas parece ser mínima. (Whitehead *et al.*, 2007).

Em detalhes, o ciclo de transmissão do vírus da Dengue tem início a partir da picada da fêmea do mosquito em um hospedeiro contaminado, onde o vírus presente na circulação é ingerido pelo artrópode. Uma vez dentro do mosquito, o vírus se multiplica no intestino médio e, após alguns dias, são

encontrados vírions no ovário, sistema nervoso e nas glândulas salivares, local este por onde o vírus é passível de transmissão. Este período de incubação tem duração aproximada de 10-14 dias. Uma vez presente na circulação sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, o vírus passa a se multiplicar em células permissivas de órgãos específicos (Whitehead *et al.*, 2007).

1.3 O vírus, a infecção e o ciclo de replicação dos DENV

O vírus da Dengue pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* (Westaway *et al.*, 1985). Com base em testes sorológicos, os vírus da Dengue são classificados em quatro sorotipos antígenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). As partículas virais são esféricas, com 50 a 55 nm de diâmetro (Figura 04 a e b), constituídas por um nucleocapsídeo envolto por uma membrana bilipídica, que constitui o envelope viral, no qual estão ancoradas glicoproteínas de superfície (Whitehead *et al.*, 2007).

O genoma viral consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11 kilobases (Kb) (Figura 04 c). O RNA viral possui uma única fase de leitura (open reading frame, ORF), a qual codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e virais em três proteínas estruturais (C, pré-M e E) e em sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Murphy e Whitehead, 2011). Nas extremidades 3' e 5', flanqueando a ORF, existem duas regiões não codificadoras, RNC5' e RNC3', que apresentam aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem sequências conservadas que formam estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral (Leitmeyer *et al.*, 1999; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

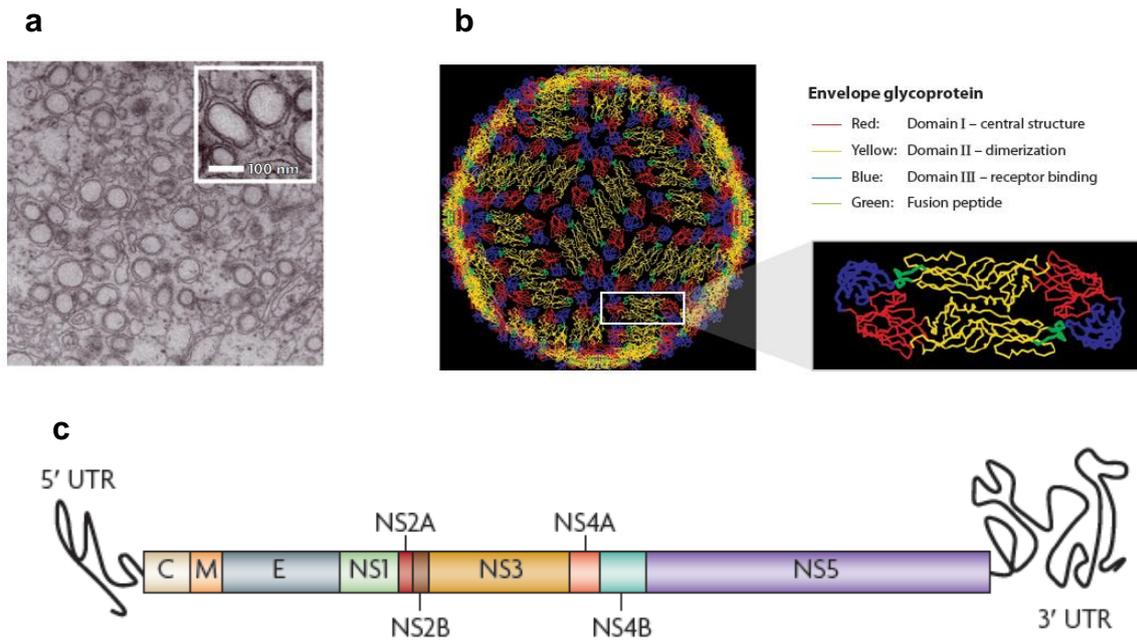


Figura 04. a) Microscopia eletrônica de linhagem de células derivadas de hepatócitos humanos (Huh7) infectadas por dengue vírus, 24 horas após a infecção (Miller e Krijnse-Locker, 2008). **b)** partícula viral: o vírion (partícula viral completa que está fora da célula hospedeira) dos DENVs é esférico e envelopado com um diâmetro de aproximadamente 50 nm. A superfície externa da partícula viral madura consiste de uma matriz simples de homodímeros chamada de glicoproteína E (Whitehead *et al.*, 2007). **c)** O genoma do vírus da dengue: A fase única de leitura codifica três proteínas estruturais (o capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E)) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Guzman *et al.*, 2010).

A infecção pelo Dengue vírus se inicia através da interação dos receptores virais com receptores celulares presentes na célula hospedeira após a picada do mosquito vetor contaminado, o qual presumidamente deposita o vírus na derme e/ou no sangue do hospedeiro. A figura 05 representa esquematicamente o contato inicial dos DENVs com o hospedeiro.

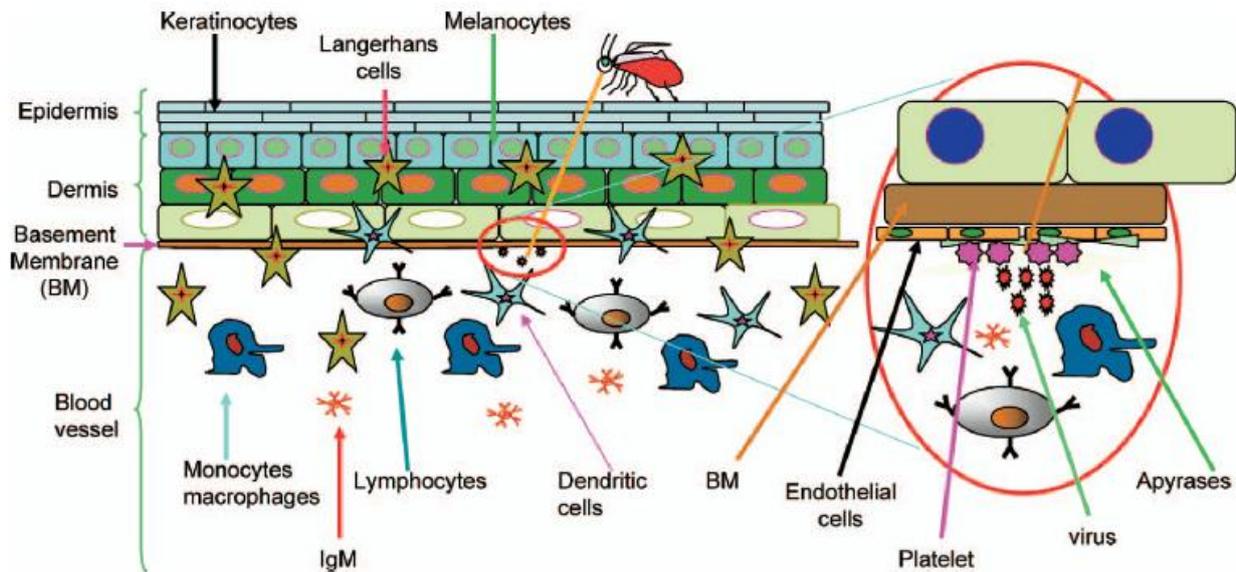


Figura 05. Representação esquemática do contato inicial do DENV com o hospedeiro. O vírus penetra através da pele durante a picada do mosquito. As células dendríticas são as primeiras células imunes presentes e ativadas nos períodos iniciais da infecção. Ocorre também a ativação de outros tipos celulares e a liberação de mediadores com o objetivo de eliminar o vírus (Noisakran e Perng, 2008).

O ciclo de replicação do vírus da Dengue (figura 06) inicia-se com a interação do vírion, através da ligação da glicoproteína E, a receptores de superfície celular. Esta interação induz a entrada do vírus na célula hospedeira pelo processo de endocitose (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2010).

Vários receptores celulares distintos são candidatos a possíveis responsáveis da adsorção viral, entre eles os proteoglicanos com sulfato de heparan (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002), proteínas do choque térmico (*heat shock protein* (Hsp)-70 e Hsp-90) (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005), bem como a molécula de adesão intracelular específica de células dendríticas (*DC-SIGN - Dendritic cell- specific intracellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin*) (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneeritthep *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2005) e o receptor para manose (Miller *et al.*, 2008), entre outros.

Os endossomos formados contendo partículas virais fundem-se aos endossomos da célula, levando a uma diminuição do pH endossômico, que

potencializa mudanças conformacionais na glicoproteína E, resultando em uma fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e conseqüentemente, o desnudamento e liberação do genoma no citoplasma da célula infectada. Após a liberação do RNA viral no citoplasma, tem-se início a tradução e processamento da poliproteína através da maquinaria intracelular do hospedeiro. A replicase viral é formada a partir da interação das proteínas NS3 e NS5 que irão atuar sobre o RNA viral, provavelmente auxiliadas por fatores celulares do hospedeiro. A tradução do genoma é então conduzida no retículo endoplasmático, seguida pela síntese de uma fita de RNA de sentido negativo (ssRNA⁻). Esta fita intermediária serve como molde para a produção de múltiplas cópias da fita do RNA viral, de sentido positivo (ssRNA⁺), ocasionando a replicação viral. A montagem do vírion acontece pela associação das fitas de RNA com proteínas C do nucleocapsídeo, localizadas na superfície das membranas do retículo endoplasmático (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2010).

Após vários ciclos de tradução, proteínas estruturais são sintetizadas em níveis elevados. Estas proteínas são arranjadas juntamente com o RNA viral, dando origem à progênie de vírions, que são transportados pelo complexo de Golgi e secretados posteriormente pelo processo de exocitose. A duração deste ciclo pode variar de quatro a sete dias, período que coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas na infecção humana (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2010).

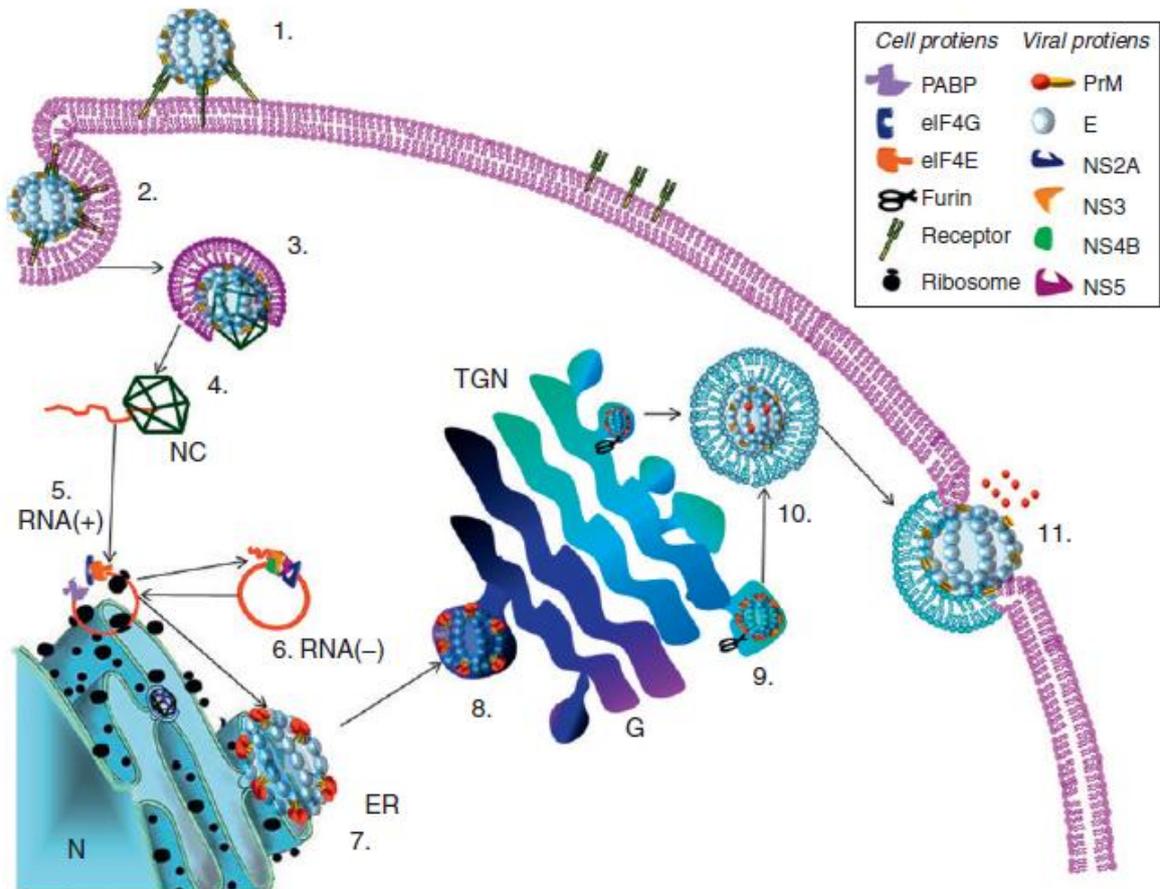


Figura 06. Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da Dengue. Nucleocapsídeo (NC), retículo endoplasmático (ER), núcleo (N), complexo de Golgi (TGN) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2010).

1.4 Patogênese da doença

Apesar dos sinais clínicos da dengue serem muito bem estabelecidos, os mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da dengue e na febre hemorrágica do Dengue (FHD) / síndrome do choque do Dengue (SCD) ainda são pouco caracterizados, principalmente em virtude da ausência de modelos animais que mimetizem a doença em humanos.

O vírus da Dengue tem tropismo por um amplo espectro de células humanas e o principal alvo da infecção pelo vírus ainda é controverso. Há um consenso geral de que células da linhagem fagocítica mononuclear (células dendríticas, monócitos/macrófagos e células de Langerhans) são os alvos primários (Clyde *et al.*, 2006).

As células dendríticas residentes da pele (DCs) são provavelmente os alvos iniciais de infecção pelo vírus (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005; Green e Rothman, 2006; Yauch e Shresta, 2008). Outro tipo celular precocemente envolvido nas infecções pelos DENV são as células *Natural Killer* (NK).

Shresta e cols. (2004) demonstraram que a atividade precoce das células NK pode ser um importante fator na eliminação da infecção primária pelos DENVs. Eles sugerem que esses efeitos podem ser decorrentes da citotoxicidade mediada por grânulos presentes nestas células ou através do reconhecimento e indução de lise das células-alvo revestidas por anticorpos (citotoxicidade celular dependente de anticorpos) (Shresta, Kyle, Robert Beatty *et al.*, 2004). No entanto, existem fortes evidências de que o vírus é capaz de infectar também linfócitos B, linfócitos T, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (Scott *et al.*, 1980; King *et al.*, 2002; Neves-Souza *et al.*, 2005; Clyde *et al.*, 2006).

Os seres humanos são os hospedeiros vertebrados primários para os DENV. É muito bem estabelecido que a infecção pelo vírus da Dengue, independente do sorotipo, produz imunidade permanente contra reinfecção pelo mesmo sorotipo causador da infecção, mas não contra outros sorotipos (Sangkawibha *et al.*, 1984; Kurane *et al.*, 1994; Rothman e Ennis, 1999; Rothman, 2011). Existem controvérsias a respeito dos mecanismos envolvidos na manifestação da forma hemorrágica da doença, seja durante uma infecção primária ou secundária. Hipóteses contrastantes têm atribuído a gravidade da doença a fatores virais e do hospedeiro (Green e Rothman, 2006; Rothman, 2011).

Halstead e cols. (1970) propuseram a teoria de que indivíduos que sofrem infecção secundária por um sorotipo diferente do envolvido na infecção prévia tem uma exacerbação da infecção mediada pelo sistema imune, desenvolvendo uma resposta paradoxal e quadros mais graves da doença (Halstead *et al.*, 1970; Halstead *et al.*, 1983; Halstead, 1988).

Essa teoria, chamada em inglês de *antibody-dependent enhancement* (ADE), sugere que os anticorpos heterólogos pré-existentes para o vírus da dengue reconhecem o novo vírus infectante e formam um complexo antígeno-anticorpo de baixa avidéz, incapaz de neutralizar o novo sorotipo. Pelo contrário, podem facilitar a adsorção e entrada do vírion em células do

hospedeiro como leucócitos, especialmente monócitos e macrófagos (Whitehead *et al.*, 2007; Murphy e Whitehead, 2011).

Esses anticorpos são denominados anticorpos subneutralizantes. Uma vez que o anticorpo é heterólogo e o vírus não é neutralizado, este permanece livre para se replicar utilizando a maquinaria celular. O aumento da replicação dos vírus da dengue nessas células-alvo é provavelmente responsável pelos elevados níveis de viremia nos estágios iniciais da doença, no qual também tem sido correlacionado com maior incidência dos casos de FHD/SCD (Halstead *et al.*, 1970; Vaughn *et al.*, 2000; Guzman *et al.*, 2010; Murphy e Whitehead, 2011).

Estudos ainda pouco conclusivos associam outros fatores à gravidade da doença, tais como sexo, idade, fatores ambientais, genéticos e o estado nutricional do hospedeiro (Bhakdi e Kazatchkine, 1990; Rothman, 2003; Nguyen *et al.*, 2005; Noisakran e Perng, 2008; Coffey *et al.*, 2009; Srikiatkachorn e Green, 2010).

Diversos estudos têm associado a resposta imune do hospedeiro ao vírus e o desenvolvimento da forma hemorrágica da infecção. Para tal, vários mecanismos têm sido considerados, tais como deposição de complexos imunes, reação cruzada de anticorpos com endotélio vascular, intensificação da infecção mediada por anticorpos, ativação do sistema do complemento e seus produtos, liberação exacerbada de mediadores solúveis, como citocinas, dentre outros (Bokisch *et al.*, 1973; Halstead, 1979; Malasit, 1987; Halstead, 1989; Bhakdi e Kazatchkine, 1990; Markoff *et al.*, 1991; Kurane e Ennis, 1992; Mangada *et al.*, 2004; Leong *et al.*, 2007; Mathew e Rothman, 2008; Rothman, 2011; Sun *et al.*, 2011).

Acredita-se que as células do endotélio vascular estejam envolvidas na ativação do sistema imunológico durante a infecção pelo dengue vírus (Avirutnan *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000). A lesão endotelial está associada com a liberação exacerbada de citocinas, quimiocinas e alteração na permeabilidade vascular (Avirutnan *et al.*, 1998; Dewi *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006).

Estes fatores são importantes para o desenvolvimento da febre hemorrágica do dengue, assim como a síndrome do choque do Dengue em uma reinfecção por este vírus (Warke *et al.*, 2003). Alguns trabalhos mostraram

que a presença de Dengue vírus nas células endoteliais predispõe o endotélio à lesão por torná-lo alvo para ação de citocinas, tais como TNF- α e CCL2, culminando com aumento da permeabilidade intercelular e consequente extravasamento plasmático (Cardier *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007), bem como por ativar o sistema complemento contra a superfície das células endoteliais infectadas (Avirutnan *et al.*, 1998).

1.5 Dengue: características clínicas e diagnóstico

A infecção pelo vírus da dengue causa uma doença de amplo espectro clínico, incluindo desde formas inaparentes até quadros graves, podendo evoluir para óbito. Dentre estes quadros graves, destaca-se a ocorrência de hepatite, insuficiência hepática, manifestações do sistema nervoso (encefalite), miocardite, hemorragias graves e choque. Entretanto, na maior parte das vezes a dengue apresenta-se em quatro formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre do dengue (FD) e febre hemorrágica do Dengue (FHD) com ou sem choque (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. e World Health Organization., 2009; Teixeira e Barreto, 2009).

A febre do Dengue apresenta-se como uma enfermidade aguda febril autolimitada que perdura por quatro a sete dias aproximadamente. A primeira manifestação da doença é febre alta (39°C a 40°C) de início abrupto, associada à cefaléia, adinamia, sonolência, dor retroorbitária, mialgia, artralgia, astenia, presença ou não de exantema e ou prurido cutâneo, náuseas, vômitos e diarreias. As manifestações hemorrágicas, como epistaxe, petéquias, gengivorragia, metrorragia, hematêmese, melena, hematúria, e outras, bem como plaquetopenia, podem ser observadas em todas as manifestações clínicas da dengue. A FHD, afora a sintomatologia inicial que corresponde à dengue clássica, cursa entre o terceiro e sétimo dia de doença, com intensificação das manifestações hemorrágicas, intensas dores abdominais, hepatomegalia dolorosa, desconforto respiratório e letargia. Ocorre extravasamento plasmático, que pode ser expresso por hemoconcentração e hipoalbuminemia e/ou derrames cavitários, que ocasionam queda importante da pressão arterial, tonturas, sudorese, taquicardia e sinais de insuficiência circulatória. Nestes casos, pode ocorrer grande diminuição do volume

plasmático intravascular e consequente choque hipovolêmico, que pode levar à morte (Kurane, 2007; Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. e World Health Organization., 2009; Teixeira e Barreto, 2009). Considerando que a Dengue apresenta uma vasta sintomatologia, existem diferentes técnicas empregadas para a confirmação da infecção pelo DENV.

Os exames diagnósticos laboratoriais são divididos em exames inespecíficos, que auxiliam e subsidiam o diagnóstico clínico. São eles: hemograma, coagulograma e exames bioquímicos. Pelo hemograma verifica-se uma contagem de leucócitos variável, podendo ocorrer desde leucopenia até leucocitose leve. Linfocitose com atipia linfocitária é um achado comum, além do aumento de hematócrito em 20% do valor basal e a trombocitopenia (contagem de plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$). Através do coagulograma verifica-se aumento nos tempos de protrombina, trombotoplastina parcial e trombina, diminuição de fibrinogênio, fator VIII, fator XII, antitrombina e α antiplasmina. Com relação às dosagens bioquímicas, ocorre diminuição da albumina plasmática, albuminúria e discreto aumento de enzimas hepáticas (aminotransferase aspartato sérica e aminotransferase alanina sérica) (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. e World Health Organization., 2009; Teixeira e Barreto, 2009). Existem ainda exames específicos como o isolamento viral, cujo objetivo é identificar o patógeno e monitorar os sorotipos virais circulantes (Peeling *et al.*, 2010).

O isolamento viral deve ser realizado a partir de uma amostra de sangue, até cinco dias após o início dos sintomas. Após o isolamento, o vírus deve ser identificado e sorotipado. Isso é comumente realizado por imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais sorotipos-específicos, com a transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), utilizando iniciadores (*primers*) sorotipos-específicos, com a análise dos amplicons em gel de agarose e/ou com real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) (Teixeira e Barreto, 2009; Banoo *et al.*, 2010; Peeling *et al.*, 2010).

Os testes sorológicos complementam o isolamento do vírus e o diagnóstico sorológico é comumente feito pela detecção de IgM específica por teste imunoenzimático de captura (Mac-ELISA). A IgM aparece logo depois de terminar a febre e começa a diminuir depois de trinta a sessenta dias após a infecção. Os métodos sorológicos clássicos podem também ser utilizados, e

dependem da demonstração do aumento em quatro ou mais vezes do título de anticorpos detectados por inibição da hemaglutinação, fixação de complemento ou neutralização. Geralmente é difícil estabelecer o sorotipo infectante devido a reações cruzadas, principalmente em pacientes com imunidade heteróloga (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. e World Health Organization., 2009; Teixeira e Barreto, 2009).

1.6 A resposta inflamatória na infecção pelo Dengue

A inflamação é uma resposta adaptativa que pode ser desencadeada por diferentes estímulos, como lesão tecidual, infecção e visa restaurar a homeostase das estruturas atingidas, tendo, portanto, um papel crucial na fisiologia. Resumidamente, uma resposta inflamatória, seja desencadeada por lesão tecidual infecciosa ou não, envolve o reconhecimento da lesão tecidual e a liberação coordenada de componentes do sangue (plasma e leucócitos) para o sítio atingido na tentativa de eliminação do agente lesivo (Medzhitov, 2008).

O desenvolvimento de uma resposta inflamatória apropriada é essencial para o hospedeiro. Isso é evidente, por exemplo, na resposta frente a qualquer estímulo de natureza infecciosa. De fato, a ativação e recrutamento de leucócitos são necessários para o processamento e apresentação de antígenos e para função efetora de qualquer resposta imune (Teixeira *et al.*, 2001; Medzhitov, 2008; Fagundes, Souza *et al.*, 2011). Na ausência de inflamação, a letalidade é usual após a exposição ao desafio infeccioso. No entanto, processos inflamatórios têm potencial de causar dano aos tecidos do hospedeiro (Teixeira *et al.*, 2001; Medzhitov, 2008; Fagundes, Souza *et al.*, 2011).

A inflamação é um dos primeiros processos desencadeados durante uma resposta imune inata associada, por exemplo, a uma infecção patogênica. O reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs), em células residentes e em fagócitos recrutados para aquele sítio, iniciam uma cascata de sinalização que leva a uma resposta inflamatória local, incluindo a produção de citocinas e quimiocinas, peptídeos vasoativos, proteínas do sistema complemento e a produção de espécies

reativas de oxigênio (Takeda e Akira, 2005). Pela ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), a inflamação também controla o desenvolvimento de respostas imunes adaptativas (Akira *et al.*, 2001; Schnare *et al.*, 2001; Iwasaki e Medzhitov, 2004).

As citocinas desempenham papel fundamental na imunopatogênese da infecção pelo Dengue vírus. Altas concentrações de inúmeras citocinas liberadas principalmente por linfócitos T, monócitos/macrófagos e células endoteliais são encontradas no soro dos pacientes com FHD/SCD em relação aos pacientes com a forma clássica da doença (FD) (Rothman e Ennis, 1999; Chaturvedi *et al.*, 2000; Green e Rothman, 2006; Rothman, 2011).

As citocinas comumente encontradas em altos níveis no soro de pacientes com FHD/SCD incluem: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), várias interleucinas (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-1 β) e o interferon gama (IFN- γ) (Chaturvedi *et al.*, 2000; Dewi *et al.*, 2004; Kurane, 2007; Pang *et al.*, 2007).

O TNF- α foi a primeira citocina a ser implicada na patogênese da FHD (Chaturvedi, 2006). Essa pode atuar localmente na ativação de macrófagos ou sistemicamente podendo levar ao aumento da permeabilidade vascular (Clyde *et al.*, 2006; Kurane, 2007). Além destes efeitos atribuídos ao TNF- α , outra citocina também descrita é o IFN- γ . O IFN- γ é fundamental para ativação das funções microbicidas efectoras de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Boehm *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 2004). A atividade microbicida desencadeada por essa citocina inclui indução do sistema NADPH-oxidase fagocítica e aumento da expressão de enzimas lisossômicas (Decker *et al.*, 2002). Neste contexto, os fagócitos usualmente eliminam os agentes infecciosos através da geração de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Macmicking *et al.*, 1997), dentre estas, o óxido nítrico (NO). O NO pode reagir com o oxigênio molecular gerando espécies reativas de nitrogênio, entre eles: ânions moderadamente estáveis (nitrito - NO²⁻), ânions muito estáveis (nitrato - NO³⁻), óxidos altamente instáveis (N₂O₃) e peróxidos instáveis (ex: ONOO) (Macmicking *et al.*, 1997; Chaturvedi e Nagar, 2009; Wink *et al.*, 2011). O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir da oxidação de uma molécula de L-arginina, gerando como produto NO e L-citrulina. Essa reação necessita de um aceptor de elétrons (NADPH) e de O₂ (Li e Poulos, 2005; Lundberg *et al.*, 2008)

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) pode ser encontrada em três isoformas, denominadas de endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzida (iNOS). As isoformas neuronal e endotelial são expressas constitutivamente e são ativadas pelo aumento na concentração do cálcio citoplasmático. A isoforma induzida é expressa somente em condições inflamatórias ou infecciosas, onde citocinas e/ou estímulos microbianos induzem a sua expressão (Alderton *et al.*, 2001).

Em contraste às constitutivas, a iNOS não necessita de aumento intracelular de cálcio para sua ativação (Macmicking *et al.*, 1997). Dentre os diversos papéis desempenhados pelo IFN- γ , essa citocina induz a expressão de uma série de enzimas, dentre elas as enzimas responsáveis pela síntese de espécies reativas de nitrogênio, a argininosuccinato sintetase, geradora do substrato para NOS, L-arginina (Nussler *et al.*, 1994), da enzima GTP-ciclohidrolase, responsável pela produção do cofator da NOS, tetrahydrobiopterina (Di Silvio *et al.*, 1993) e diretamente da própria iNOS (Macmicking *et al.*, 1997). A expressão máxima dessa enzima requer dois tipos diferentes de estímulos: um de primagem, geralmente desempenhado pelo IFN- γ , e um de ativação, gerado por componentes microbianos ou por citocinas como o TNF- α (Schroder *et al.*, 2004), ambos bastante exacerbados durante os quadros clínicos do Dengue.

Como revisado por MacMicking e cols (1997), uma variedade de evidências atribui papel fundamental às espécies reativas de nitrogênio e à enzima iNOS na defesa do hospedeiro contra infecções. Também foi demonstrado em muitos trabalhos que o NO possui atividade microbicida, mesmo sendo proveniente de fontes exógenas. Além disso, diversos trabalhos demonstram que a inibição farmacológica da NOS ou animais deficientes para NOS apresentam uma exacerbação dos sintomas e susceptibilidade acentuada do hospedeiro a diversos modelos de infecções experimentais (Lin *et al.*, 1997; Takhampunya *et al.*, 2006).

1.7 Dengue: alterações cardíacas

Investigações clínicas sugerem que o coração parece ser alvo da infecção pelo vírus da Dengue (Wali *et al.*, 1998; Salgado *et al.*, 2010). Na

literatura, há relatos de casos de distúrbios de condução atrioventricular (ritmo juncional e bloqueio atrioventricular), arritmias supraventriculares, miocardites e insuficiência cardíaca após a infecção pelo vírus da Dengue. (Obeyesekere e Hermon, 1973; Khongphatthallayothin *et al.*, 2000; Horta Veloso *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009; Mahmud *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Weerakoon *et al.*, 2011)

Wali e cols. (1998) demonstraram em estudo durante a epidemia de 1996 em Nova Delhi, Índia, que pacientes com febre hemorrágica do dengue (FHD) / síndrome do choque do Dengue (SCD) apresentavam importantes alterações eletrocardiográficas na maior parte das vezes associadas à redução global da função cardíaca (Wali *et al.*, 1998). Na mesma ocasião, 17 indivíduos com FHD/SCD foram avaliados com cintilografia do miocárdio e observou-se hipocinesia difusa em 70% dos pacientes, com fração de ejeção média de 40% (Khongphatthallayothin *et al.*, 2000). Além disso, já é descrito que a infecção por arbovírus pode causar cardiomiopatias e miocardite (Obeyesekere e Hermon, 1972; 1973).

A miocardite é definida como um processo inflamatório do músculo cardíaco que pode levar a grave disfunção miocárdica, arritmias e distúrbios de condução, geralmente causada por um agente infeccioso. A inflamação pode envolver os miócitos, o interstício, as estruturas vasculares e o pericárdio (Pankuweit *et al.*, 2002; Cooper, 2009; Yajima e Knowlton, 2009).

De uma forma geral, na miocardite viral o vírus se aloja no tecido cardíaco, gerando a ativação da resposta humoral e celular do sistema imunológico do hospedeiro. A ativação da imunidade inata, que é uma resposta inicial, ou da imunidade adaptativa, em uma resposta inflamatória crônica, leva a ativação de diferentes tipos celulares, culminando com a produção local de moléculas citotóxicas, que tem como objetivo resolver/encerrar a infecção localizada. Durante esse processo, várias moléculas podem ser produzidas como citocinas, quimiocinas e peptídeos. Evidências mostram que essas moléculas são capazes de modular diretamente a função da célula muscular cardíaca, podendo deprimir ou potencializar a função dos cardiomiócitos. A miocardite pode induzir diferentes alterações na fisiologia cardíaca, levando a infarto, microaneurismas, taquicardia ventricular, dentre várias outras manifestações (Kawai, 1999; Ellis e Di Salvo, 2007; Dennert *et al.*, 2008; Yajima e Knowlton, 2009; Yajima, 2011). Entretanto, não existem estudos

clínicos ou experimentais que caracterizem os mecanismos e moléculas envolvidas nas alterações cardíacas desencadeadas pela Dengue.

II. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Identificar se há alterações cardíacas em um modelo murino de Dengue (DENV-3), bem como caracterizar os mecanismos envolvidos nestas alterações.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Caracterizar o modelo de infecção pelo vírus da Dengue (DENV-3) em camundongos BALB/c adultos após 3 e 6 dias de infecção.

- Determinar a DL₅₀ do vírus;
- Avaliar os aspectos sistêmicos e parâmetros inflamatórios após infecção com o inóculo de 1 PFU (DL₅₀ do vírus) de DENV-3;
- Avaliar se existem alterações hemodinâmicas após a infecção experimental pelo DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino.

2.2.2 Estudar se há alterações cardíacas e os mecanismos envolvidos nas mesmas após a infecção experimental pelo DENV-3.

- Avaliar se o coração é alvo da infecção por DENV-3;
- Caracterizar os mediadores envolvidos nas alterações cardíacas observadas;
- Avaliar o status redox cardíaco após a infecção experimental pelo DENV-3;
- Caracterizar se existem alterações morfofuncionais no coração dos animais infectados pelo DENV-3.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais e Indução da Dengue com o DENV-3

Para o desenvolvimento do modelo experimental de infecção pelo DENV-3, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c machos com 08 a 10 semanas de idade, obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com o DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino.

Em todos os protocolos experimentais os animais não infectados (NI) e os animais infectados foram sacrificados no 3º e 6º dia após a inoculação. Os animais definidos como animais não infectados receberam a injeção intraperitoneal com salina. Todos os animais foram mantidos em microisoladores, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), iluminação (ciclo claro-escuro de 12/12 horas), e com livre acesso a água e ração.

Todos os procedimentos adotados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob número 038/10.

3.2 Vírus

Neste trabalho foi utilizado o sorotipo 3 do vírus da dengue proveniente de um isolado clínico. O vírus foi adaptado ao hospedeiro murino, conforme previamente descrito por Atrasheuskaya e cols. (2003) (Atrasheuskaya *et al.*, 2003).

De forma resumida, para a adaptação do vírus e aumento da virulência do isolado no hospedeiro murino, o mesmo foi inicialmente injetado por via intracerebral (i.c.) em camundongos neonatos (com dois dias de vida - linhagem BALB/c). Os cérebros dos camundongos que apresentavam morbidade foram retirados, no 5º dia após infecção, e um homogenato dos mesmos foi realizado em uma solução de PBS a 10% (p/v), centrifugado (6.000 rpm; 4°C ; 1 minuto), o sobrenadante foi coletado e essa solução, novamente injetada i.c. em novos animais. Foram realizadas 8 passagens do vírus no cérebro de camundongos neonatos. Em seguida, animais com 2 semanas de vida foram infectados por via intraperitoneal. O aparecimento dos sinais clínicos

da doença foi verificado (redução da exploração do ambiente, perda de peso, piloereção, hipernocicepção). O mesmo procedimento foi realizado com animais de 3 e 4 semanas de vida para infecções i.p. com o DENV-3. As últimas passagens do vírus foram feitas em células LLC-MK2 (linhagem de células de rins de macaco Rhesus, ATCC) para produzirem estoques virais em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich), sendo então armazenados a -80°C.

Para a confirmação da adaptação do vírus ao hospedeiro murino, animais BALB/c machos com 8 semanas de idade (n = 6 animais por grupo) foram infectados com diluições seriadas provenientes do estoque viral por via i.p. e a taxa de letalidade dos animais avaliada. Além disso, células LLC-MK2 (rim de macaco Rhesus, ATCC) foram infectadas e os efeitos citopáticos (mudanças morfológicas na célula hospedeira) induzidos pelo vírus avaliados.

3.3 Determinação da DL₅₀ do vírus DENV-3

Foram utilizados cinco inóculos do DENV-3 para infecção de camundongos BALB/c machos de 8 a 10 semanas. Para determinar a dose letal para 50% dos animais infectados, os inóculos avaliados foram de 10⁻¹, 1, 10¹ 10² e 10³ PFU (Unidades Formadoras de Placas). Após serem infectados com 100 µL de cada inóculo do vírus por via intraperitoneal, a sobrevivência e a perda de peso dos animais foram avaliadas durante 14 dias.

3.4 Titulação do vírus da Dengue

A carga viral presente no fígado, baço, sangue e coração dos animais infectados foi determinada através da técnica de titulação por placa de lise sob agarose em monocamadas de células LLC-MK2, conforme previamente descrito por Souza e cols. (2009) (Souza *et al.*, 2009). Brevemente, os fragmentos de tecidos coletados em fluxo laminar para a titulação viral foram estocados em freezer -80°C até o momento do processamento. Os eppendorfs contendo os fragmentos de tecidos foram pesados e a cada um deles foram adicionados 2 mL de uma solução estéril de PBS. Os tecidos foram triturados com um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific

Pennsylvania, EUA). Após a formação do homogenato, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a -80°C .

As células LLC-MK2 foram cultivadas em meio DMEM com 5% (p/v) de soro fetal bovino (SFB) na presença dos antibióticos: fungizona ($2\ \mu\text{g/mL}$), penicilina ($100\ \text{U/mL}$) e gentamicina ($50\ \mu\text{g/mL}$). Em seguida foram tripsinizadas, plaqueadas em placa de seis poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço. As placas foram incubadas em estufa a 37°C , 5% de CO_2 durante 24 horas. Após esse tempo as placas apresentavam uma monocamada de células com alta confluência (aproximadamente 80%). No momento da titulação, os tecidos processados foram submetidos a seis diluições decimais seriadas em meio DMEM sem soro. A cada poço de uma placa foi adicionado $400\ \mu\text{L}$ de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma dada amostra. O controle de células correspondeu a um poço não-inoculado, ao qual foi acrescentado apenas o meio DMEM com antibióticos na ausência de soro fetal bovino.

As células infectadas foram incubadas durante uma hora a 37°C em estufa com 5% de CO_2 para a adsorção das partículas virais. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato (“*phosphate-buffered saline* – PBS”) ($3,2\ \text{mmol/L}$, Na_2HPO_4 , $0,5\ \text{mmol/L}$, KH_2PO_4 , $1,3\ \text{mmol/L}$ KCl, $135\ \text{mmol/L}$ NaCl, pH 7,4). Em seguida, foi adicionado meio 199 contendo 1,5% (p/v) de carboximetilcelulose, antibióticos de amplo espectro e 3% (p/v) de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 por 07 dias. Em seguida foram fixadas com formol tamponado a 10% por 60 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta em PBS para a determinação do título das amostras. A carga viral foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{número de placas de lise} \times \text{fator de diluição} \times 2,5}{\text{peso do fragmento (mg)}}$$

Os valores obtidos foram expressos em PFU/mg (unidades formadoras de placas por miligrama de tecido).

Todos os protocolos experimentais que se seguem foram realizados em animais NI e infectados após 3 e 6 dias de inoculação.

3.5 Avaliação de alterações hematológicas

3.5.1 Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes

10 µL do sangue de animais NI e infectados foram coletados pela veia cava inferior, e diluídos na proporção de 1:100 em solução de oxalato de amônio 1% (p/v). O volume final obtido foi incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente 10 µL foram colocados na câmara de Neubauer Bright-Line (Loptick Labor). Decorridos 10 minutos, o número de plaquetas foi quantificado no microscópio óptico invertido (LABOMED® TCM 400) utilizando a objetiva de 40X.

3.5.2 Análise do hematócrito

Uma pequena amostra de sangue dos animais NI e infectados foi coletada pela veia cava inferior, por meio de um tubo capilar de vidro heparinizado para determinação de micro-hematócrito (Perfecta), e foi centrifugado em uma centrífuga de micro-hematócrito por 10 minutos (Centrifuge hematocrit HT). Em seguida, foi realizada uma proporção entre os comprimentos das porções referentes aos elementos figurados do sangue e ao soro.

Os resultados foram expressos em percentagem e quanto maior o valor obtido, maior a concentração de hemácias no sangue, indicativo de extravasamento plasmático e hemoconcentração.

3.5.3 Avaliação dos níveis da albumina plasmática

O sangue de animais NI e infectados foi coletado pela veia cava inferior e colocado em eppendorfs heparinizados (50 UI/ml de heparina), centrifugados (5.000 rpm; 4°C; 10 minutos) para obtenção do plasma. A dosagem da albumina plasmática foi realizada através de teste colorimétrico utilizando um

kit específico (Albumina K040 da Bioclin/Quibasa). A quantificação da reação foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 280 nm.

3.6 Determinação dos níveis das transaminases hepáticas no soro

O sangue de animais NI e infectados foi coletado pela veia cava inferior, colocado em eppendorfs heparinizados, centrifugados a 5.000 RPM por 10 minutos para obtenção do soro. A quantificação das transaminases hepáticas, alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico-pirúvica (ALT/TGP) e aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico-oxalacética (AST/TGO) foi realizada através de teste colorimétrico utilizando *kits* específicos para cada uma. A ALT foi dosada pelo *kit* K035 e a AST pelo *kit* K034, ambos da Bioclin/Quibasa. A quantificação da reação foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 505 nm.

3.7 Determinação da migração celular para tecidos alvos e quantificação de citocinas e quimiocinas

3.7.1 Dosagem da atividade de mieloperoxidase e N-Acetil- β -D-Glicosaminidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. A quantificação de MPO é uma técnica que tem sido utilizada como um marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório e permite demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (Mullane *et al.*, 1985; Cross *et al.*, 2003). Já a N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem de NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração dessas células nos sítios inflamatórios (Bailey, 1988).

3.7.2 Processamento dos tecidos para os ensaios de MPO e NAG

Adicionou-se 100 mg de pulmão, fígado, baço e coração, independentemente, a 1mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4

mol/L, Na_2HPO_4 10 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, cloreto de benzalcônio 0,1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, tween 20 0,05% (p/v), BSA 0,5% (p/v), aprotinina 20 UI) para o processamento em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos). O *pellet* foi homogeneizado em 1,9 mL do Tampão 1, com pH 4,7, contendo 0,1 mol/L de NaCl, 0,02 mol/L de Na_2HPO_4 , 0,015 mol/L de EDTA e centrifugado (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* submetido à lise de hemácias através da adição de 1,5 mL de NaCl 0,2% (p/v) por um período de aproximadamente 30 segundos. Decorrido esse tempo, foi feita a adição de 1,5 mL de uma solução de NaCl 1,6% (p/v) com glicose 5% (p/v) e a solução final foi homogeneizada e dividida igualmente em dois eppendorfs que foram centrifugados (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos). O sobrenadante foi novamente desprezado, cada tubo devidamente identificado (NAG e MPO) e foram adicionados 800 μL de salina 0,9% (p/v) com triton X-100 1% (p/v), para o ensaio de NAG; ou 800 μL de tampão fosfato (0,05 mol/L de Na_3PO_4 e 0,5% (p/v) de hexadecil-trimetil brometo de amônia (HETAB), pH 5,4) para o ensaio de MPO. Cada solução foi homogeneizada e congelada em freezer -80°C para posterior realização de ensaio enzimático.

3.7.3 Dosagem da atividade da mieloperoxidase

O tecido processado foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para liberação da enzima das vesículas citoplasmáticas e centrifugado (10.000 rpm; 4°C; 15 minutos). O sobrenadante, diluído em tampão fosfato [0,05 mol/L de Na_3PO_4 e 0,5% (p/v) de hexadecil-trimetil brometo de amônia em pH 5,4] na proporção de 1:2 foi utilizado para o ensaio enzimático. A reação se inicia com a adição de 25 μL de tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração final de 1,6 mmol/L a 25 μL da amostra diluída em uma placa de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A placa foi levada a estufa a 37°C por 10 minutos e depois foram adicionados 100 μL de peróxido de hidrogênio 1,2 mmol/L em tampão fosfato de sódio 80 mmol/L, pH 5,4; e em seguida foi feita uma nova

incubação a 37°C por 10 minutos. Para o término da reação, adicionou-se 100 µL de H₂SO₄ 1 mol/L. A atividade da mieloperoxidase foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm. Os resultados foram expressos como unidades relativas MPO em 100 mg de tecido.

3.7.4 Dosagem da atividade da N-Acetil-β-D-Glicosaminidase

O tecido processado foi centrifugado (3.000 rpm; 4°C; 10 minutos) e o sobrenadante diluído na proporção de 1:2 em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 mol/L, Na₂HPO₄ 0,1 mol/L em pH 4,5). A reação iniciou-se com a adição de 100 µL das amostras diluídas em uma placa de 96 poços. Às amostras foram adicionados 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina - Sigma) diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5 na concentração de 2,24 mol/L. Sobrenadante e substrato foram incubados a 37°C durante 10 minutos. Após essa incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 mol/L, pH 10,6. A absorbância foi analisada por espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) no comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos como NAG unidades relativas em 100 mg de tecido.

3.7.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas

A avaliação do perfil de citocinas e quimiocinas produzidas após a infecção pelo vírus da Dengue foi determinada através de ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) conforme previamente descrito (Engvall, 1977; Voller *et al.*, 1978).

3.7.6 Processamento dos tecidos para quantificação de citocinas e quimiocinas

Adicionou-se 100 mg de coração em 1 mL de solução de extração de citocinas [NaCl 0,4 mol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, cloreto de benzalcônio 0,1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tween 20 0,05% (p/v), BSA 0,5% (p/v), aprotinina 20 UI] para o processamento em homogeneizador de tecidos

(Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos), o sobrenadante foi recolhido em eppendorf e congelado a -80°C para a detecção de citocinas e quimiocinas por ELISA.

3.7.7 Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas

O sobrenadante foi usado para quantificação de citocinas e quimiocinas, após centrifugação (3.000 rpm; 4°C; 10 minutos) (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O soro foi obtido a partir do sangue total (15 minutos à 37°C seguidos de 30 min à 4°C) por centrifugação (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos) e posteriormente armazenado à -80°C até análise posterior.

Os níveis de interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) foram quantificados no soro e TNF- α , IL-6, CXCL1/KC, CCL2/MCP-1, interleucina-17 (IL-17) e IL-1 β no tecido cardíaco dos animais NI e infectados através da técnica de ELISA, utilizando-se kits adquiridos da R&D Systems, Minneapolis, USA, seguindo o protocolo recomendado, resumidamente descrito abaixo.

Todos os protocolos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7.4, sendo que a sensibilização da placa ocorreu durante 18 horas à 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% (p/v) de albumina bovina (Sigma) por 1 hora. As amostras, o padrão e o branco foram acrescentados aos seus respectivos poços. As placas foram incubadas a 4°C “overnight”. O anticorpo de detecção foi adicionado aos poços por 2 horas. A reação foi incubada com streptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingem” - 1:4000) e revelada com dihidroclorato de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma). Após 30 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm.

3.8 Quantificação da hemorragia intestinal e pulmonar através da dosagem de hemoglobina (Hb)

A avaliação da hemorragia intestinal e pulmonar foi realizada, através de método colorimétrico, medindo-se o conteúdo de hemoglobina nas alças intestinas e nos pulmões, conforme previamente descrito (Souza *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002). Neste método a hemoglobina reage com o reagente de Drabkin formando cianometahemoglobina. A absorbância final a 540 nm é proporcional a concentração de hemoglobina. Assim, quanto maior for a hemorragia tecidual, maior a quantidade de sangue e, por conseguinte, maior a concentração de hemoglobina.

Os animais NI e infectados foram decapitados, parte do intestino e pulmão retirado e pesado. Em seguida o tecido foi homogeneizado (Tekmar TR-10, Ohio; USA) em 2 mL de reagente de Drabkin (Kit de dosagem de hemoglobina-Labtest; São Paulo/Brasil). O homogenato foi centrifugado (10.000 rpm; 4°C; 15 minutos) e o sobrenadante filtrado usando filtro 0,22 µm (Millipore). A concentração de hemoglobina das amostras foi determinada através de leitura com espectrofotômetro a 540 nm, usando leitor de microplacas de ELISA (SPECTRAMax PLUS, microplate spectrophotometer, Molecular Devices; California/USA). As leituras foram comparadas as de uma curva-padrão de hemoglobina, com concentrações de 400 a 25 µg de hemoglobina. Os resultados foram expressos como concentração (em µg) de hemoglobina por 100 mg de intestino/ pulmão.

3.9 Análise Histopatológica

Os tecidos foram coletados e fixados por imersão em solução de formol tamponado a 10% (p/v), pH 7,2 durante 48 horas, com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do tecido. Em seguida, foram submetidos à desidratação induzida por concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e absoluto), sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool. Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consiste em submeter os fragmentos a dois banhos

de xilol com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina.

Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia, sendo obtidos dois cortes semi-seriados com 05 micrômetros de espessura e 10 micrômetros de intervalo. Cada corte foi colocado em banho-maria para que as fitas fossem esticadas e logo depois as lâminas foram colocadas na estufa para secarem a temperatura de 40°C.

A coloração HE (Hematoxilina-Eosina) foi realizada nas lâminas para uma observação geral das alterações histopatológicas. O processo de coloração se iniciou com a imersão das lâminas em dois banhos de xilol, de duração de 15 minutos cada, para desparafinização. Em seguida estas lâminas foram imersas em banhos sequenciais de álcool etílico absoluto, 90%, 80%, 70% e, para finalizar, água. Cada um dos banhos teve a duração de 5 minutos para hidratação do corte. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante Hematoxilina de Harris (corante ácido) por 10 minutos, em seguida lavadas em água corrente por 5 minutos. Decorrida as lavagens foi feita a diferenciação com a passagem rápida das lâminas em álcool etílico-acidulado. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante Eosina (corante básico), por 30 segundos, e em seguida lavadas em água corrente por 1 minuto. Após as lavagens, as lâminas foram imersas em três banhos rápidos de álcool etílico absoluto e levadas à estufa a 60°C por 1 hora para secagem. Depois de secas, as lâminas foram imersas em xilol e montadas com Entellan (Merck) e lamínula.

3.9.1 Escore histopatológico

Foi realizado um escore histopatológico (0-5) para avaliar a intensidade da hemorragia no pulmão e processo inflamatório no coração sendo: 0 = ausente; 1 = mínimo; 2 = leve; 3 = moderado; 4 = moderado a intenso e 5 = intenso.

3.10 Avaliação de alterações hemodinâmicas

3.10.1 Avaliação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

A pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca (FC) foram mensuradas nos animais não infectados (dia 0) e no 3°, 4°, 5° e 6° dias após a infecção. Os animais foram ambientados ao pletismógrafo durante 5 dias. A PAS e a FC foram determinadas através da técnica de pletismografia de cauda (não invasiva) nos animais acordados, utilizando o XBP1000 Series Rat Tail Blood Pressure System (Kent Scientific, Torrington, CT), conforme descrito (Krege *et al.*, 1995). Foi utilizado o software LabChart e o sistema PowerLab para aquisição e análise dos resultados.

3.10.2 Avaliação da permeabilidade vascular

Para a avaliação da permeabilidade vascular, utilizou-se o corante azul de Evans como um marcador, uma vez que ele se combina de maneira reversível com a albumina, podendo ser avaliado o extravasamento plasmático, como descrito por Saria & Lundberg (1983). O método consiste na determinação quantitativa por espectrofotometria da quantidade de azul de Evans extravasado para o tecido em estudo (Saria e Lundberg, 1983).

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de xilazina (10 mg/kg, Bayer®) e cetamina (150 mg/Kg, Cristália®). Posteriormente, a veia caudal foi canulada e administrou-se 100 µL de Azul de Evans 0.5% (p/v). Ao final de trinta minutos, os animais foram perfundidos com salina fisiológica (5,0 mL por animal). O pulmão, fígado, rim, coração e o estômago foram retirados e colocados em placas de Petri para secagem por 24 horas em estufa a 40°C. Em seguida, as amostras foram pesadas e foi acrescentado ao tecido 1 mL de formamida, para extração do corante, que permaneceu por 24 horas em temperatura ambiente. O corante extraído do tecido foi quantificado em leitor de ELISA, utilizando-se o comprimento de onda de 620 nm (Molecular Devices, USA) e a concentração determinada através de uma curva padrão com concentrações variando de 0,375 a 10 µg/mL de azul de Evans. Os resultados foram normalizados pelo peso do tecido e expressos como quantidade (em µg) de azul de Evans por 100 mg de tecido.

3.11 Imuno-histoquímica

Para avaliar os tipos celulares infectados pelo DENV-3 no coração, os tecidos foram removidos e fixados em solução de formol (10% em PBS), pH 7.4 por 48 horas. Após a fixação os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina, como previamente descrito no protocolo 3.9. A partir dos blocos de parafina foram realizados cortes histológicos seriados (seqüenciais) de 5 µm de espessura que foram montados em lâminas gelatinizadas (2 cortes/lâmina). As lâminas foram cobertas com 2% (p/v) de “3 aminopropyltriethylsilane” (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO), desparafinizadas, imersas em xilol, em seguida, álcool e posteriormente incubadas com 3% (p/v) de peróxido de hidrogênio diluído em tampão tris salina (TBS) (pH 7,4) por 40 minutos. Todas as lâminas foram submetidas ao pré-tratamento em solução tampão a 98°C em banho maria por 20 minutos, para recuperação antigênica. Foram realizados bloqueios da peroxidase endógena e da proteína avidina, por 15 minutos cada. Os tecidos foram então, incubados com anticorpo primário: anticorpo policlonal de anti-NS3 MAb E1D8, na diluição 1:300, a 4°C “overnight” na câmara úmida. Após lavagem em PBS, as lâminas foram cobertas com streptavidina-biotina [streptavidin-biotin kit EnVision® + Dual Link System-HRP (Dako)] e, em seguida, incubadas em 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) em solução cromógena (K3468, Dako) por 5 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e analisadas em microscópio óptico. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por 1% (p/v) de PBS-BSA.

3.12 Determinação do status redox cardíaco após a infecção experimental pelo DENV-3

3.12.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica no coração

A peroxidação lipídica foi determinada usando o ácido tiobarbitúrico que reage com o malonaldeído (MDA) decorrente da peroxidação lipídica formando as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A determinação dos

níveis de TBARS foi realizada pelo método descrito por Ohkawa e cols. (1979) (Ohkawa *et al.*, 1979). O coração foi homogeneizado em solução tampão fosfato-PBS mmol/L: (137 NaCl, 1,5 NaH₂PO₄, 8,1 Na₂HPO₄, pH 7,4) e posteriormente alíquotas do homogeneizado (0,2 mL) foram adicionadas em 8,1% (p/v) de duodecil sulfato de sódio (SDS), 2,5 mol/L de ácido acético (pH 3,4), 0,8% de ácido tiobarbitúrico. A mistura foi incubada por 60 minutos a 95°C. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm.

3.12.2 Determinação da atividade enzimática da glutathiona peroxidase no coração

A determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) foi realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH (Paglia e Valentine, 1967). A reação consiste na adição de 1300 µL de água destilada, 200 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1 mol/L; pH 8,0; 5 mmol/L), 200 µL de 10 U/mL de glutathiona redutase (GSH-Rd), 200 µL de NADPH (2,0 mmol/L), 40 µL de glutathiona (0,1 mol/L) e 40 µL da amostra. A mistura foi agitada em vórtex durante 10 segundos. Em seguida, foi adicionado 20 µL de T-butil hidroperóxido (7 mmol/L) e a mistura foi mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína (U/mg proteína).

3.12.3 Determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) no coração

A atividade da SOD foi avaliada conforme previamente descrito (Gao *et al.*, 1998; Dieterich *et al.*, 2000). Após a homogeneização do tecido em PBS [137 NaCl, 1,5 NaH₂PO₄, 8,1 Na₂HPO₄ (mmol/L), pH 7,4], foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de sódio (50 mmol/L, pH 7,8) contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA). Alíquotas de 0,04 mL da amostra foram utilizadas e a reação foi iniciada com a adição de pirogalol (0,2 mmol/L). A leitura no espectrofotômetro foi realizada durante 3 minutos a 37°C a 420 nm. A determinação da atividade da enzima dada em U/mg foi calculada como a

capacidade da superóxido dismutase em inibir a autooxidação do pirogalol, onde 1U= 50% de inibição da autooxidação do pirogalol.

3.12.4 Determinação da atividade enzimática da catalase no coração

O protocolo experimental para determinação da atividade da catalase foi realizado conforme descrito por Nelson e Kiesow (1972) (Nelson e Kiesow, 1972), de forma que depois que o tecido foi homogeneizado em PBS (137 NaCl, 1,5 NaH₂PO₄, 8,1 Na₂HPO₄ mmol/L, pH 7,4) a atividade da enzima foi determinada em 2 mL de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7.0) e uma alíquota (0,04 mL) do homogeneizado foi adicionada. Em seguida foi adicionado 0,06 mL de substrato (H₂O₂ 0,3 mol/L), e a leitura foi realizada durante 1 minuto a 25°C a 240 nm. A atividade da catalase foi calculada pela variação da atividade da enzima durante um minuto, e o resultado foi expresso como nmol min⁻¹ por mg/proteína.

3.12.5 Determinação da concentração de proteína nas amostras

A determinação da concentração de proteínas de todos os ensaios foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando o corante *Coomassie blue*. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para quantificação das concentrações de proteínas nas amostras foi realizada uma curva padrão para albumina bovina. As concentrações utilizadas foram de 0,5 a 10 µg de albumina.

3.12.6 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) no coração

A sonda dihidroetidina (DHE) foi utilizada para avaliar *in situ* a formação de ROS, conforme previamente descrito (Miller *et al.*, 1998). A DHE penetra livremente nas células e, em presença de ROS, especialmente ânion superóxido (O₂⁻), a dihidroetidina é oxidada a etídio, o qual é capaz de se intercalar ao DNA das células e emitir fluorescência. Os corações dos animais NI e infectados foram embebidos em composto OCT (resina para

congelamento rápido de tecidos e corte em criostato; Tissue-Tek; Qaigen, Hilden, Alemanha), e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para posterior secção em criostato. Os corações congelados foram então seccionados em cortes de 20 µm de espessura e aderidos a lâminas de vidro, tratadas com poli L-lisina. A dihidroetidina (10^{-6} mol/L) foi aplicada ao corte. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, protegida da luz a 37°C, durante 20 minutos. As imagens foram capturadas em microscópio confocal (Zeiss 510 Meta do Centro de Microscopia Eletrônica - ICB/UFMG), equipado com laser Kriptônio/Argônio. A sonda foi excitada a um comprimento de onda de 488 nm e fenda de emissão de 515 nm. A análise quantitativa das imagens foi realizada através do software IMAGE J (1.45) e expressa como intensidade da fluorescência de dihidroetidina (% de emissão por núcleos).

3.13 Ecocardiograma de alta resolução

Os animais não infectados e os animais no terceiro e sexto dia após a infecção foram submetidos a Ecocardiografia de alta resolução utilizando aparelho Vevo 2100 (Visual Sonics). Após indução anestésica com isoflurano 2,5% (Cristália®), foi realizada remoção química dos pêlos do tórax e abdômen, utilizando o removedor Nair (Church & Dwight Canada Corp.). A manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano entre 1% e 1.5% (p/v) de forma que a frequência cardíaca não teve grandes oscilações sendo mantida em torno de 400 batimentos por minuto. Em todos os experimentos foi utilizado um transdutor mecânico de 40 mHz. A penetração máxima deste transdutor é 1,2 cm com uma resolução de 30 µm, operando a uma taxa de *frame* de 32Hz.

Para realização do exame ultrassonográfico foi utilizado gel para transmissão ultrassônica. Avaliações funcionais e dimensionais foram realizadas *offline* com as imagens geradas em modo M e bidimensional com a gravação de CINE loops da visão paraesternal esquerda, eixos curto e longo do coração. Foram realizadas medidas do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, volume sistólico, volume sistólico final, volume diastólico final, fração de encurtamento, fração de ejeção e débito cardíaco, tempo de relaxamento isovolumétrico e relação E/A.

Todos os exames foram realizados por um único operador que não conhecia a identidade dos animais.

3.14 Eletrofisiologia celular

Com o objetivo de estudar como estavam as correntes para cálcio e o potencial de ação de células do músculo cardíaco, foi feito o estudo eletrofisiológico. Um amplificador EPC 9.2 (HEKA Instruments, Germany) foi utilizado para estudar os parâmetros eletrofisiológicos de células ventriculares cardíacas isoladas. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se as configurações '*whole-cell voltage-clamp*', para medir as correntes totais de membrana, ou '*whole-cell current-clamp*', para medir potenciais de ação, de acordo com Hamill e cols. (1981) (Hamill *et al.*, 1981). Para todos os experimentos com eletrofisiologia, após a obtenção da configuração *whole-cell*, foram esperados cerca de 3-5 minutos para permitir o equilíbrio entre solução de pipeta e citoplasma. As pipetas utilizadas nos experimentos possuíam resistência entre 1-3 M Ω . Todas as correntes foram filtradas passa-baixa com frequência de corte de 2.9 kHz.

3.14.1 Isolamento dos cardiomiócitos

Os cardiomiócitos ventriculares foram isolados pelo método de digestão enzimática, tal como descrito previamente (Shioya, 2007), com algumas adaptações. Os corações foram montados em um sistema de Langendorff e foram perfundidos retrogradamente, sob pressão constante (98 cmH₂O) e temperatura controlada (37°C), por cinco minutos com uma solução tampão livre de cálcio (CIB, *cell isolation buffer*), contendo os seguintes componentes (em mmol/L): NaCl 130; KCl 5,4; MgCl₂ 0,5; NaH₂PO₄ 0,33; glicose 22; HEPES 25 e EGTA 0,4 (pH=7,4 ajustado com NaOH 1,0 mmol/L). Em seguida, os corações foram perfundidos por aproximadamente 5 minutos com o CIB (sem EGTA) contendo 0,3 mmol/L de CaCl₂; 1 mg/mL de colagenase tipo II; 0,06 mmol/L de protease XXIII e 0,06 mmol/L de tripsina. Os corações foram removidos da cânula e então o ventrículo esquerdo foi separado, cortado em pequenos pedaços para que logo em seguida fosse submetido por 10 minutos

a uma segunda etapa digestiva com o CIB suplementado com as enzimas previamente citadas e com 0,7 mmol/L de CaCl_2 . Posteriormente, as células isoladas foram filtradas (*mesh* de 150 μm), centrifugadas (3.000 rpm; 4°C; 3 minutos) e ressuspensas em solução de CIB contendo 1,2 mmol/L de CaCl_2 e 2,0 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA). Após o intervalo de tempo de 5 minutos, as células foram novamente centrifugadas (3.000 rpm; 4°C; 3 minutos) e finalmente re-suspensas em solução de Tyrode (com BSA, 2mg/mL), contendo a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 140; KCl 5,4; MgCl_2 0,5; NaH_2PO_4 0,33; glicose 11; HEPES 5 e CaCl_2 1,8 (pH=7,4 ajustado com NaOH 1,0 mmol/L). Foram utilizadas apenas aquelas células tolerantes ao cálcio, quiescentes, com padrão de estriamento e morfologia da membrana celular normais.

3.14.2 Estudo do potencial de ação de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo

Para aquisição do potencial de ação (PA) foi utilizada a mesma solução intra e extracelular (em mmol/L): K-aspartato 130,0; KCL 20,0; HEPES 10,0; MgCl_2 2,0; NaCl 5,0; EGTA 5,0 e pH ajustado para 7,2 com KOH) (Tyrode). Os potenciais de ação foram obtidos a partir de um potencial de membrana de -80 mV, sendo este potencial obtido pela injeção de corrente nos cardiomiócitos da ordem de -100 a - 700 pA. O pulso para obtenção do potencial de ação era uma onda quadrada de intensidade de 1 nA e duração entre 3-5 ms. A frequência de aquisição foi de 20 kHz e de estímulo de 1 Hz. Foram adquiridos entre 30-50 potenciais de ação para cada célula, sendo o último utilizado para análise. O *overshoot*, a máxima taxa de despolarização, a amplitude e a duração (a 10, 30, 50, 70 e 90% da repolarização) foram calculados tanto para os animais não infectados, quanto para aqueles infectados a 3 e 6 dias.

3.14.3 Avaliação da corrente de cálcio no ventrículo esquerdo

Para medir a corrente de cálcio do tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$) foi utilizada solução interna (em mM): 120 cloreto de céσιο (CsCl), 20 cloreto de tetraetilamônio (TEA-Cl), 5 NaCl, 10 Hepes, 5 EGTA, pH 7,2 ajustado com hidróxido de céσιο

(CsOH), sendo a solução externa Tyrode. $I_{Ca,L}$ foi medida através da aplicação de pulsos que variaram de -50 a +50 mV (com incrementos de 10 mV), com duração de 300 ms, partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV. Um pré-pulso de 50 ms de duração, partindo do potencial de membrana para -40 mV, foi aplicado para inativar as correntes de sódio e de cálcio do tipo T. A aquisição dos dados foi realizada com frequência entre pulsos de 0,1 Hz, e frequência de aquisição a 10 kHz.

3.15 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM). As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Diferenças entre as curvas de sobrevida foram calculadas usando o teste Log rank. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 5.00,2007). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Modelo de infecção experimental pelo vírus da Dengue (DENV-3)

4.1.2 Padronização da curva de letalidade pelo vírus da Dengue (DENV-3)

Foram utilizados cinco inóculos do vírus da Dengue (10^{-1} , 1, 10^1 , 10^2 e 10^3 PFU) para a determinação da dose letal para 50% dos animais (DL_{50}). Quando infectados com 10^3 PFU, todos os animais sucumbiram à infecção em 6 dias. A infecção com 10^2 PFU levou à 100% de letalidade em 7 dias (figura 7 a). O inóculo de 1 PFU causou a morte de 50% dos animais infectados no 7º dia e progressiva perda de peso (figura 7 b). O inóculo de 10^{-1} PFU não induziu letalidade nos animais infectados.

4.1.3 Determinação da carga viral no terceiro e sexto dia após a infecção com o inóculo de 01 PFU (DL_{50} do vírus)

O título viral no fígado e baço (figura 9 a e b, respectivamente) dos animais infectados com 1 PFU no terceiro e sexto dia aumentou significativamente de acordo com a cinética da infecção. Por outro lado, a viremia (figura 8 c) só foi detectada no sexto dia após a infecção com título viral elevado, de aproximadamente 10^6 PFU por mL de sangue.

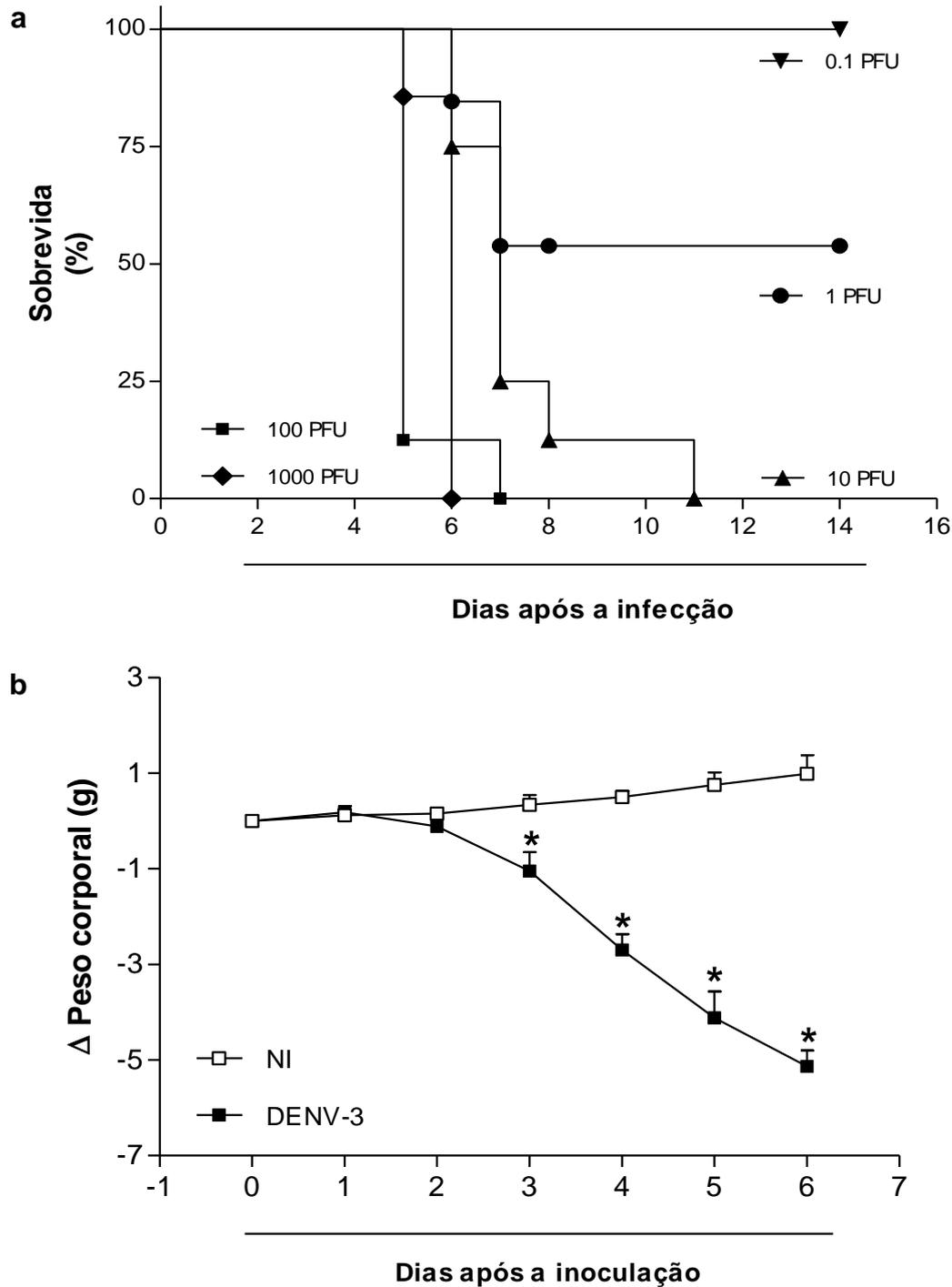


Figura 07. Letalidade e perda de peso após infecção com DENV-3. A letalidade (a) foi observada após infecção com os inóculos de 10^{-1} , 1, 10^1 , 10^2 e 10^3 PFU do vírus da Dengue. A variação do peso corporal (b) foi analisada nos animais NI e nos animais infectados por via intraperitoneal com 01 PFU (DL_{50}). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). * $P < 0,05$, quando comparado a animais não infectados.

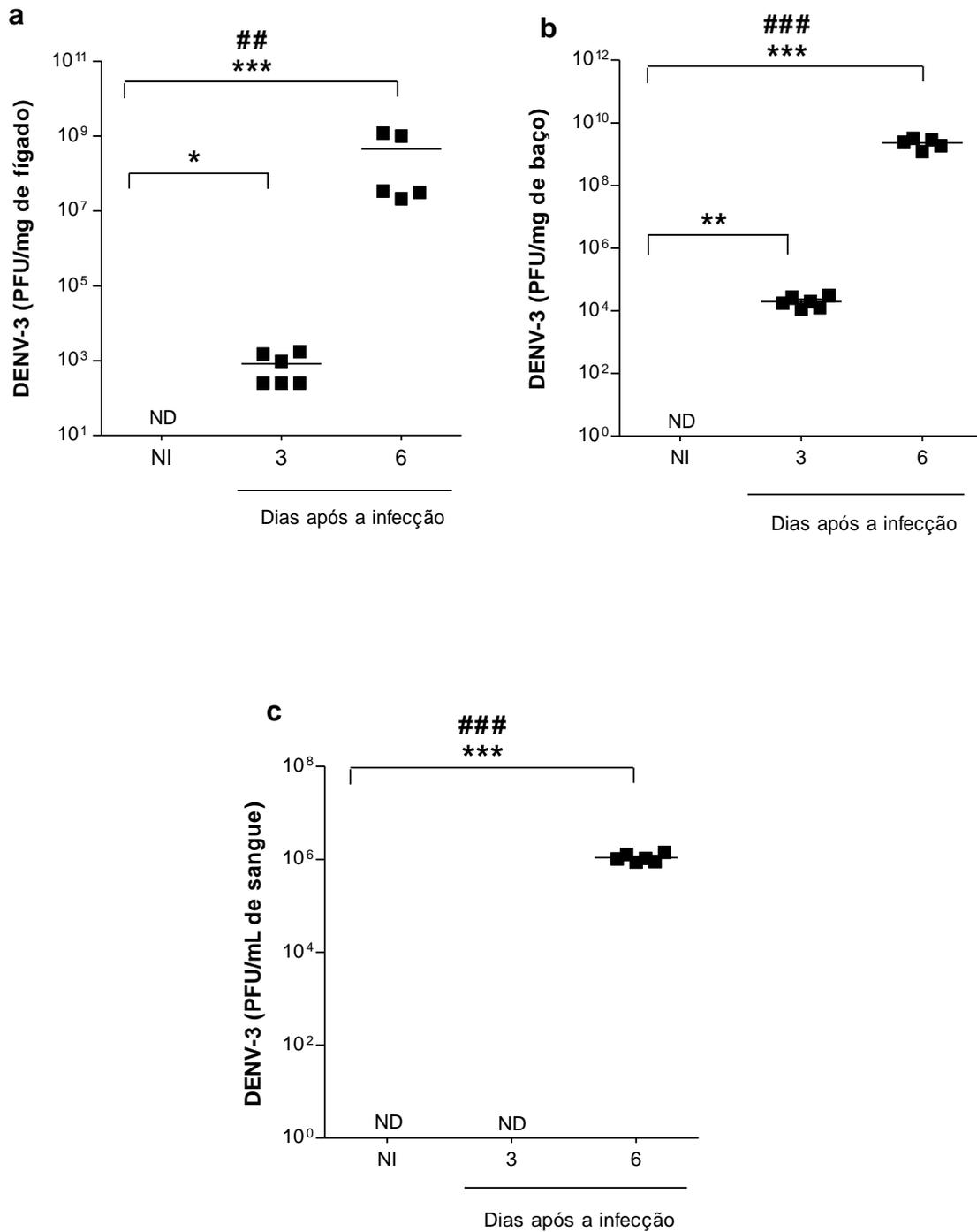


Figura 08. Determinação da carga viral após infecção com a DL₅₀ do vírus DENV-3 adaptado. A carga viral foi analisada no fígado (a), baço (b) e sangue (c) após a infecção pelo vírus da Dengue. Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

4.1.4 Avaliação das alterações hematológicas

Os resultados relacionados às alterações hematológicas mostram o caráter progressivo dos sinais associados à gravidade da doença, sendo evidenciada uma importante plaquetopenia (figura 09a). Ocorre uma redução significativa de plaquetas circulantes no terceiro dia ($614,5 \pm 18,3$, $n = 12$), que é ainda mais acentuada no sexto dia após a infecção ($381,2 \pm 17,7$, $n = 12$), quando comparados aos animais NI ($814,5 \pm 21,1$, $n = 12$). Os níveis de hematócrito, que refletem a hemoconcentração por perda de plasma sanguíneo para sítios de inflamação e infecção, mostraram-se intensamente elevados no terceiro e sexto dia após infecção (figura 09b). Além disso, os animais após a infecção apresentam hipoalbuminemia no 3° e 6° dia após a infecção, sugerindo redução de volume plasmático (figura 09c).

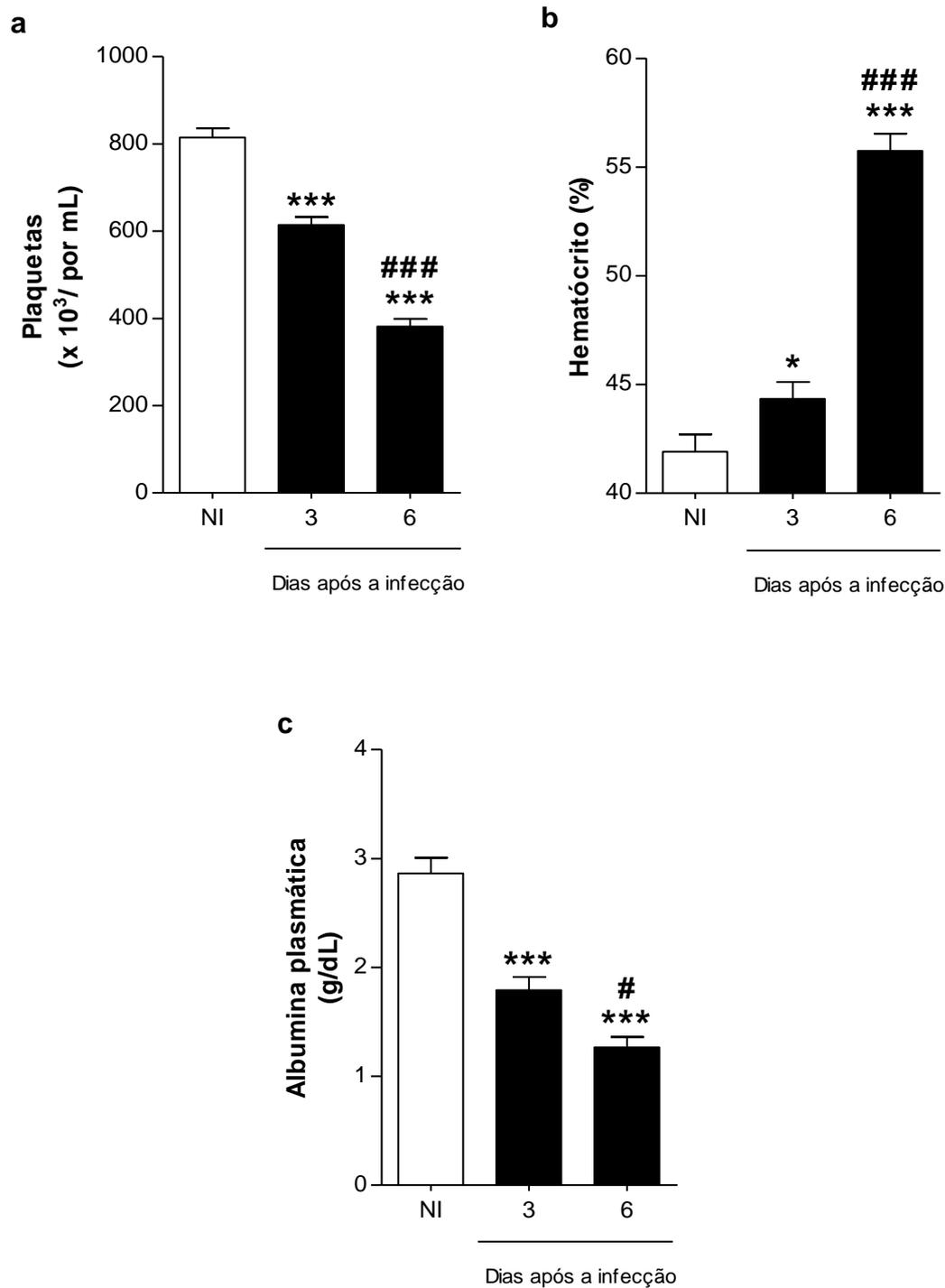


Figura 09. Alterações hematológicas após infecção com DENV-3. Intensa plaquetopenia (a), aumento nos níveis de hematócrito (b) e hipoalbuminemia (c). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais por grupo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

4.1.5 Cinética da resposta inflamatória

O recrutamento de leucócitos para os órgãos alvo da infecção pôde ser quantificado por ensaios que medem a atividade de enzimas presentes em certas populações celulares, como mieloperoxidase (MPO), enzima com alta expressão em neutrófilos e usada como marcador da presença dessas células (Mullane *et al.*, 1985; Cross *et al.*, 2003) e N-Acetil- β -D-Glicosaminidase (NAG), presente em macrófagos e, da mesma maneira, utilizada como marcador do acúmulo dessas células (Bailey, 1988).

Através da dosagem de MPO, observou-se um aumento no recrutamento de neutrófilos para os pulmões e baço de camundongos infectados com 1 PFU no terceiro dia após a infecção e uma amplificação dessa resposta no sexto dia após a infecção (figura 10a e c). No entanto, no fígado os níveis de MPO permaneceram inalterados no 3º dia, aumentando significativamente apenas no 6º dia após a infecção (figura 10b). Os níveis de NAG nos pulmões, fígado e baço de camundongos no terceiro dia após a infecção não foram diferentes dos observados nos animais NI. Entretanto, no sexto dia após a infecção observou-se um aumento dos níveis dessa enzima nos pulmões e fígado, sugerindo que ocorre recrutamento de macrófagos para estes órgãos (figura 10d, e e f).

Após a infecção pelo vírus da Dengue, os níveis das enzimas transaminases hepáticas, AST e ALT no soro foram aumentados somente no 6º dia após a infecção ($402,9 \pm 57,0$, $n = 6$ e $190,7 \pm 30,3$, $n = 6$, respectivamente), não sendo observado aumento das mesmas no 3º dia após a infecção ($52,5 \pm 3,6$, $n = 6$ e $48,8 \pm 6,4$, $n = 6$) com relação aos animais NI ($51,3 \pm 2,5$, $n = 6$ e $38,8 \pm 4,8$, $n = 6$) (figura 11a e b).

Com relação à hemorragia tecidual, observou-se importante aumento dos níveis de hemoglobina no intestino e pulmão, caracterizando de forma indireta a ocorrência de hemorragia tecidual. Esses achados não foram observados nos animais NI, conforme demonstrado na figura 11c e d.

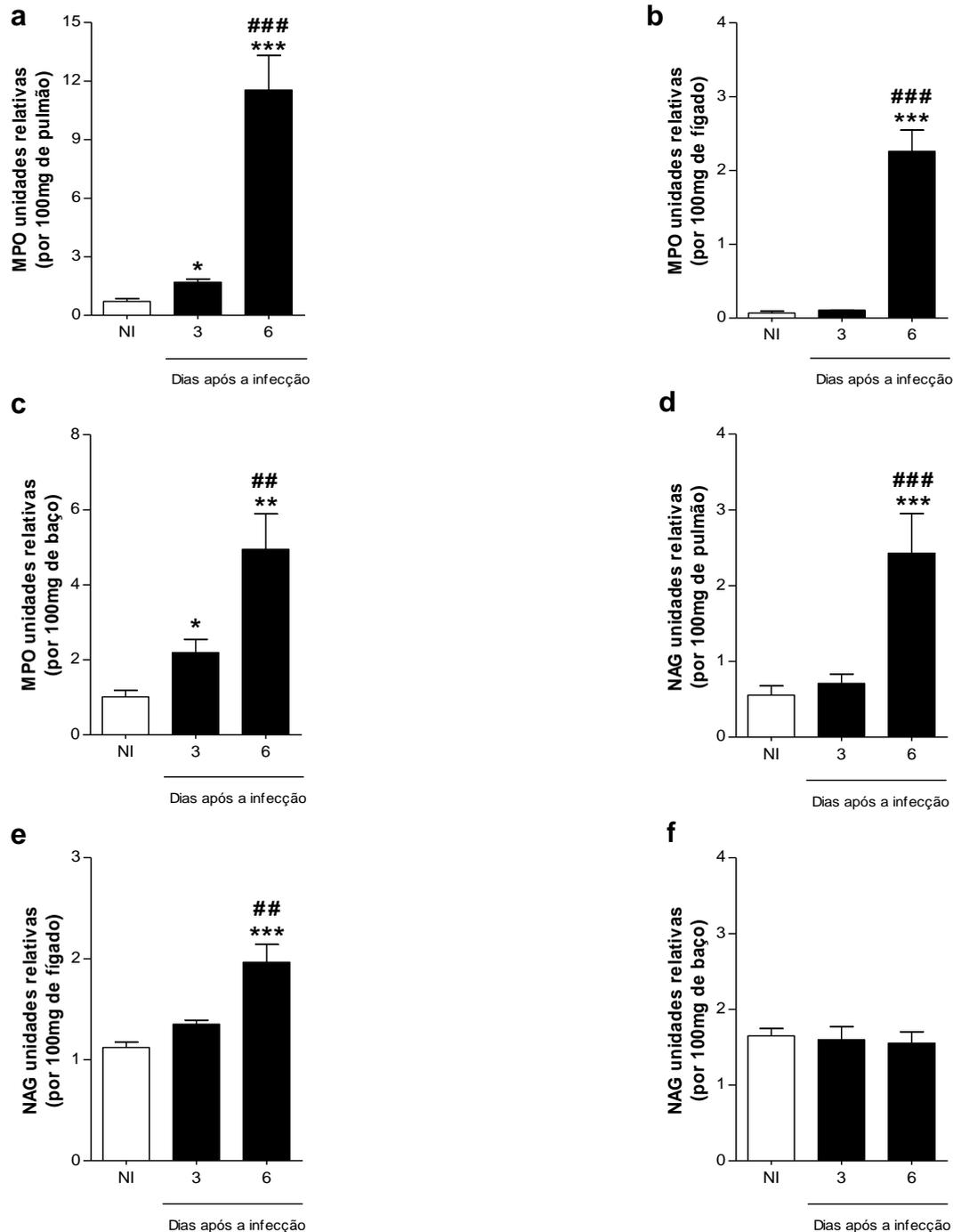


Figura 10. Níveis de Mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil-β-D-Glicosaminidase (NAG) no pulmão, fígado e baço de animais NI e infectados com DENV-3. Medida indireta do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o pulmão (a, d), fígado (b, e) e baço (c, f), respectivamente. Os resultados foram expressos como média ± EPM (n = > 6 animais). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 quando comparado a animais não infectados. ## P < 0,01, ### P < 0,001 quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

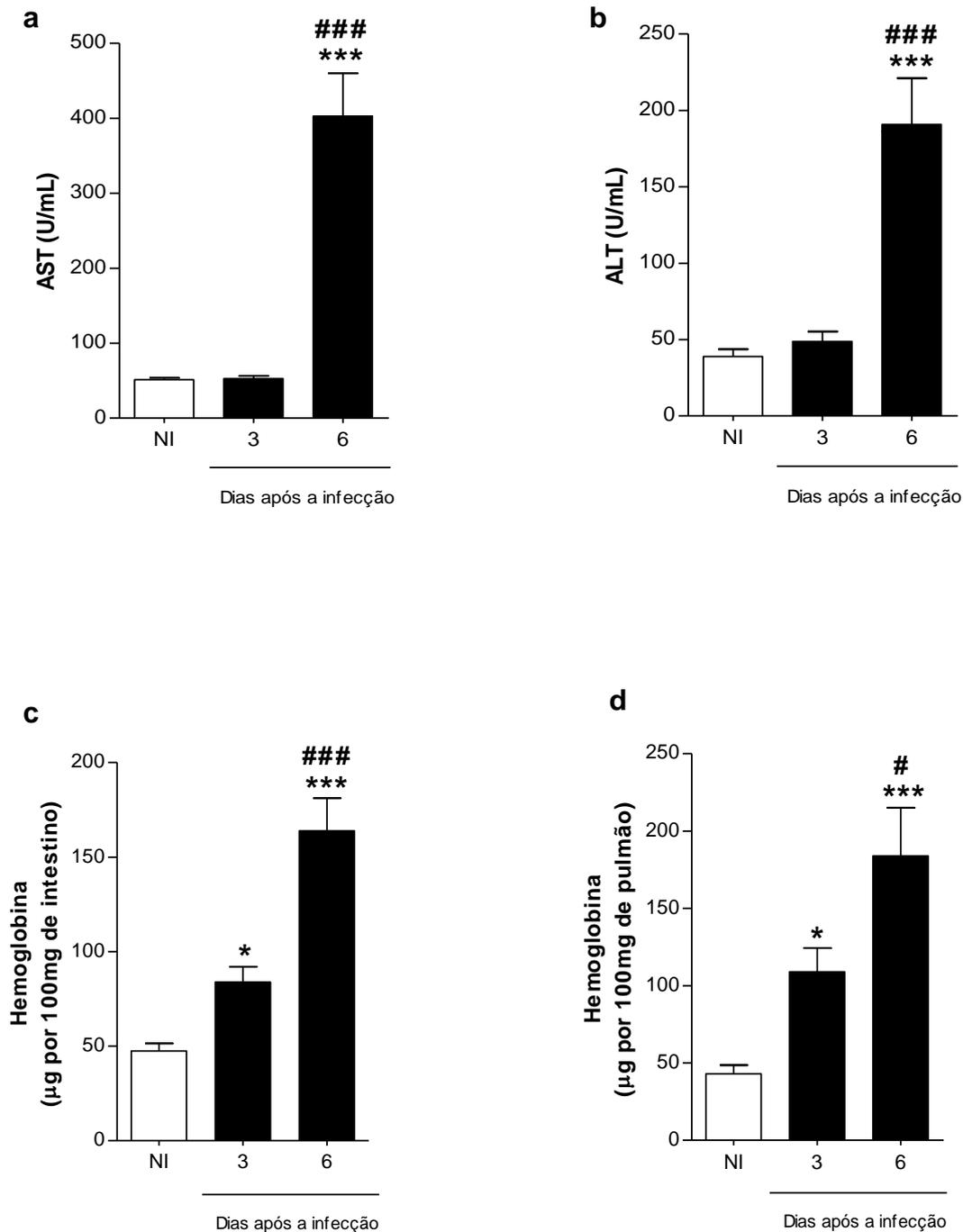


Figura 11. Avaliação de lesão hepática e hemorragia tecidual induzida pela infecção com DENV-3. Níveis de transaminases hepáticas AST (a) e ALT (b) no soro e quantificação de hemoglobina no intestino (c) e pulmão (d). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = > 6$ animais). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

Foram feitas análises histopatológicas das secções de pulmões de camundongos infectados com o DENV-3 após 3 e 6 dias de infecção. Os pulmões dos animais não infectados apresentaram aspecto histológico normal (Fig. 12a). Focos de hemorragia e infiltrados inflamatórios peribronquial, peribronquiolar e perivascular foram visualizados no terceiro dia de infecção (Fig. 12b). Áreas extensas de hemorragia, edema alveolar e acúmulos de linfócitos, plasmócitos foram detectados no sexto dia de infecção (Fig. 12c).

Foi feito um escore histopatológico para quantificar a hemorragia pulmonar. Observou-se hemorragia pulmonar moderada a intensa nos 3° e 6° dias após a infecção, respectivamente (Fig.12d).

Na caracterização da resposta inflamatória em resposta ao vírus da Dengue (DENV-3), foram medidos os níveis sorológicos de algumas citocinas e quimiocinas que parecem participar da patogênese da doença (Yang *et al.*, 2001; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Dewi *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Restrepo *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008; Guabiraba *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2010; Rolph *et al.*, 2011). Foram quantificados os níveis de IL-1 β e IFN- γ , das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, além da CCL2/MCP-1, uma das principais quimiocinas quimioatrativa para monócitos.

Após a infecção, os níveis de IL-1 β estavam muito elevados, apresentando um pico no 3° dia após a infecção, que foi significativamente reduzido no 6° dia (figura 13a). Com relação ao IFN- γ , seus níveis não foram alterados no terceiro dia. Entretanto, no sexto dia após a infecção houve um aumento bastante significativo (figura 13b). As citocinas TNF- α e IL-6 apresentaram aumento acentuado apenas no 6° dia após a infecção, não havendo diferença entre os grupos NI e 3 dias após a infecção (figura 13c e d). A quimiocina que participa recrutamento e ativação de monócitos, CCL2/MCP-1, apresentou um aumento bastante significativo apenas no 6° dia após a infecção (figura 13e).

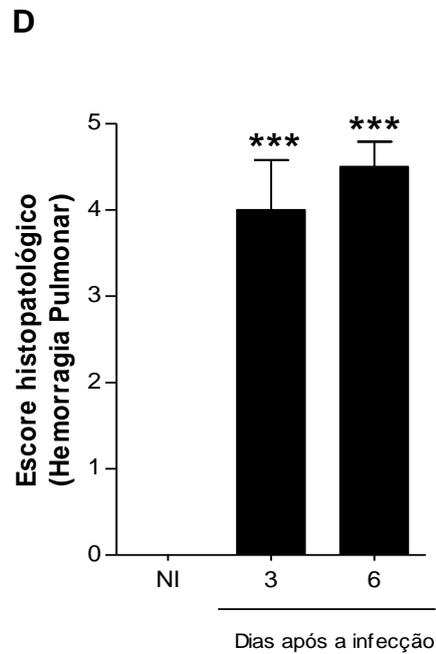
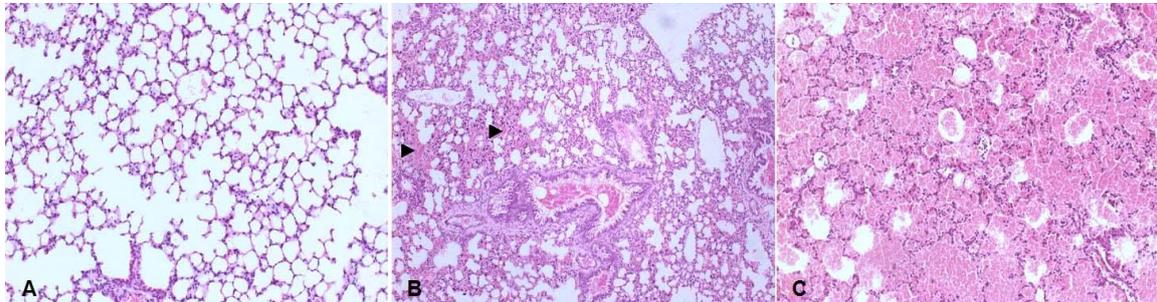


Figura 12. Análise histológica de pulmões de animais infectados ou não com DENV-3. Cortes histológicos representativos de seções de pulmões de camundongos não infectados (A) e de camundongos infectados no terceiro (B) e sexto (C) dias após a infecção com DENV-3. Escore histopatológico da hemorragia pulmonar (D). A-C: aumento original: 100x. Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados.

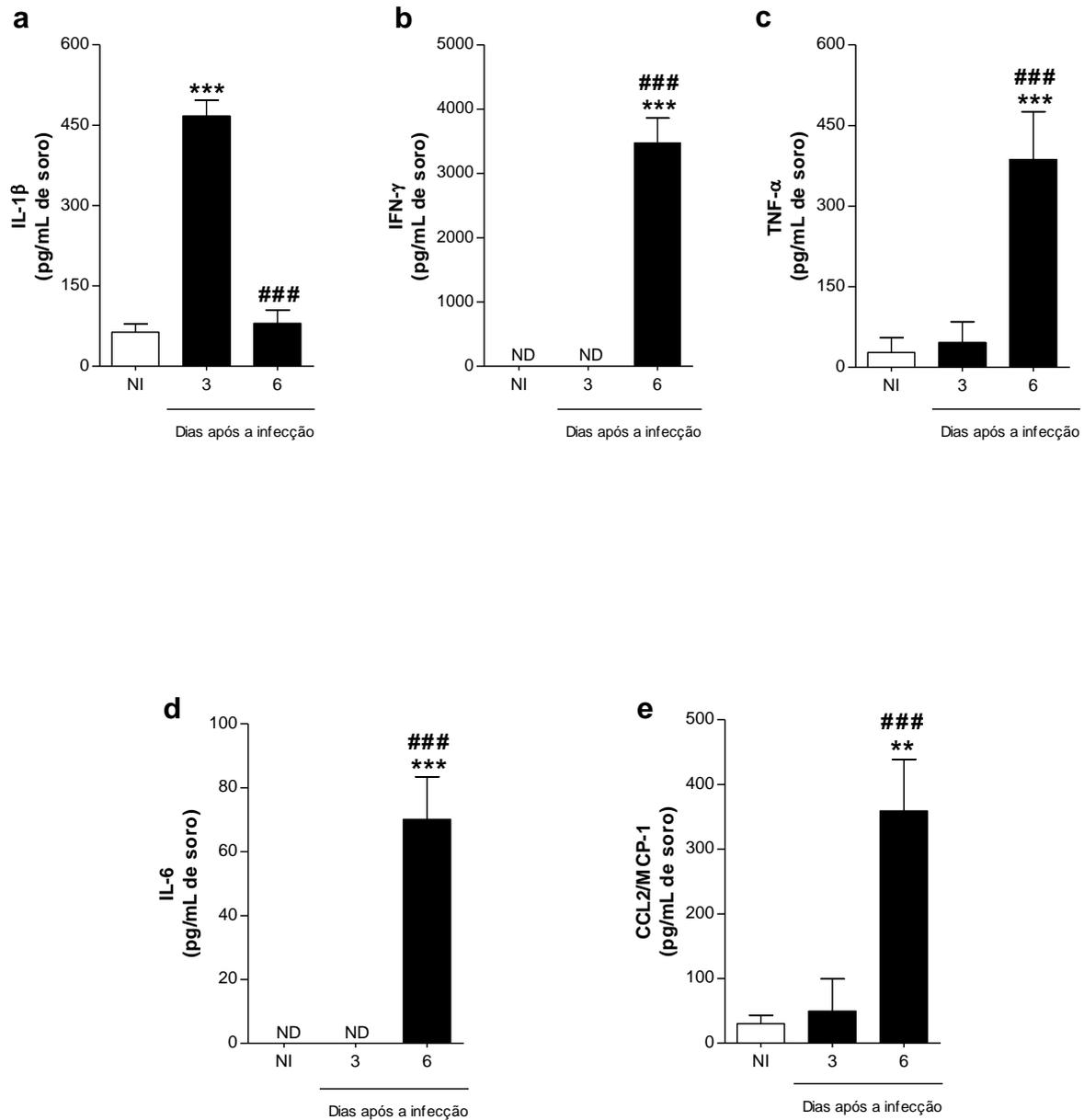


Figura 13. Níveis de citocinas e quimiocinas no soro de animais infectados ou não com DENV-3. Níveis de IL-1 β (a), IFN- γ (b), TNF- α (c), IL-6 (d) e CXCL2/MIP-2 (e) no soro de animais NI e infectados no terceiro e sexto dia após a infecção com DENV-3. Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. ### $P < 0,001$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

4.1.6 Caracterização dos parâmetros hemodinâmicos após a infecção pelo DENV-3 adaptado

Uma vez padronizado o modelo, o próximo passo foi avaliar se existiam alterações hemodinâmicas. A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada nos animais NI e em animais infectados. O gráfico está representado em forma de variação da PAS dos animais infectados em relação aos animais NI. Os valores basais de PAS dos animais NI foram 106 ± 4 mmHg ($n = 10$). Nota-se que no 3º dia após a infecção ocorre redução leve, porém significativa da PAS seguida de um sutil aumento no 4º dia (figura 14a), sugerindo que ocorra ativação de mecanismos compensatórios. Estes mecanismos compensatórios se devem a ativação de barorreflexo, uma vez que no terceiro dia há taquicardia reflexa, enquanto no quarto dia há redução da frequência cardíaca (figura 14b). Entretanto, nos dias 5 e 6 após a infecção, ocorre redução bastante significativa da PAS, ($26,0 \pm 2,5$ mmHg, $n = 6$ e $42,5 \pm 5,1$ mmHg, respectivamente, $n = 6$) (figura 14a), acompanhado de intensa taquicardia, mecanismo clássico para tentar compensar a acentuada hipotensão e redução de pré-carga observada nos animais após a infecção com o DENV-3 (figura 14b).

A fim de caracterizar os mecanismos associados à redução acentuada da PAS, avaliou-se se havia alteração na permeabilidade vascular após infecção com DENV-3. Os animais infectados apresentaram significativo aumento de permeabilidade vascular (caracterizado por aumento na concentração do corante Azul de Evans no tecido) em todos os órgãos avaliados (pulmões, fígado, coração, rins e estômago) no sexto dia, sugerindo hemoconcentração e hipovolemia (figura 15).

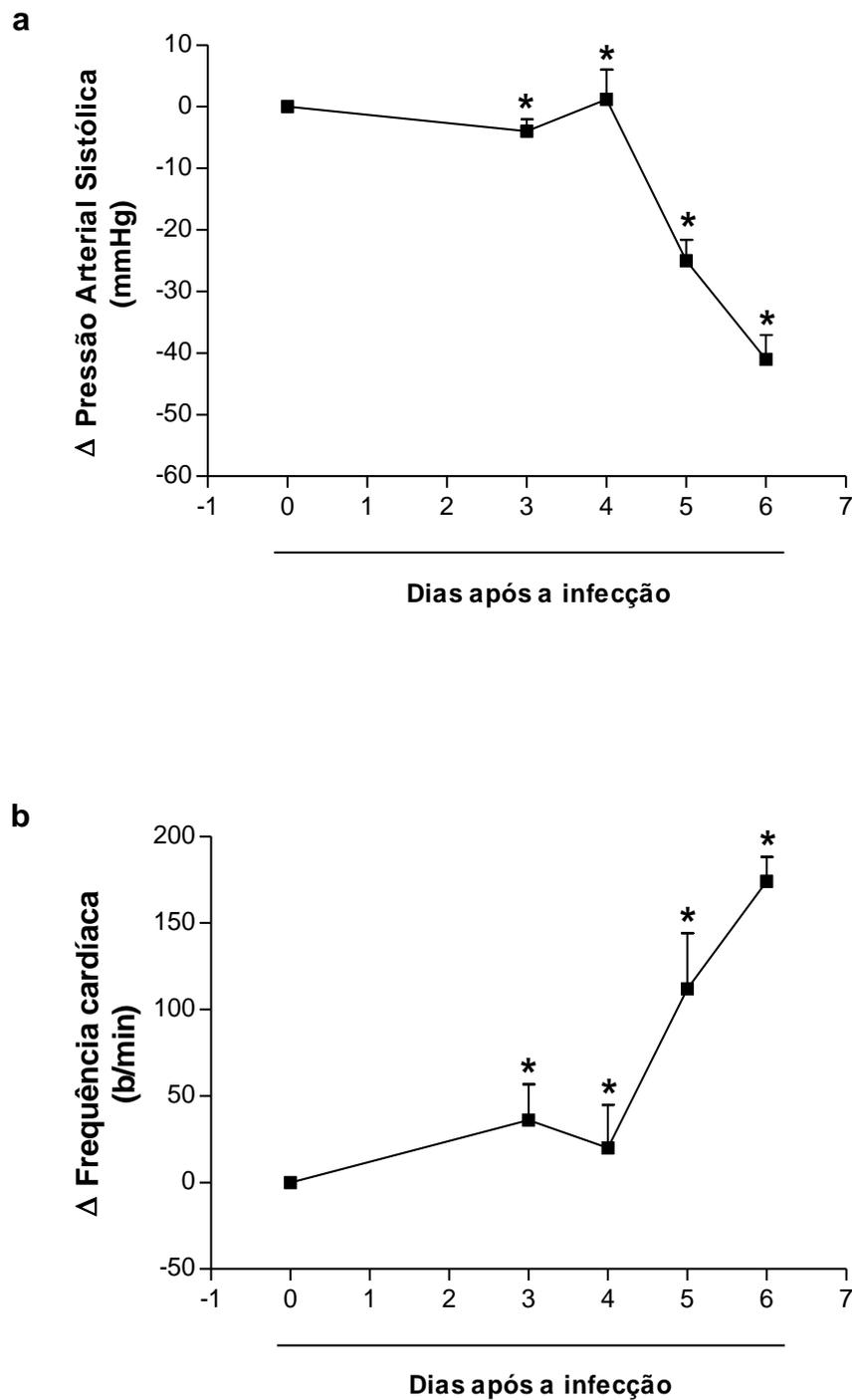


Figura 14. Avaliação do perfil hemodinâmico. Variação da pressão arterial sistólica (a) e da frequência cardíaca (b) foram avaliadas nos animais NI e durante a infecção. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n= 10 animais por grupo). * $P < 0,05$ quando comparado a animais não infectados.

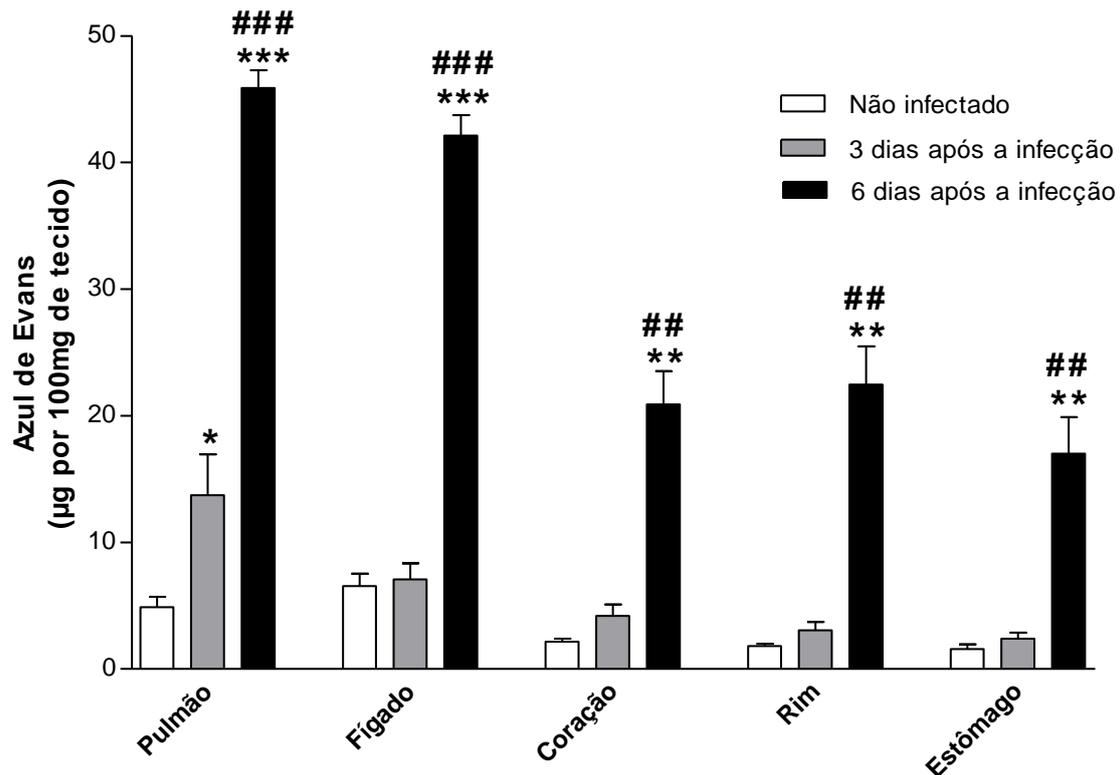


Figura 15. Avaliação da permeabilidade vascular em animais não infectados e infectados com DENV-3. As alterações de permeabilidade vascular foram avaliadas pela mensuração do extravasamento do corante azul de Evans. Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = > 6$ animais). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

4.1.7 Caracterização da resposta inflamatória no coração

4.1.7.1 Avaliação da carga viral e migração de células para o coração de animais infectados com DENV-3

Para avaliar se o coração era alvo do vírus da Dengue, a carga viral foi determinada através da técnica de titulação por placa de lise. Observa-se que o título viral no coração dos animais infectados com 1 PFU (DL_{50}) de DENV-3 aumentou significativamente de acordo com a cinética da infecção (figura 16a). Foi avaliado também o recrutamento celular para o coração. Os resultados

mostram que os níveis de MPO aumentaram significativamente no terceiro e sexto dia após a infecção (figura 16b), confirmando a migração de neutrófilos para o coração em ambos os períodos estudados. Já os níveis de NAG somente foram elevados no sexto dia após a infecção (figura 16c), sugerindo que a migração de macrófagos, diferentemente dos neutrófilos, ocorre somente no sexto dia após infecção. Uma característica interessante é o aumento da magnitude do infiltrado celular paralelo ao aumento da carga viral no coração.

4.1.7.2 Análise de alterações histopatológicas no coração de animais infectados com DENV-3

Não foram visualizadas alterações histopatológicas nos animais não infectados (figura 17A e D). As lâminas de animais após 3 dias de infecção revelaram pericardite crônica, caracterizada pela infiltração de células mononucleares (figura 17B), inflamação do pericárdio predominantemente localizada na região ventricular e focos inflamatórios contendo linfócitos, plasmócitos e macrófagos visualizados ao redor de alguns vasos sanguíneos localizados no miocárdio (ventrículos direito e esquerdo) (figura 17E). No sexto dia após a infecção todos os animais apresentaram pericardite crônica mais extensa e intensa, com maior deposição de fibras colágenas nas áreas acometidas (figura 17C). Notou-se ainda miocardite moderada, caracterizada pela infiltração de neutrófilos e macrófagos (figura 17F). Foi feito um escore histopatológico para quantificar a inflamação no coração. Observou-se inflamação leve a moderada nos 3° e 6° dias após a infecção, respectivamente (figura 17G).

4.1.7.3 Localização do vírus DENV-3 no coração de animais NI e infectados

A imuno-histoquímica para a NS3 (uma proteína não estrutural do vírus da Dengue) nas seções de coração dos animais não infectados (figura 18A) e infectados com o DENV-3, no dia 3 (figura 18B) e 6 (figura 18C) após a infecção, evidenciou a expressão da NS3 (castanho escuro) em células

inflamatórias mononucleares (setas) presentes no miocárdio. Ampliação original: 400x.

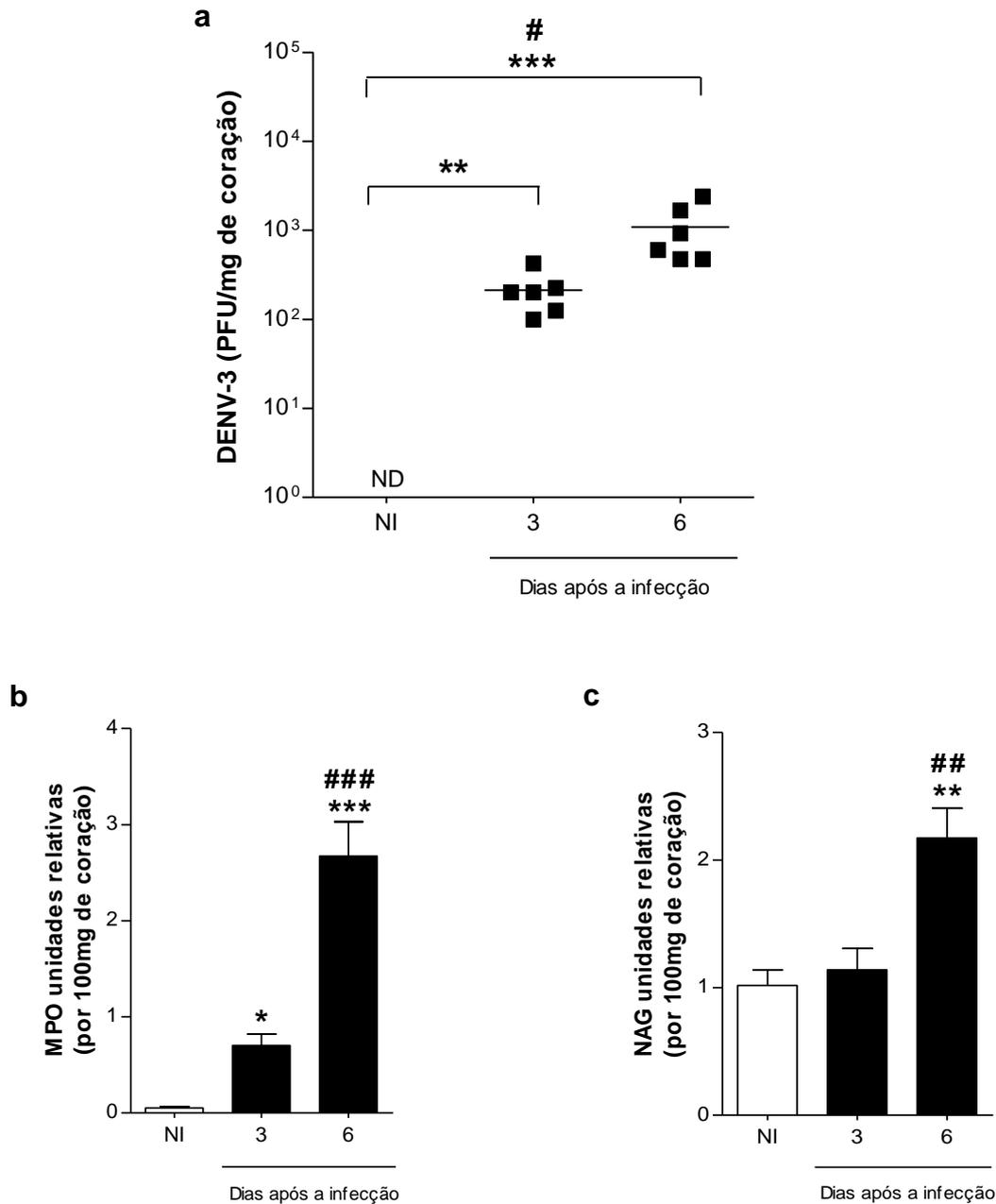


Figura 16. Determinação da carga viral e níveis de MPO e NAG após infecção com DENV-3. A carga viral (a) e o recrutamento de neutrófilos (b) e macrófagos (c) foi analisado no coração dos animais NI e infectados com o DENV-3. Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = > 6$ animais). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

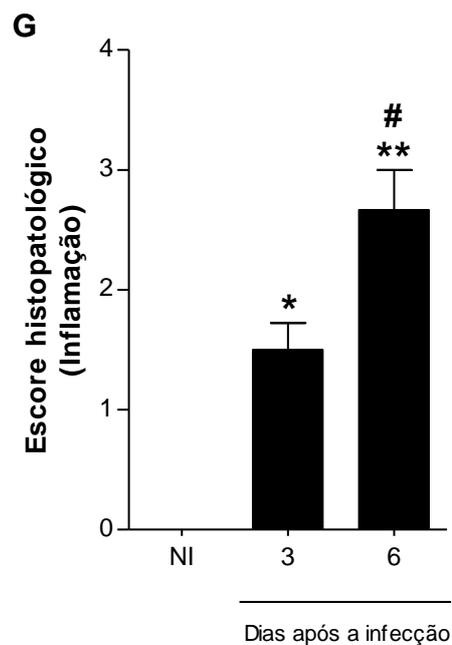
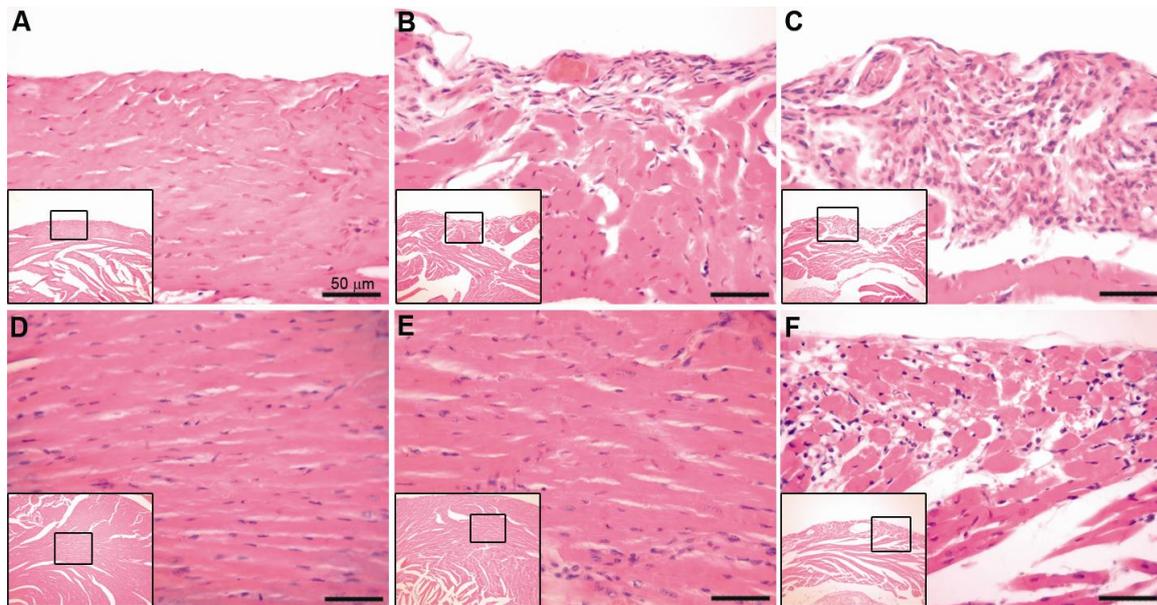


Figura 17. Análise histológica de corações de animais infectados ou não com DENV-3. Cortes histológicos representativos de secções do coração de camundongos, pericárdio (A, B e C) e miocárdio (D, E e F), não infectados (A e D) e de camundongos infectados no terceiro (B e E) e sexto (C e F) dia após a infecção com DENV-3. Aumento final: 100x. Detalhes: 400x. Escore histopatológico da inflamação no coração (G). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ quando comparado a animais não infectados. # $P < 0,05$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

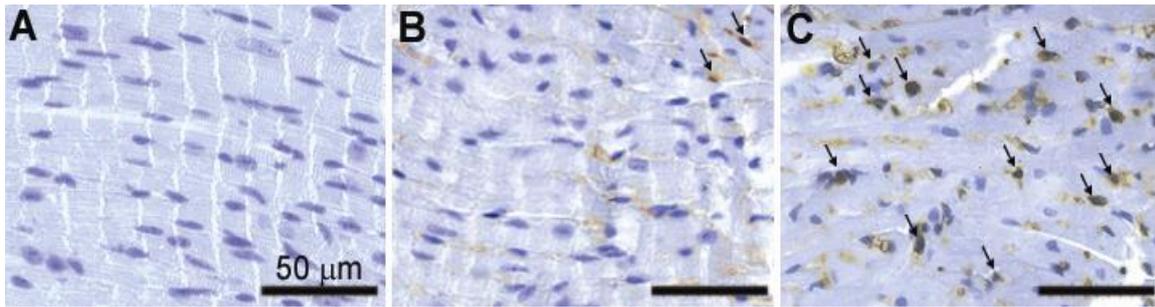


Figura 18. Imuno-histoquímica (IHQ) anti-NS3. Cortes representativos da IHQ anti-NS3 de seções do coração de camundongos não infectados (A) e de camundongos infectados no terceiro (B) e sexto (C) dias após a infecção com DENV-3. Aumento final: 400x.

4.1.7.4 Análise do perfil de citocinas observadas no coração de animais infectados com DENV-3

Houve um aumento significativo nos níveis de TNF- α no coração dos animais após 3 ($147,6 \pm 4,8$, $n = 6$) e 6 ($304,6 \pm 27,0$, $n = 6$) dias após a infecção, quando comparado com os animais NI ($96,1 \pm 7,5$, $n = 6$) (figura 19a). Os níveis de IL-6 no coração, após a infecção pelo DENV-3, foram intensamente aumentados no 6º dia ($50,4 \pm 7,5$, $n = 5$) quando comparado com animais 3 dias após a infecção e NI, cujo os níveis de IL-6 não foram detectados (figura 19b). As quimiocinas que participam do recrutamento e ativação de neutrófilos e células mononucleares, CXCL1/KC e CCL2/MCP-1, apresentaram níveis elevados no 3º dia ($470,3 \pm 107,7$, $n = 5$ e $346,0 \pm 52,3$, $n = 5$, respectivamente) que se tornaram ainda maiores no 6º dia após a infecção ($1078,3 \pm 107,8$, $n = 5$ e $565,3 \pm 91,7$, $n = 5$, respectivamente), quando comparado aos animais NI ($193,9 \pm 29,8$, $n = 5$ e $84,6 \pm 18,2$, $n = 5$) (Figura 19c e d).

Além disso, os animais infectados apresentaram um aumento de IL-17 e IL-1 β nos dias 3 ($35,8 \pm 3,3$, $n = 5$ e $28,5 \pm 3,5$, $n = 5$, respectivamente) e 6 ($121,0 \pm 7,3$, $n = 5$ e $41,2 \pm 4,0$, $n = 5$, respectivamente) após a infecção, quando comparados aos animais NI, em que os níveis de IL-17 não foram detectados e IL-1 β apresentavam-se basais ($3,2 \pm 0,6$, $n = 5$).

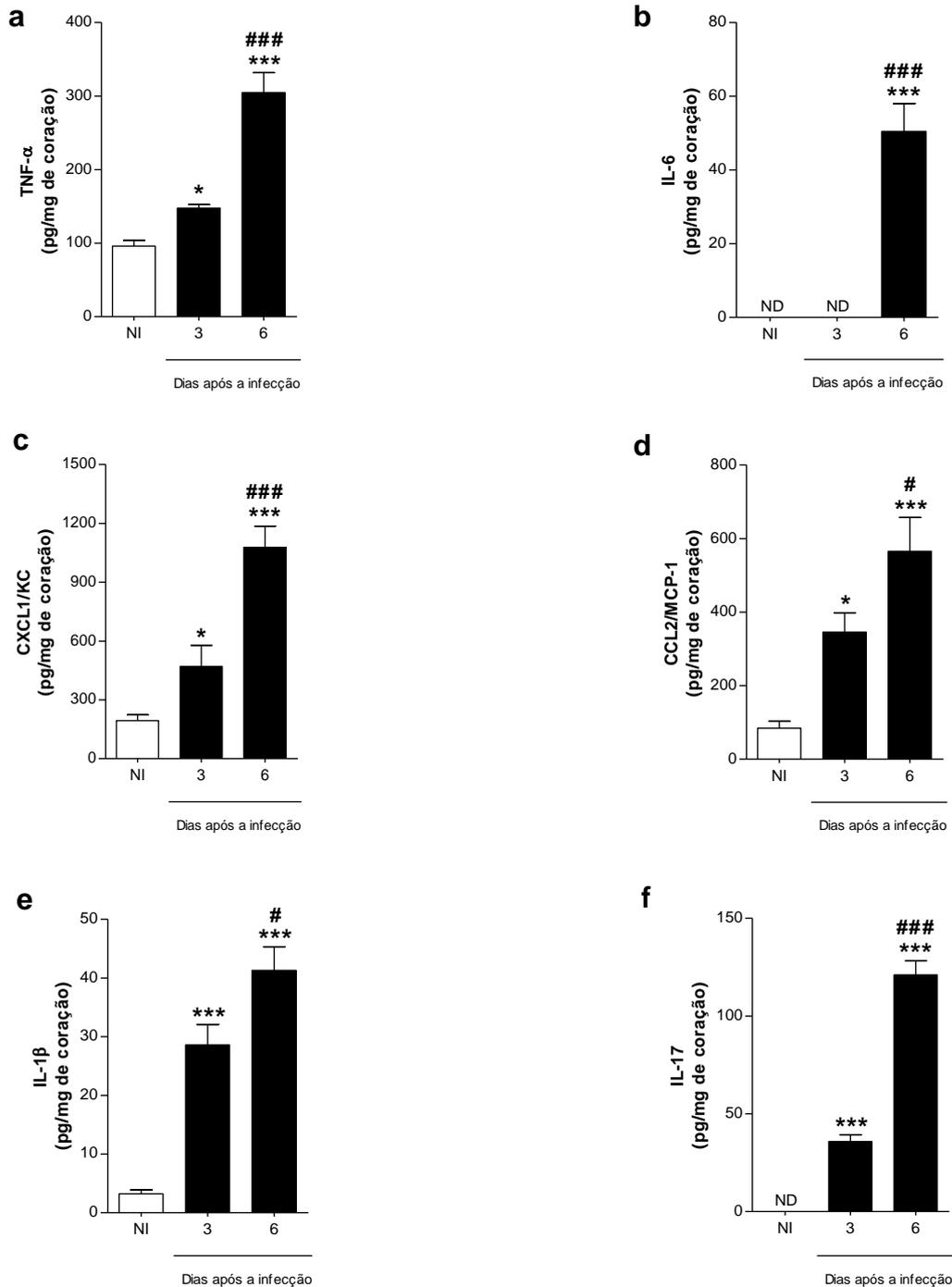


Figura 19. Níveis de citocinas e quimiocinas no coração após infecção com DENV-3. TNF- α (a), IL-6 (b), CXCL1/KC (c), CCL2/MCP-1 (d), IL-1 β (e) e IL-17 (f) no coração de animais NI e infectados no terceiro e sexto dia após a infecção com DENV-3. Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

4.1.8 Avaliação do status redox cardíaco dos animais após a infecção pelo DENV-3

Houve uma redução significativa nos níveis de glutathiona (GSH) no coração dos animais após 3 ($28,8 \pm 2,2$ n = 6) e 6 ($16,7 \pm 0,6$ n = 5) dias após a infecção quando comparado com os animais NI ($48,3 \pm 6,1$, n = 5) (figura 20a). Os níveis de peroxidação lipídica, avaliados indiretamente pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no coração foram acentuadamente aumentados no coração dos animais infectados no sexto dia ($205,9 \pm 8,4$ n = 4), quando comparados a animais infectados no terceiro dia ($107,6 \pm 10,8$ n = 5) e NI ($115,5 \pm 15,1$ n = 5) (figura 20b). A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) no coração após a infecção foi significativamente aumentada no 6° dia ($3,52 \pm 0,4$, n = 5) quando comparado com animais 3 dias após a infecção ($2,19 \pm 0,30$, n = 5) e NI ($1,61 \pm 0,22$, n = 5) como mostrado na figura 20c. A atividade da enzima antioxidante catalase foi significativamente aumentada no 6° dia após a infecção ($732,8 \pm 83,2$, n = 4) quando comparado com animais no 3° dia após a infecção ($542,2 \pm 40,3$, n = 5) e NI ($427,8 \pm 29,5$, n = 5) como mostrado na figura 20d.

Para avaliar a produção de ROS no coração dos animais infectados, secções de corações foram expostas à dihidroetidina e a produção de ROS (especialmente ânions superóxido) no interior dos cardiomiócitos foi avaliada *in situ*. Nas fotos representativas dos grupos experimentais, nota-se que no 3° (Figura 21B) e 6° (Figura 21C) dia após a infecção houve um aumento visível de fluorescência em comparação com o controle NI (figura 21A). A análise quantitativa das imagens foi realizada através do software IMAGE J. Mostra-se na figura 21D a representação gráfica das médias de fluorescência da sonda DHE obtidas em secções de 6 corações distintos por grupo. Nota-se que a fluorescência no coração dos animais infectados foi significativamente maior no terceiro ($49,6 \pm 3,1$, n = 6) e sexto ($81,6 \pm 4,6$, n = 6) dia após infecção, do que nos animais NI ($18,2 \pm 1,6$, n = 6).

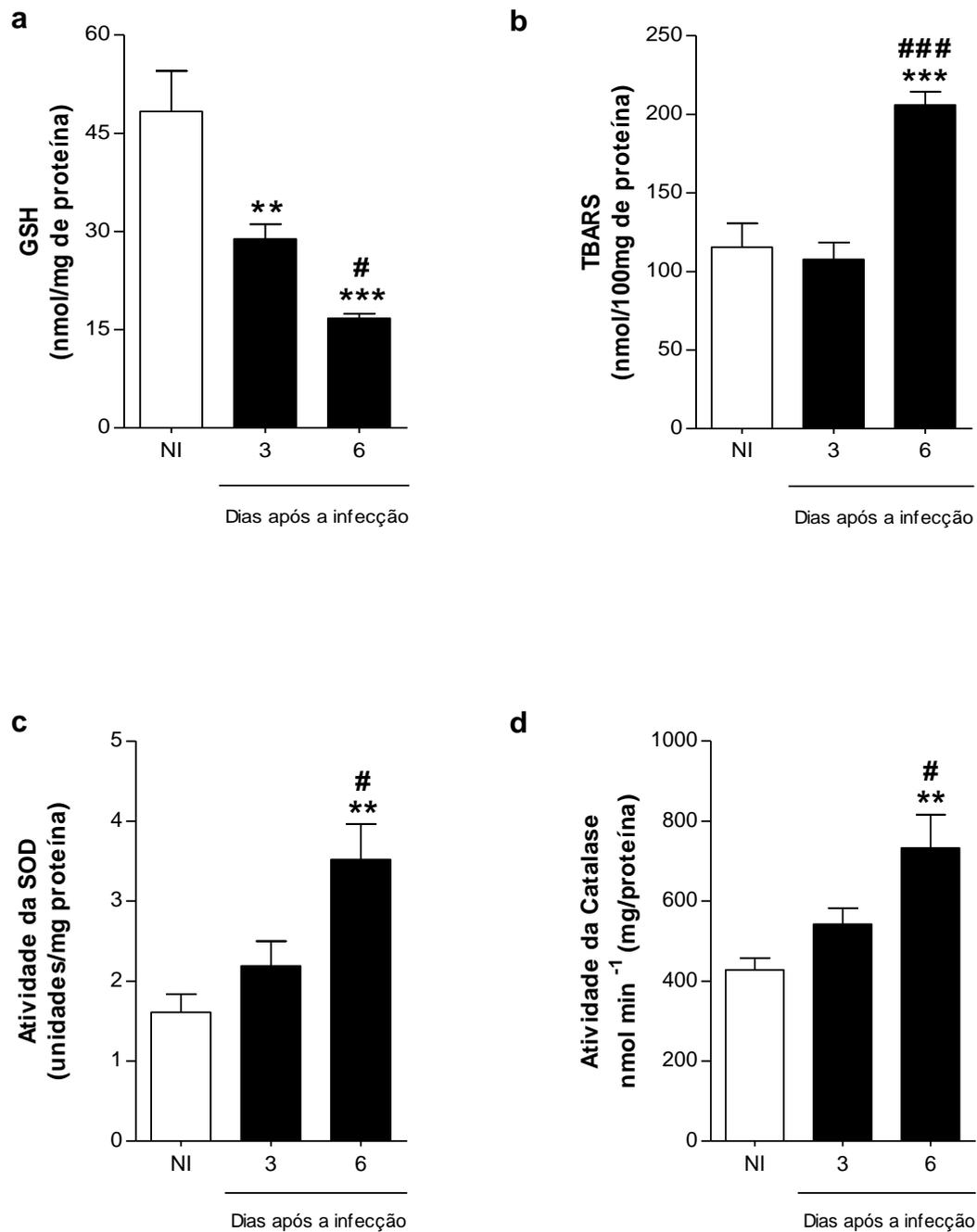


Figura 20. Avaliação do estresse oxidativo no coração dos camundongos após infecção com DENV-3. Os gráficos representam: níveis de GSH (a) e TBARS (b), atividade da SOD (c) e catalase (d). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. # $P < 0,05$, ### $P < 0,01$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

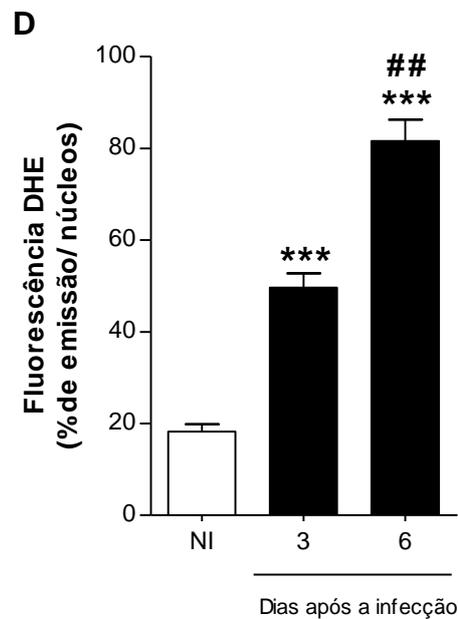
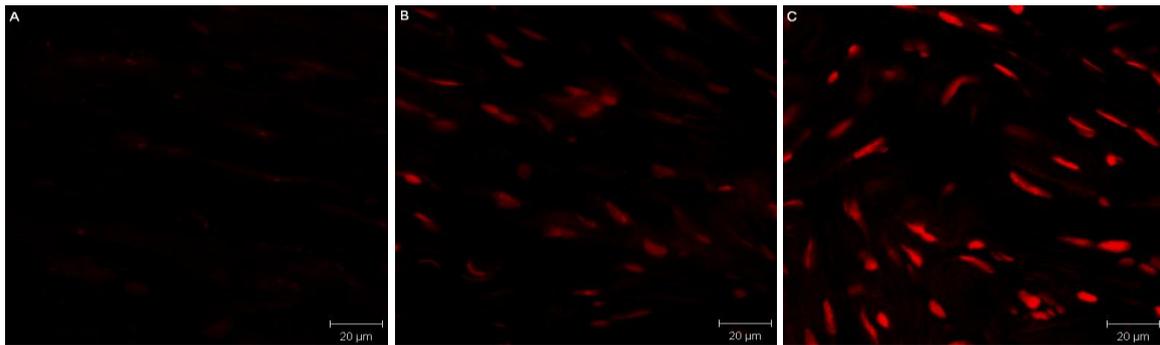


Figura 21. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) no coração de animais NI e infectados com DENV-3. Imagem representativa do grupo NI (A), 3 dias após a infecção (B) e 6 dias após a infecção (C). Quantificação da fluorescência média dos grupos (D). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = > 6$ animais). *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. ## $P < 0,01$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

4.1.9 Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos após a infecção pelo DENV-3

Realizou-se o ecocardiograma, uma técnica não invasiva muito eficiente para avaliar a função cardíaca. Observa-se uma redução marcante do débito cardíaco (figura 22a) nos animais 6 dias após a infecção ($6,1 \pm 1,5$, $n = 6$) quando comparado a animais 3 dias após a infecção ($11,6 \pm 1,0$, $n = 6$) e a animais NI ($12,6 \pm 0,6$, $n = 6$). O diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (figura 22b) e o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (figura 23c) foram reduzidos nos animais 6 dias após a infecção ($1,4 \pm 0,2$, $n = 6$ e $2,4 \pm 0,2$, $n = 6$, respectivamente) quando comparado aos animais 3 dias após a infecção ($2,7 \pm 0,2$, $n = 6$ e $3,7 \pm 0,1$, $n = 6$, respectivamente) e a animais NI ($2,2 \pm 0,9$, $n = 6$ e $3,5 \pm 0,7$, $n = 6$, respectivamente). Em contrapartida, no sexto dia após a infecção ocorre aumento da fração de encurtamento (figura 23d) e aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (figura 23a) ($42,5 \pm 3,6$, $n = 7$ e $73,5 \pm 4,2$, $n = 7$, respectivamente) quando comparado a animais 3 dias após a infecção ($28,2 \pm 3,7$, $n = 6$ e $53,9 \pm 5,3$, $n = 6$, respectivamente) e a animais NI ($35,4 \pm 1,8$, $n = 6$ e $65,4 \pm 2,4$, $n = 6$, respectivamente). Nota-se redução significativa do volume sistólico (figura 23b) no sexto dia após a infecção ($15,1 \pm 3,5$, $n = 6$) quando comparado a animais 3 dias após a infecção ($31,5 \pm 1,9$, $n = 6$) e a animais NI ($34,1 \pm 1,4$, $n = 6$). Esta redução de volume sistólico é precedida de aumento do volume sistólico final no terceiro dia após a infecção ($28,9 \pm 4,4$, $n=6$) quando comparado a animais NI ($18,6 \pm 1,8$, $n = 6$) (figura 23c). O volume diastólico final nos animais 6 dias após a infecção ($30,1 \pm 8,2$, $n = 6$) foi significativamente menor quando comparado a animais 3 dias após a infecção ($60,5 \pm 4,2$, $n = 6$) e a animais NI ($52,7 \pm 2,5$, $n = 6$) (figura 23d). Houve redução do tempo de relaxamento isovolumétrico no sexto dia após a infecção ($7,3 \pm 0,38$, $n = 6$), entretanto não foram observadas diferenças entre os animais no terceiro dia após a infecção e NI ($9,6 \pm 0,51$, $n = 6$ e $9,3 \pm 0,31$, $n = 6$, respectivamente) (figura 22e). A relação existente entre o enchimento rápido (onda E) e a contração atrial (onda A) mostrou-se reduzida

no sexto dia após a infecção ($1,58 \pm 0,09$ n = 6) quando comparado a animais no terceiro dia após a infecção ($2,3 \pm 0,15$, n = 6) e NI ($2,5 \pm 0,3$, n = 6). Observa-se na figura 24 registros representativos do fluxo mitral e relação E/A de animais não infectados (a), 3 (b) e 6 (c) dias após a infecção.

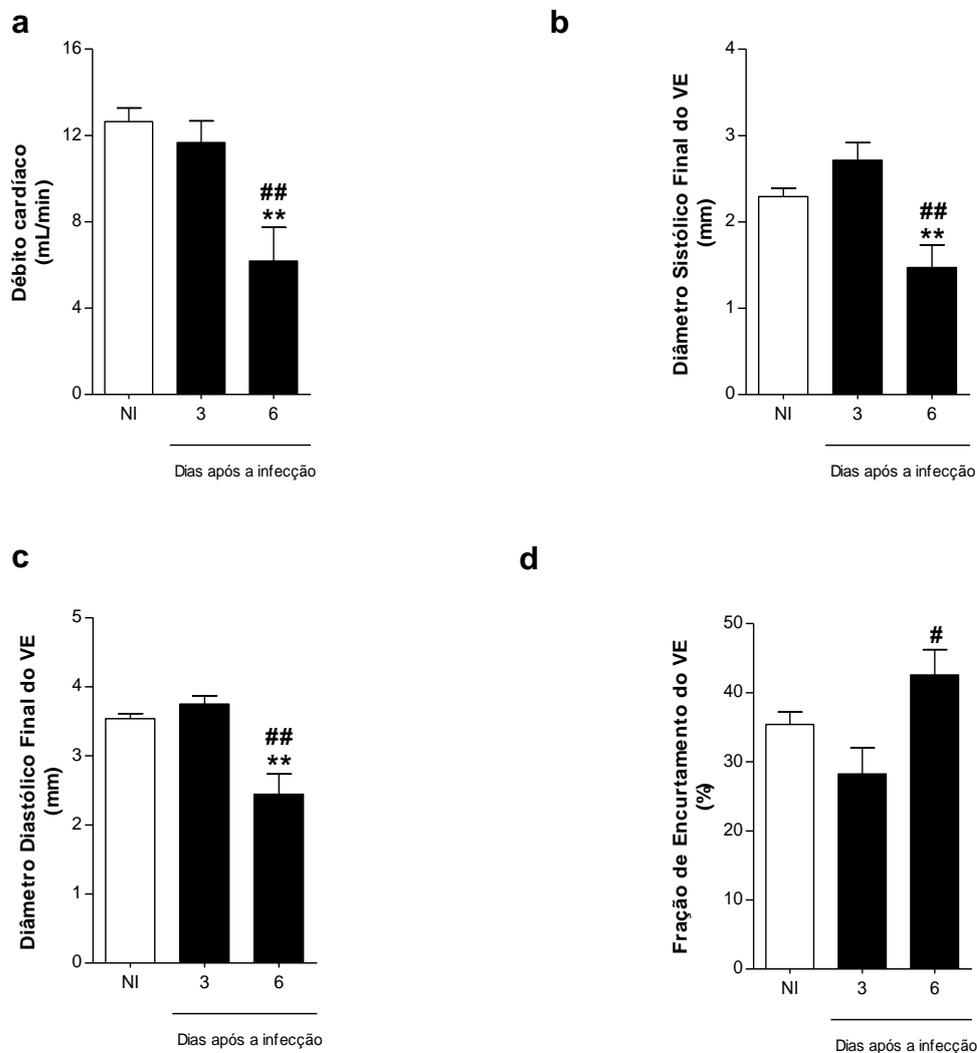


Figura 22. Avaliação da função cardíaca por ecocardiograma. Análise funcional do coração em animais NI e após a infecção pelo vírus da Dengue adaptado. Débito cardíaco (a), diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (b), diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (c), fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (d). Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n = > 6 animais). * P < 0,05, *** P < 0,001 quando comparado a animais não infectados. # P < 0,05, ## P < 0,01, ### P < 0,001 quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

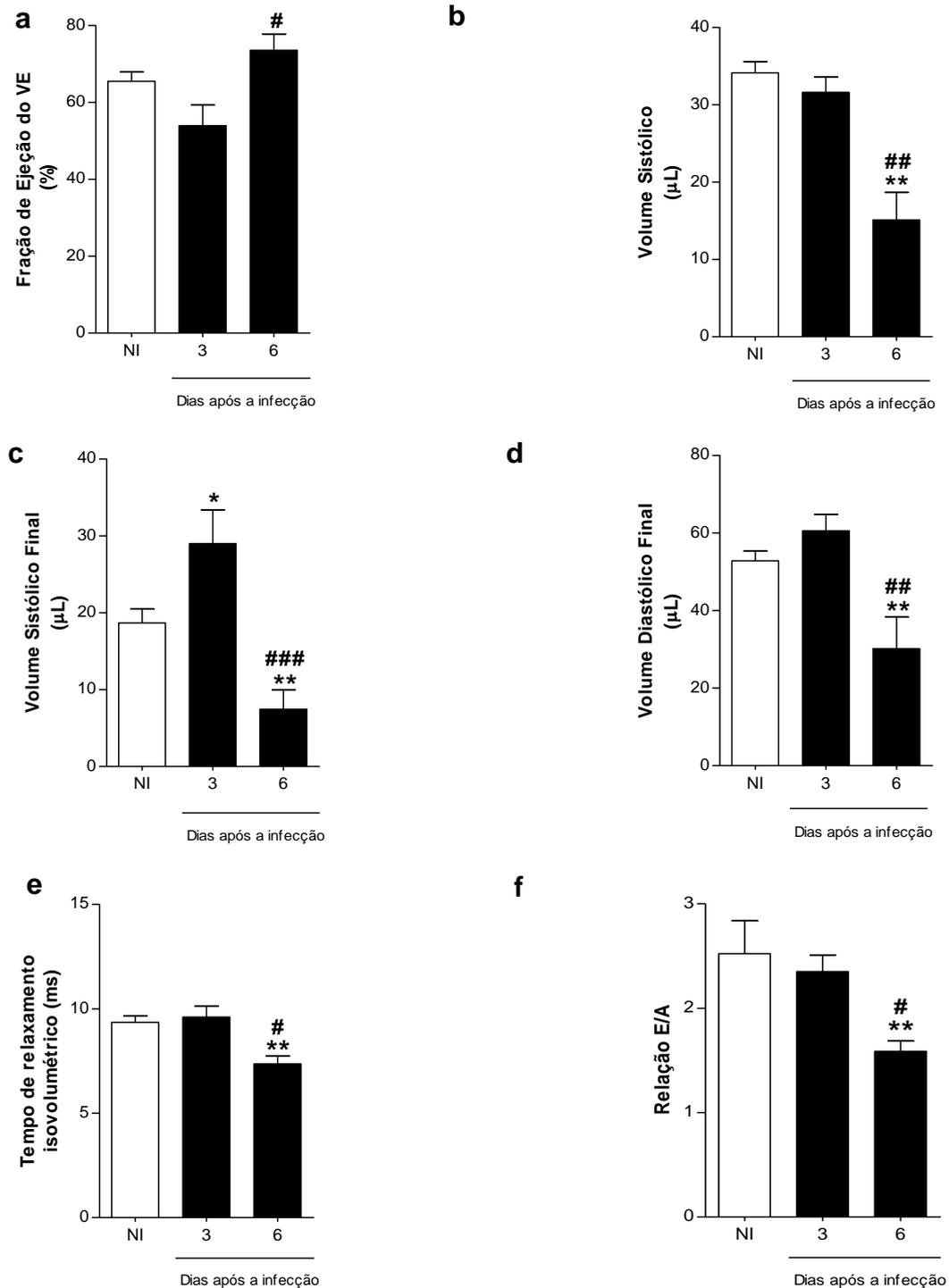


Figura 23. Avaliação da função cardíaca por ecocardiograma. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (a), volume sistólico (b), volume sistólico final (c), volume diastólico final (d) tempo de relaxamento isovolumétrico (e) e relação E/A do ventrículo esquerdo (f). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ quando comparado a animais não infectados. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ quando comparado a animais 3 dias após a infecção.

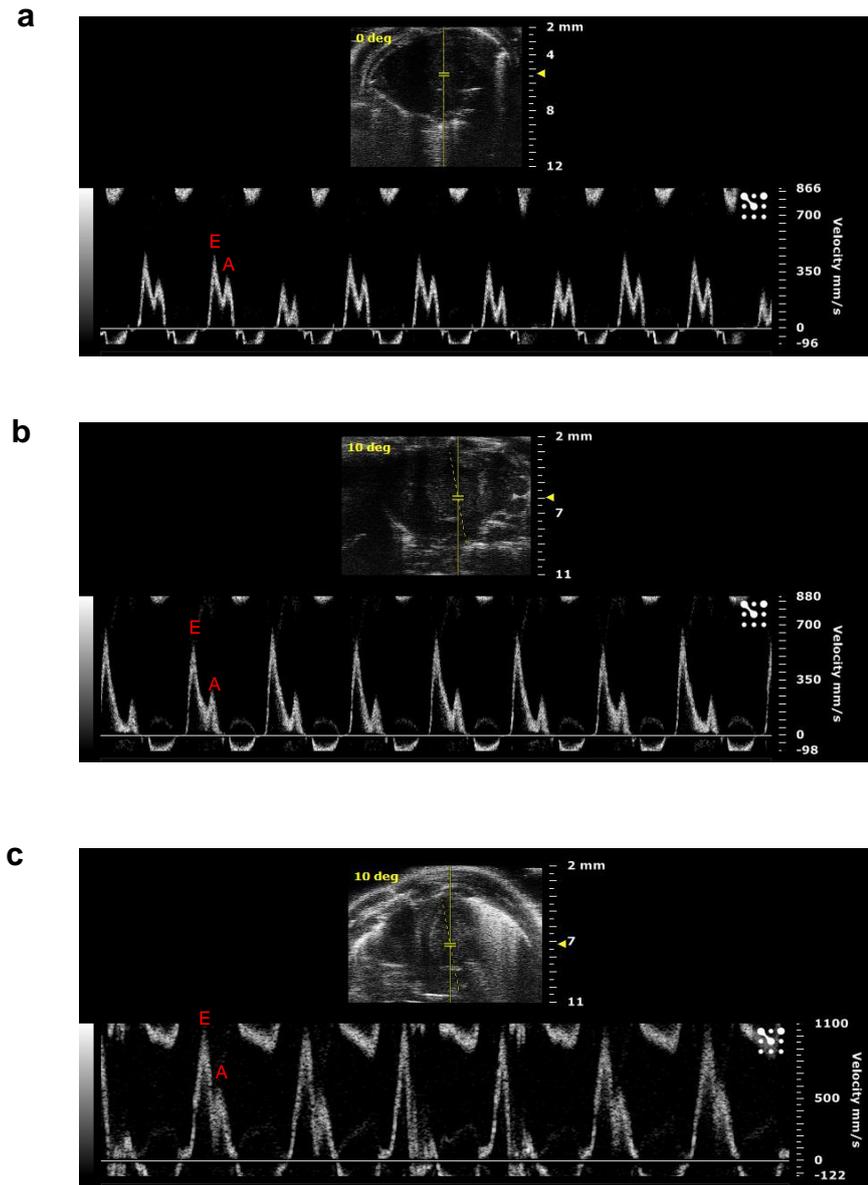


Figura 24. Fluxo mitral. Relação E/A. Registro representativo do fluxo mitral. Corte apical de quatro câmaras, amostra de volume colocada na extremidade dos folhetos da valva mitral. E= onda de enchimento ventricular rápido; A= onda de enchimento tardio (contração atrial). Animal não infectado (a), 3 (b) e 6 (c) dias após a infecção.

4.2 Avaliação de parâmetros eletrofisiológicos em cardiomiócitos após a infecção pelo DENV-3

Iniciou-se o estudo com análise do potencial de ação de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo isolados de animais não infectados e infectados com o sorotipo-3 do vírus da Dengue, 3 e 6 dias após a infecção, uma vez que este representa o somatório dos componentes iônicos responsáveis pelo controle da excitabilidade do cardiomiócito.

Nota-se que os cardiomiócitos dos animais infectados apresentam redução no tempo de repolarização do PA (figura 25b). Em a está representado os traçados representativos para células controle, 3 e 6 dias após a infecção, e em c o potencial de repouso para diferentes porcentagens da repolarização do PA. No terceiro dia após a infecção ocorre uma redução na duração do tempo de repolarização do PA, entretanto, não foram observadas diferenças do PA no sexto dia após a infecção quando comparado com animais NI (figura 25b). Não foram encontradas diferenças entre a dV/dt Max (figura 25d)

A corrente de cálcio ($I_{Ca,L}$), referente aos canais do tipo L, apresenta um importante papel na repolarização juntamente com as correntes de sódio, gerando o PA em cardiomiócitos. Além disso, a corrente de cálcio ($I_{Ca,L}$) tem um importante papel na regulação da capacidade contrátil das células musculares cardíacas. Desta forma, fez-se a avaliação da funcionalidade dos canais para Ca^{2+} em cardiomiócitos de animais NI e infectados com DENV-3. Os resultados mostram uma redução significativa na densidade de corrente de cálcio para as células provenientes de animais 6 dias após a infecção. Na figura 26a, b e c, observa-se traçados representativos referente às correntes para cálcio observadas em cardiomiócitos de animais NI e 3 e 6 dias após infecção, com DENV-3, respectivamente. Já na figura 26d está representada a relação da densidade de corrente de cálcio em função da voltagem. A 0 mV a densidade de corrente (pA/pF) foi de $-7,3 \pm 0,5$, $-6,9 \pm 0,9$ e $-3,6 \pm 0,3$ para as células controle, aos 3 e 6 dias após a infecção, respectivamente. A curva de condutância, o tempo para o pico da $I_{Ca,L}$ e a constante de tempo para inativação não apresentaram alterações conforme observado na figura 26e.

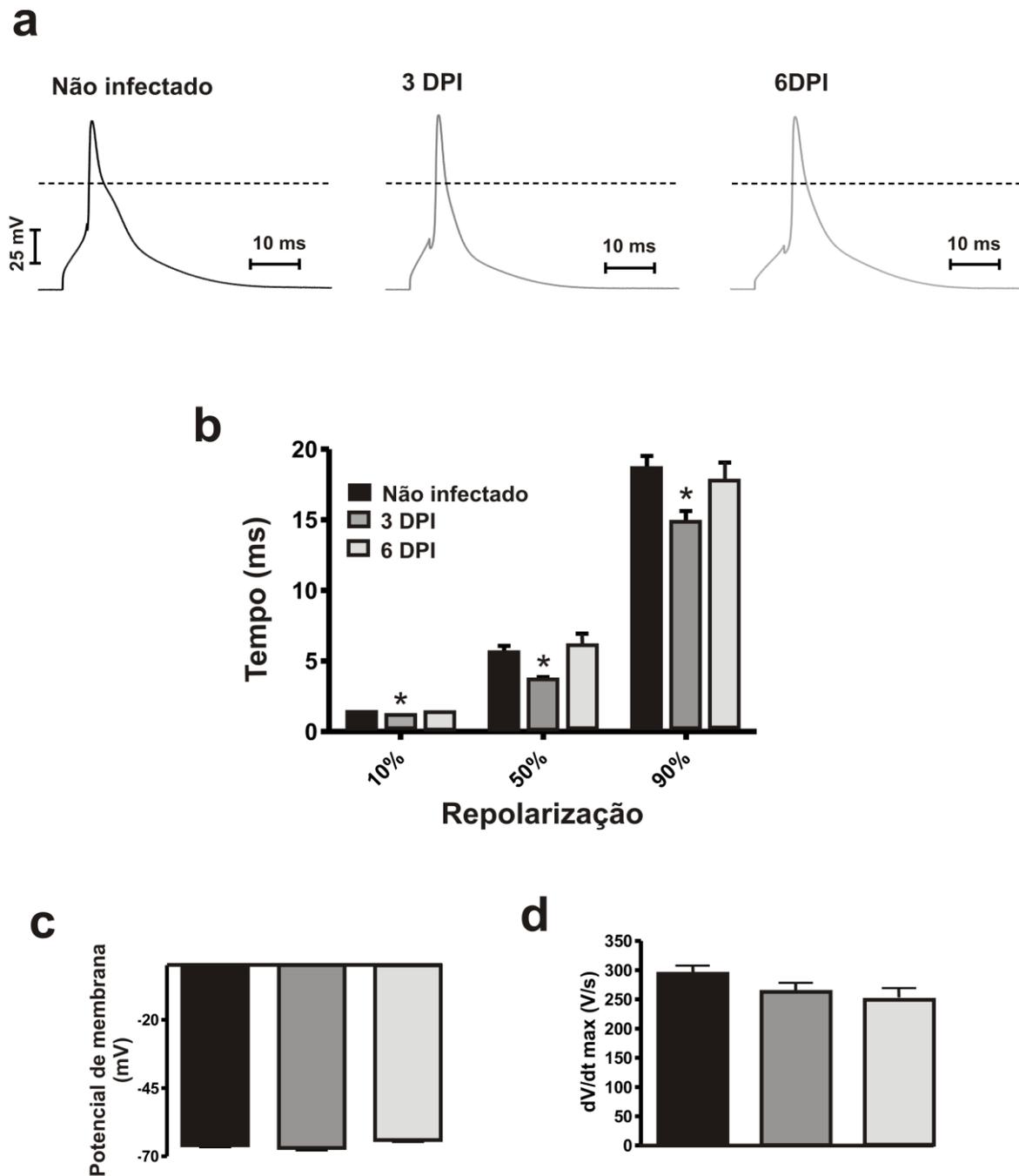


Figura 25. Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo provenientes de animais NI e infectados com DENV-3. A figura representa os traçados representativos referentes ao potencial de ação para os cardiomiócitos dos animais NI, 3 e 6 dias após a infecção (a), tempo para repolarização do PA a 10, 50 e 90% (b), potencial de repouso (c) e dV/dt max (d). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = > 6$ animais). * $P < 0,05$ quando comparado a animais não infectados.

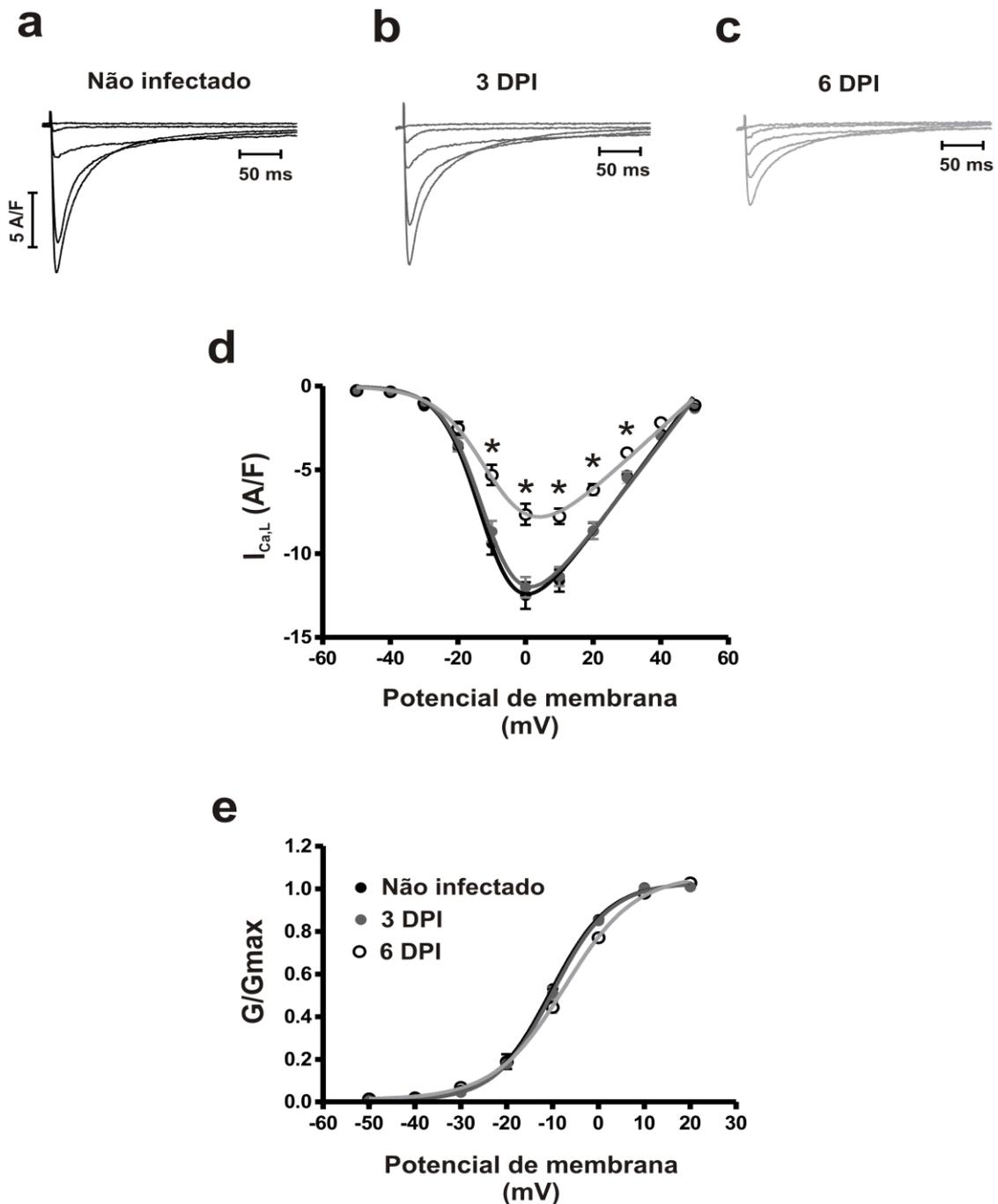


Figura 26. Corrente de Cálcio ($I_{Ca,L}$) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animais NI e infectados com DENV-3. A figura representa os traçados representativos referentes às correntes de cálcio tipo L para os cardiomiócitos dos animais NI, 3 e 6 dias após a infecção (a, b, c). Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem (d). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n > 6$ animais). * $P < 0,05$ quando comparado a animais não infectados.

4.3 Sumário dos resultados

O conjunto de resultados obtidos nesta dissertação sugere que:

O sorotipo-3 do vírus da Dengue adaptado ao hospedeiro murino, utilizado neste estudo, foi eficaz em induzir a infecção e mimetizar as alterações observadas na forma grave da doença em humanos. Os sinais clínicos clássicos da doença observados foram: alterações hematológicas, carga viral detectável em órgãos alvo e no sangue, dano hepático e hemorragia tecidual nos pulmões e intestino;

Os camundongos BALB/c infectados com o vírus (DENV-3) perdem peso e sucumbem à infecção de maneira inóculo dependente;

Durante a infecção ocorre uma resposta inflamatória sistêmica, caracterizada por aumento de permeabilidade vascular, recrutamento e ativação de leucócitos, produção marcante de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias;

Após ter caracterizado o modelo, avaliou-se as alterações hemodinâmicas e observou-se importante redução da pressão arterial, aumento de frequência cardíaca e intenso aumento de permeabilidade vascular. Em conjunto os resultados sugerem que os camundongos após a infecção apresentam choque hipovolêmico;

O coração foi caracterizado como alvo do processo inflamatório desencadeado pelo vírus da Dengue. Foi detectada carga viral no coração dos animais infectados, recrutamento e ativação de neutrófilos e macrófagos, intensa produção de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-17) e quimiocinas (CXCL1/KC, CCL2/MCP-1) levando a pericardite, miocardite e estresse oxidativo;

Os camundongos infectados apresentam disfunção cardíaca, caracterizada por hiperdinamismo, redução do débito cardíaco, redução

marcante do volume sistólico e diastólico, além de importantes alterações funcionais nas câmaras cardíacas e instabilidade hemodinâmica;

As propriedades elétricas dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram alteradas nos animais com 3 e 6 dias após a infecção. As alterações foram dependentes do tempo de infecção. Ocorreu redução do tempo da repolarização do potencial de ação no terceiro dia após a infecção e no sexto dia uma redução da corrente de cálcio do tipo L.

V. DISCUSSÃO

A Dengue é a principal arbovirose que acomete o homem na atualidade, e a virose urbana mais difundida no mundo. Estima-se que aproximadamente três bilhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença em regiões tropicais e sub-tropicais, representando um grave problema de saúde pública. Não obstante, não existem tratamentos específicos, tão pouco vacinas disponíveis para a prevenção desta doença, e todos esses fatores se associam a uma escassa compreensão de sua patogênese (Halstead, 1990; Guzman e Kouri, 2002; Whitehead *et al.*, 2007; Guzman *et al.*, 2010).

O insipiente conhecimento a cerca dos mecanismos envolvidos na patogênese está estreitamente relacionado à falta de modelos animais que mimetizem a infecção observada em humanos (Bente e Rico-Hesse, 2006; Shresta *et al.*, 2006; Yauch e Shresta, 2008).

Mais recentemente começaram a surgir modelos de infecção com vírus da Dengue utilizando animais imunocompetentes, predominantemente da linhagem C57BL/6J. Alguns destes modelos murinos mimetizam os achados clínicos observados na infecção em humanos, como perda de peso, alterações hematológicas, trombocitopenia, resposta inflamatória sistêmica, lesão hepática, hemorragia e extravasamento de líquidos (Chen, 2004; Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Paes *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009; Franca *et al.*, 2010).

O grupo de pesquisa em Imunofarmacologia liderado pelo Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, nos últimos anos tem trabalhado no desenvolvimento de modelos murinos de Dengue. Realizaram, inicialmente, a padronização de um modelo murino com o sorotipo-2 do vírus (DENV-2). O modelo em questão consiste de uma ferramenta interessante para o estudo da fisiopatologia da infecção pelo vírus da dengue, uma vez que mimetiza os sinais e sintomas clínicos observados durante a infecção em humanos. Além disso, este modelo tem possibilitado o estudo da participação de diferentes moléculas relacionadas ao processo inflamatório durante a Dengue, tais como: o Fator de Agregação Plaquetária (PAF), Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF), IFN- γ e Óxido Nítrico (NO) (Souza *et al.*, 2009; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010; Guabiraba *et al.*, 2010; Fagundes, Costa *et al.*, 2011; Renneson *et al.*, 2011).

Mais recentemente, o grupo caracterizou também um modelo murino do sorotipo-3 do vírus (DENV-3) em camundongos C57BL/6J. O modelo é muito semelhante ao observado com o sorotipo-2. Sendo assim, outra ferramenta interessante para o estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da infecção pelo dengue vírus (DENV), por apresentar similaridade nas características clínicas e laboratoriais observadas durante a infecção em humanos (Costa, 2009).

No presente trabalho avaliou-se se o coração seria alvo da infecção pelo vírus DENV-3 em camundongos BALB/c adultos e imunocompetentes. O modelo de infecção utilizado no presente estudo visou retratar as manifestações clínicas e laboratoriais observadas em casos graves de Dengue. Com esse objetivo, foram avaliados, inicialmente, diferentes inóculos para análise das manifestações patológicas da Dengue e a determinação do inóculo que seria capaz de causar 50% de letalidade nos camundongos. Os resultados mostraram que o desenvolvimento dos sinais associados à doença é progressivo e inóculo-dependente e que o inóculo responsável por 50% de letalidade é o de 1 PFU.

Na maior parte das vezes, isolados de Dengue não replicam bem em camundongos imunocompetentes. No entanto, trabalhos recentes utilizando animais imunocompetentes demonstraram susceptibilidade à infecção pelo vírus (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2009; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010; Guabiraba *et al.*, 2010; Fagundes, Costa *et al.*, 2011).

Fagundes e cols. (2011) observaram correlação entre a carga viral inoculada e a severidade da doença, avaliada por parâmetros como perda de peso, trombocitopenia e título viral, em um modelo de infecção grave em camundongos C57BL/6J (Fagundes, Costa *et al.*, 2011).

No presente trabalho, utilizou-se um isolado de DENV-3, adaptado em cérebro de camundongo, que mostrou-se eficiente na indução da doença. A carga viral no fígado e baço dos animais infectados aumentou de acordo com a cinética de infecção e a viremia foi detectada apenas no sexto dia após infecção. Esses resultados corroboram relatos encontrados por pesquisadores em trabalhos anteriores (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta *et al.*, 2006; Guabiraba *et al.*, 2010).

A perda abrupta de peso é um dos fatores associados à gravidade da doença. Os camundongos infectados com DENV-3 apresentaram perda de peso significativa após o 3º dia de infecção, perda essa que se tornou mais evidente ainda no sexto dia após a infecção, onde os animais haviam perdido aproximadamente 20% do peso corporal. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Costa (2009), em infecção por DENV-3 em camundongos C57BL/6J, e por Guabiraba e cols. (2010) e Fagundes e cols. (2011), em infecção por DENV-2 em camundongos C57BL/6J (Costa, 2009; Guabiraba *et al.*, 2010; Fagundes, Costa *et al.*, 2011).

No modelo em estudo, foram encontradas intensas alterações hematológicas como plaquetopenia, hemoconcentração e hipoalbuminemia. Têm-se muito bem estabelecido que a infecção pelo vírus da Dengue causa importantes alterações hematológicas. Dentre essas alterações, as mais frequentes são: trombocitopenia, disfunção plaquetária, hemoconcentração, alterações nas vias extrínseca e intrínseca da coagulação, coagulopatia e síndrome da coagulação intravascular disseminada (Huang *et al.*, 2001; Chen, 2004; Schexneider e Reedy, 2005; Sosothikul *et al.*, 2007). Além disso, alguns trabalhos correlacionam a intensidade dessas alterações hemostáticas com a gravidade da doença (Wills *et al.*, 2002; Mourao *et al.*, 2007; Wills *et al.*, 2009). Baseado no fato de que os animais utilizados no presente estudo mimetizaram as alterações hematológicas observadas na infecção por Dengue vírus e por estas alterações serem bastante exacerbadas, pode-se sugerir que estes animais desenvolveram a forma grave da doença.

Outro fator que parece contribuir para a gravidade da doença é a lesão hepática. Já foi demonstrado que pacientes com FHD/SCD apresentam inflamação e elevados níveis de transaminases hepáticas no soro (Mohan *et al.*, 2000; De Souza *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2007). Além disso, é proposta uma correlação entre a gravidade da doença e níveis de ALT e AST, tanto na infecção em humanos quanto em modelos murinos (Paes *et al.*, 2005; Paes *et al.*, 2009; Guabiraba *et al.*, 2010; Mahmuduzzaman *et al.*, 2011). Os resultados referentes à quantificação das enzimas ALT e AST apresentados neste trabalho são sugestivos de dano hepático, pois ambas estavam elevadas no sexto dia após a infecção. Estes resultados também

confirmam o desenvolvimento da doença e estão de acordo com os relatos da literatura anteriormente apresentados.

Foi verificado um aumento dos níveis da enzima NAG no pulmão e fígado de animais infectados com DENV-3 subsequentemente ao aumento nos níveis de MPO. Esses resultados sugerem que os macrófagos são recrutados posteriormente aos neutrófilos e provavelmente exercem uma amplificação da resposta inflamatória neste modelo de infecção. Resultados semelhantes foram encontrados por Guabiraba e cols. (2010) em camundongos C57Bl/6J após a infecção por DENV-2 (Guabiraba *et al.*, 2010).

Trabalhos recentes sugerem que a infecção pelo vírus da Dengue ocasiona uma resposta inflamatória sistêmica, caracterizada pelo aumento de permeabilidade vascular, recrutamento de células para órgãos alvo, produção de mediadores pró-inflamatórios, aumento na síntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e indução de apoptose celular (Chen *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2009; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010; Guabiraba *et al.*, 2010; Cheung *et al.*, 2011; Fagundes, Costa *et al.*, 2011; Rothman, 2011).

Inúmeras citocinas e quimiocinas participam da patogênese do Dengue, entre elas o TNF- α , que foi uma das primeiras citocinas descrita como importante na patogênese da forma grave da doença (Chaturvedi, 2006). Já foi demonstrado que o soro de pacientes com Dengue apresenta níveis elevados dessa citocina, desempenhando um importante papel na lesão da microvasculatura e indução de apoptose de células do endotélio vascular (Cardier *et al.*, 2005). Além disso, o TNF- α pode alterar a produção de outros mediadores celulares, induzir a expressão de moléculas de adesão contribuindo para o recrutamento celular e ter participação na hemorragia tecidual observada. O TNF- α pode ainda estar relacionado aos altos níveis de viremia, aumento de permeabilidade vascular e choque, tendo, portanto, uma direta relação com a gravidade da doença tanto em humanos quanto em modelos animais (Hober *et al.*, 1993; Bethell *et al.*, 1998; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Dewi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010; Cheung *et al.*, 2011).

Atrasheuskaya e cols. (2003) desenvolveram um modelo murino de infecção pelo DENV-2 e demonstraram que o tratamento com anticorpos anti-

TNF resulta em manifestações mais brandas da doença e reduz significativamente a letalidade nos camundongos, reafirmando a participação desta citocina pró-inflamatória no desenvolvimento e progressão da doença (Atrasheuskaya *et al.*, 2003). No presente trabalho foram encontrados elevados níveis de TNF- α nos camundongos após a infecção, corroborando os resultados descritos acima.

O IFN- γ é uma importante citocina imunomodulatória que desempenha um importante papel na ativação das funções microbidas efetoras de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Boehm *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 2004). De fato, a participação da citocina na resposta à infecção é evidente. Níveis elevados de IFN- γ são encontrados em pacientes com Febre do Dengue ou febre hemorrágica do Dengue/síndrome do choque do Dengue (FHD/SCD) (Nguyen *et al.*, 2004; Chakravarti e Kumaria, 2006; Bozza *et al.*, 2008; Restrepo *et al.*, 2008).

Shresta e cols. (2004) demonstraram que camundongos deficientes para IFN- γ apresentam extrema susceptibilidade à infecção (Shresta, Kyle, Snider *et al.*, 2004). Recentemente, Fagundes e cols. (2011) verificaram a importância dessa citocina em um modelo murino de infecção pelo DENV-2. Esses autores verificaram que a expressão de IFN- γ aumentou gradualmente após a infecção, e sua produção foi precedida do aumento dos níveis de IL-12 e IL-18. Animais deficientes em IFN- γ apresentaram uma doença mais severa e letalidade aumentada. Os autores sugerem fortemente que IFN- γ induz a produção de IL-12 e IL-18, além de induzir a ativação da isoforma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS), sendo esse mecanismo importante para a resistência do hospedeiro durante a infecção pelo Dengue vírus (Fagundes, Costa *et al.*, 2011). Corroborando com os resultados descritos acima, foram encontrados elevados níveis de IFN- γ nos camundongos após a infecção.

Já foi descrito que após a infecção pelo vírus da Dengue, em humanos ou em modelos experimentais, ocorre um aumento dos níveis de IL-1 β , especialmente na forma grave da doença (Bozza *et al.*, 2008; Jaiyen *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2011). Outra citocina pró-inflamatória que parece participar da patogênese da Dengue é a IL-6. Sabe-se que proteínas NS1 virais são capazes de estimular a produção de IL-6 por células dendríticas (Chua *et al.*,

2005). A IL-6 desempenha um papel importante na produção local e sistêmica de anticorpos com reatividade cruzada com plaquetas e células endoteliais (Rachman e Rinaldi, 2006) e, além disso, além disso, induz aumento de permeabilidade de células endoteliais, contribuindo para a hemoconcentração e hipovolemia (Dewi *et al.*, 2004). Foram encontrados elevados níveis dessa citocina durante a infecção em humanos (Chen *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2008; Restrepo *et al.*, 2008; Priyadarshini *et al.*, 2010) e em modelos murinos da infecção (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010; Guabiraba *et al.*, 2010). Foram encontrados níveis significativamente elevados de IL-1 β e IL-6 nos camundongos após a infecção, corroborando os resultados descritos acima.

Os resultados referentes ao presente trabalhos mostram que a quimiocina CCL2/MCP-1 está aumentada no soro dos camundongos após a infecção com DENV-3. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, uma vez que já foi demonstrado que essa citocina é encontrada em elevadas concentrações no soro de pacientes com dengue e febre hemorrágica do dengue, bem como em modelos *in vitro* de infecção por DENV, podendo causar alterações nas junções intercelulares e, conseqüente, aumento de permeabilidade vascular (Lee *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2008; Guabiraba *et al.*, 2010; Sierra *et al.*, 2010).

Uma das características da forma grave da infecção pelo vírus da dengue é a fragilidade vascular e hemorragia tecidual (Chen *et al.*, 2008; Chhina *et al.*, 2009; Srikiatkachorn, 2009; Srikiatkachorn e Green, 2010). Os camundongos BALB/c infectados com DENV-3, apresentaram intensos focos de hemorragia tecidual nos pulmões e intestino, corroborando os resultados descritos acima.

Pouco se sabe sobre as alterações hemodinâmicas após a infecção por Dengue vírus. Parâmetros que avaliam essas variáveis nunca foram mensurados em modelos murinos. Na literatura existe apenas um trabalho que sugere as principais alterações hemodinâmicas ocasionadas pela infecção por Dengue vírus (Pongpanich e Kumponpant, 1973), porém, é de extrema importância a compreensão desses eventos.

No presente trabalho foram encontrados alguns achados inéditos com relação as alterações hemodinâmicas. Pela primeira vez foi constatado que camundongos após a infecção experimental com DENV-3 apresentam redução intensa da pressão arterial sistólica e aumento marcante da frequência cardíaca. Além disso, foi verificado também a ocorrência de aumento da permeabilidade vascular nos animais infectados com DENV-3.

Modificações na permeabilidade vascular são bastante comuns na infecção pelo vírus da Dengue, sendo mais frequentes na febre hemorrágica do Dengue/síndrome do choque do Dengue (FHD/SCD). O vírus da Dengue é capaz de infectar células endoteliais levando a produção de citocinas e quimiocinas como TNF- α , IL-6 e MCP-1 (Avirutnan *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000), também aumentadas no modelo usado neste trabalho. Estas citocinas e quimiocina são potenciais mediadores envolvidos no aumento da permeabilidade vascular (Huang *et al.*, 2000; Dewi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008).

O aumento da permeabilidade vascular pode levar a hemoconcentração, uma vez que esta é um indicativo de perda de volume intravascular, podendo ocasionar choque hipovolêmico (Chen *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2011). Os animais infectados com DENV-3 utilizados neste estudo apresentaram intensa hemoconcentração. Desta forma, esse conjunto de resultados descreve, pela primeira vez, que camundongos adultos e imunocompetentes infectados experimentalmente com DENV-3 apresentam choque hipovolêmico associado a hemoconcentração, hemorragia tecidual, intenso aumento de permeabilidade vascular, hipotensão e taquicardia.

Nos últimos anos têm sido descritas manifestações atípicas das classicamente observadas na Dengue, febre hemorrágica do Dengue e/ou síndrome do choque do Dengue durante a infecção em humanos e em modelos experimentais, incluindo hepatite, alterações no sistema nervoso central e alterações cardíacas (Wali *et al.*, 1998; Mohan *et al.*, 2000; Angibaud *et al.*, 2001; De Souza *et al.*, 2002; Gulati e Maheshwari, 2007; Paes *et al.*, 2009; Murthy, 2010; Salgado *et al.*, 2010; Varatharaj, 2010).

Apesar de ter sido descrito que existem alterações cardíacas após a infecção em humanos, o conhecimento acerca da intensidade dessas

alterações, da repercussão sistêmica, dos mecanismos e moléculas envolvidos ainda é bastante escasso. Nesse sentido, nunca foram avaliados os mecanismos envolvidos nas alterações cardíacas em modelos animais que mimetizam a doença em humanos. Desta forma, este trabalho teve como um de seus objetivos investigar se camundongos BALB/c, adultos e imunocompetentes, infectados com o DENV-3 apresentam alterações cardíacas, bem como descrever a intensidade dessas alterações, a repercussão sistêmica e os mecanismos envolvidos.

Estudos recentes têm sugerido que o coração parece ser alvo da infecção por DENV (Salgado *et al.*, 2010; Weerakoon *et al.*, 2011). O modelo animal descrito neste trabalho confirma esses resultados, demonstrando que o coração é um dos alvos do vírus, uma vez que foi detectado um aumento da carga viral no terceiro e sexto dia após a infecção.

Após a detecção do vírus no coração foi analisado se existiria um aumento do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para este órgão, uma vez que a ativação e migração de leucócitos para áreas de inflamação são fatores importantes relacionados à hipótese de que respostas imunológicas e inflamatórias podem desempenhar papel crítico no desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Conforme esperado, foi observado um aumento significativo do recrutamento de neutrófilos no terceiro dia e amplificação dessa resposta no sexto dia após a infecção. Entretanto, o aumento do recrutamento de macrófagos só foi observado no sexto dia após a infecção. Em concordância com esses resultados, foi observado também um aumento na concentração das quimiocinas CXL1/KC, importante para o recrutamento de neutrófilos e CCL2/MCP-1, potente quimioatrativo de monócitos e linfócitos, no coração de animais infectados. Aukrust e cols. (1998) demonstraram que pacientes com insuficiência cardíaca apresentavam elevados níveis plasmáticos de MCP-1 (Aukrust *et al.*, 1998). Baseado nestes achados, a seguinte hipótese pode ser estabelecida: durante a infecção pelo vírus da Dengue existe intensa inflamação no coração, podendo desencadear um quadro de insuficiência cardíaca.

Ainda investigando o processo inflamatório cardíaco, análises histopatológicas corroboraram com as observações iniciais da ocorrência de

inflamação cardíaca, uma vez que após 3 dias de infecção há pericardite, caracterizada pela infiltração de células inflamatórias predominante localizada na região ventricular. Após 6 dias de infecção todos os animais apresentaram pericardite crônica mais extensa e intensa, e notou-se ainda miocardite moderada. Estes achados são similares aos relatados por outros autores após infecção pelo vírus da Dengue em humanos (Nagaratnam *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 2010; Sangle *et al.*, 2010; Weerakoon *et al.*, 2011).

Após ter sido demonstrado aumento da carga viral no coração, a próxima pergunta foi se o vírus tem a capacidade de infectar cardiomiócitos. Para responder esta pergunta foi feita uma imuno-histoquímica para uma proteína não estrutural do vírus da Dengue (NS3) com o intuito de avaliar os tipos celulares infectados pelo vírus no coração. Os resultados mostraram haver predominantemente marcação para NS3 em células inflamatórias mononucleares e não em cardiomiócitos. Baseado nestes resultados, pode-se sugerir que o vírus DENV-3 não tem a capacidade de infectar cardiomiócitos até o sexto dia após a infecção.

Com o objetivo de confirmar a hipótese de que durante a infecção pelo vírus da Dengue existe intensa inflamação no coração, podendo desencadear um quadro de insuficiência cardíaca, avaliou-se o perfil de citocinas e quimiocinas produzidas no coração dos camundongos após a infecção pelo DENV-3.

Os níveis de TNF- α e IL-6 no coração dos animais infectados estavam muito aumentados quando comparados aos animais NI. Diversos estudos correlacionam essas citocinas pró-inflamatórias com disfunção cardíaca (Niebauer, 2000; Kell *et al.*, 2002; Petersen e Felker, 2006; Oikonomou *et al.*, 2011).

Levine e cols. (1990) foram os primeiros a demonstrar que existe uma correlação entre o aumento dos níveis de TNF- α e a severidade da insuficiência cardíaca (Levine *et al.*, 1990). Trabalhos mais recentes demonstram que níveis elevados de TNF- α e IL-6 estão associados com redução da função atrial esquerda e disfunção sistólica e diastólica no ventrículo esquerdo de pacientes com IC (Chrysohoou *et al.*, 2009). Vasan e cols. (2003) verificaram que existe uma correlação entre o aumento dos níveis

de IL-6 e o desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca. Hudzick e cols. (2011) sugerem que há uma forte correlação entre IL-6 e a extensão da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo em pacientes com doença arterial coronariana. Além disso, elevadas concentrações de IL-6 estão associadas a manifestações precoces da insuficiência cardíaca (Hudzick *et al.*, 2011).

Já foi descrito que a quimiocina MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1) desempenha um papel crítico no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Niu e Kolattukudy, 2009). Há fortes evidências de que a MCP-1 desempenha um papel importante em miocardite (Dewald *et al.*, 2005). A infiltração de monócitos/macrófagos é fundamental para o início e progressão da pericardite e miocardite (Kawai, 1999; Yajima e Knowlton, 2009). Além disso, a interação de MCP-1 com o seu receptor CCR2 ocasiona uma série de eventos sinalizadores que gera a migração quimiotática de monócitos e leva a mudanças na expressão gênica desse tipo celular, levando à produção de moléculas biologicamente ativas que afetam as células do coração.

Sabendo que a infiltração de monócitos e células T é conhecida por ser um gatilho essencial para a progressão de miocardite auto-imune experimental (EAM) em ratos, Kobayashi e cols. (2002) avaliaram os níveis de MCP-1 no miocárdio destes animais. Estes autores sugerem que elevados níveis de MCP-1 no coração podem associar-se a migração e proliferação de monócitos/macrófagos, desempenhando um papel importante da patogênese da miocardite auto-imune experimental (Kobayashi *et al.*, 2002). No modelo animal de Dengue utilizado no presente trabalho foi observado aumento marcante dos níveis de MCP-1 no soro e no coração. Além da quimiocina MCP-1, a CXCL1/KC também é importante para o recrutamento e ativação de leucócitos uma vez que, ao interagir com o seu receptor CXCR-2 participa principalmente do recrutamento e ativação neutrófilos (Kobayashi, 2006; 2008).

Estudos recentes vêm sugerindo que outra citocina está envolvida na miocardite e insuficiência cardíaca, é a IL-1 β (Horio, 2006). Shioi e cols. (1996) demonstraram que camundongos com miocardite viral apresentavam níveis de IL-1 β significativamente elevados (Shioi *et al.*, 1996). Além disso, IL-1 β é descrita como uma importante citocina envolvida na disfunção miocárdica observada no choque séptico (Schulz *et al.*, 1995).

Outra citocina que parece ter importante papel na miocardite e insuficiência cardíaca é IL-17. Já foi demonstrado que a neutralização de IL-17 reduziu a miocardite, o dano miocárdico e respostas do coração a auto-anticorpos na miocardite auto-imune experimental em ratos (Sonderregger *et al.*, 2006) Além disso, o aumento dos níveis de IL-17 contribui para a fibrose miocárdica na insuficiência cardíaca induzida por isoproterenol, e o tratamento dos animais com anti-IL-17 reduziu significativamente a fibrose e a severidade da insuficiência cardíaca (Feng *et al.*, 2009). Foram encontrados níveis significativamente elevados de IL-1 β e IL-17 no coração dos camundongos após a infecção com DENV-3 corroborando os resultados descritos anteriormente.

A partir dos resultados obtidos sobre recrutamento celular para órgãos alvos, permeabilidade vascular, alterações laboratoriais e perfil de mediadores pró-inflamatórios produzidos no soro e no coração dos camundongos após a infecção experimental pelo DENV-3 adaptado, pode-se afirmar que o modelo murino de Dengue mimetiza os achados observados na forma grave da doença, Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome do Choque do Dengue, em humanos. Pôde-se também confirmar parte da hipótese levantada uma vez que ficou evidenciado que durante a infecção pelo vírus da Dengue existe intensa inflamação cardíaca, além da resposta inflamatória sistêmica exacerbada que contribui ativamente para o desenvolvimento e progressão da doença.

Existe uma importante relação entre inflamação e estresse oxidativo. Nas últimas décadas tornou-se cada vez mais claro que espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas em doenças cardiovasculares. Em uma série de condições fisiopatológicas o delicado equilíbrio entre produção de radicais livres e a capacidade antioxidante pode ser alterada, levando ao estresse oxidativo e lesão tecidual (Lakshmi *et al.*, 2009). Estudos experimentais e clínicos têm sugerido que o estresse oxidativo contribui para a insuficiência cardíaca e que a geração de ROS está aumentada na miocardite e insuficiência cardíaca (Belch *et al.*, 1991; Hill e Singal, 1996; Tsutsui *et al.*, 2006; Tsutsui *et al.*, 2009).

Radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados na sua última camada de valência, característica esta responsável por sua alta

reatividade. Os radicais livres mais conhecidos são as espécies reativas de oxigênio, incluindo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Cuzzocrea *et al.*, 2001; Esposito e Cuzzocrea, 2009).

O ânion superóxido é enzimaticamente reduzido a peróxido de hidrogênio na presença de superóxido dismutase (SOD), que o mantém assim em níveis controláveis. Todavia, em muitas doenças, a exemplo do choque endotóxico, há um desequilíbrio entre a concentração de ânion superóxido formado e a habilidade da SOD em removê-lo, caracterizando o estresse oxidativo (Esposito e Cuzzocrea, 2009). Gil e cols. (2004) demonstraram que pacientes com Dengue, Febre Hemorrágica do Dengue e síndrome do choque do Dengue apresentavam aumento da atividade da SOD (Gil *et al.*, 2004).

Das espécies reativas de oxigênio, o ânion superóxido tem recebido uma atenção especial, pois é um mediador pró-inflamatório, cujas propriedades incluem o recrutamento de neutrófilos ao local da inflamação, formação de fatores quimiotáticos, danos ao DNA e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , via ativação do fator nuclear (NF)- κB (Cuzzocrea *et al.*, 2001). Com o intuito de avaliar a produção de ânion superóxido no coração dos camundongos infectados com DENV-3 foi utilizada uma sonda fluorescente (DHE), que apresenta bons níveis de seletividade para o ânion superóxido. Os resultados mostraram haver aumento da fluorescência de forma tempo de infecção-dependente, sugerindo aumento de estresse oxidativo em função da cinética de infecção.

Trabalhos recentes sugerem que o estresse oxidativo é importante na patogênese do Dengue (Rajendiran *et al.*, 2008; Soundravally *et al.*, 2008; Seet *et al.*, 2009). Soundravally e cols. (2008b) avaliaram o status oxidativo de pacientes com Dengue, febre hemorrágica do dengue e/ou síndrome do choque do Dengue, e os resultados sugerem que a gravidade da doença está relacionada com o nível de estresse oxidativo. Além disso, observaram que a trombocitopenia observada após a infecção foi associada com elevado grau de peroxidação lipídica.

Glutationa peroxidase (GPx), importante enzima antioxidante, pode ser usada como um marcador de estresse oxidativo em doenças infecciosas. Rojas e cols. (2007) demonstraram que ocorre uma redução dos níveis séricos de GPX

em pacientes infectados com Dengue. Além disso, há uma relação entre a redução da GPx e a severidade das manifestações da doença, sugerindo que o estresse oxidativo desempenha um papel na patogênese da doença (Rojas *et al.*, 2007).

Neste trabalho avaliou-se o status redox cardíaco dos camundongos infectados com o vírus da Dengue. Os resultados apresentados sugerem que ocorre estresse oxidativo no coração dos animais após a infecção com o vírus da Dengue, caracterizado por redução dos níveis de GPx, aumento da peroxidação lipídica, aumento da atividade da SOD e catalase e aumento da fluorescência do DHE de acordo com a cinética de infecção. Estes achados sugerem que a alteração no estado redox do coração dos camundongos infectados com vírus da Dengue resulta em estresse oxidativo, podendo desempenhar um papel importante na patogênese da doença sobre o coração.

Pericardite, miocardite e estresse oxidativo podem levar a disfunção cardíaca. Para avaliar a função cardíaca utilizou-se ecocardiograma. Os animais apresentaram drástica redução de volume circulante, que resultou em intensa redução do débito cardíaco, volume sistólico e volume diastólico final. A análise desses parâmetros, em conjunto, permite sugerir que os animais após a infecção com DENV-3 apresentam choque hipovolêmico. Resultados semelhantes são encontrados em animais com sepse, que apresentam resposta inflamatória sistêmica associada a hipovolemia, disfunção cardíaca e choque séptico (Zanotti-Cavazzoni *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011). Além disso, houve redução do diâmetro sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo, que resultou em aumento da fração de encurtamento e fração de ejeção do ventrículo esquerdo, possivelmente por ativação de mecanismos compensatórios (hiperatividade simpática).

No sexto dia após a infecção ocorreu uma redução do tempo de relaxamento isovolumétrico e redução da relação E/A sugestivo de disfunção diastólica. Alguns destes achados ecocardiográficos também foram encontrados em pacientes diagnosticados com febre hemorrágica do Dengue/Síndrome do choque do Dengue (Wali *et al.*, 1998; Khongphatthanayothin *et al.*, 2003; Khongphatthanayothin *et al.*, 2007; Singhi e Jayashree, 2007; Lee *et al.*, 2009).

A insuficiência cardíaca pode estar associada a problemas eletrofisiológicos, tais como alterações no potencial de ação (Kaprielian *et al.*, 2002; Tomaselli e Zipes, 2004) e alterações na corrente de cálcio dos cardiomiócitos (Kaprielian *et al.*, 2002; Amin *et al.*, 2010). Sendo confirmada a hipótese de que durante a infecção com DENV-3 ocorre intensa inflamação, estresse oxidativo e insuficiência cardíaca, objetivou-se verificar se também estava ocorrendo alterações eletrofisiológicas nos cardiomiócitos dos animais infectados.

Ao avaliar as alterações eletrofisiológicas, nota-se uma redução da duração do potencial de ação em células do ventrículo esquerdo. Estes resultados estão de acordo com resultados similares encontrados em animais infectados com *Tripanossoma cruzi* e após sepse, doenças que apresentam disfunção cardíaca (Chen *et al.*, 2000; Roman-Campos *et al.*, 2009; Aoki *et al.*, 2011).

Diferentes componentes iônicos estão envolvidos no controle da repolarização do potencial de ação cardíaco. No presente estudo avaliou-se a corrente de cálcio de canais do tipo L ($I_{Ca,L}$), que apresenta uma importante função na ativação e contração celular. Nos cardiomiócitos dos animais infectados com DENV-3 verificou-se intensa redução da $I_{Ca,L}$. Resultados semelhantes foram encontrados em animais após sepse (Zhong *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2007).

VI. CONCLUSÃO

Baseando-se no conjunto de resultados obtidos nesta dissertação, pode-se afirmar que o coração é um órgão afetado durante a infecção pelo vírus da Dengue. Ocorre intenso processo inflamatório cardíaco caracterizado por aumento de permeabilidade vascular, recrutamento e ativação de leucócitos, produção de citocinas e quimiocinas, pericardite e miocardite. Além disso, há um desequilíbrio do status redox cardíaco, resultando em estresse oxidativo, ocorrem importantes alterações eletrofisiológicas e disfunção cardíaca. Desta forma, pode-se sugerir, pela primeira vez, que animais infectados com o vírus da Dengue apresentam importante disfunção cardíaca, alterações hemodinâmicas e choque.

VII. REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, v. 2, n. 8, p. 675-80 2001.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, v. 357, n. Pt 3, p. 593-615 2001.

AMIN, A. S.; TAN, H. L.; WILDE, A. A. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm*, v. 7, n. 1, p. 117-26 2010.

ANGIBAUD, G.; LUAUTE, J.; LAILLE, M.; GAULTIER, C. Brain involvement in Dengue fever. *J Clin Neurosci*, v. 8, n. 1, p. 63-5 2001.

AOKI, Y.; HATAKEYAMA, N.; YAMAMOTO, S.; KINOSHITA, H.; MATSUDA, N.; HATTORI, Y.; YAMAZAKI, M. Role of ion channels in sepsis-induced atrial tachyarrhythmias in guinea pigs. *Br J Pharmacol*, 2011.

ASSUNCAO-MIRANDA, I.; AMARAL, F. A.; BOZZA, F. A.; FAGUNDES, C. T.; SOUSA, L. P.; SOUZA, D. G.; PACHECO, P.; BARBOSA-LIMA, G.; GOMES, R. N.; BOZZA, P. T.; DA POIAN, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; BOZZA, M. T. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J*, v. 24, n. 1, p. 218-28 2010.

ATRASHEUSKAYA, A.; PETZELBAUER, P.; FREDEKING, T. M.; IGNATYEV, G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 35, n. 1, p. 33-42 2003.

AUKRUST, P.; UELAND, T.; MULLER, F.; ANDREASSEN, A. K.; NORDOY, I.; AAS, H.; KJEKSHUS, J.; SIMONSEN, S.; FROLAND, S. S.; GULLESTAD, L. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation*, v. 97, n. 12, p. 1136-43 1998.

AVIRUTNAN, P.; MALASIT, P.; SELIGER, B.; BHAKDI, S.; HUSMANN, M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*, v. 161, n. 11, p. 6338-46 1998.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. *Methods Enzymol*, v. 162, p. 327-34 1988.

BANOO, S.; BELL, D.; BOSSUYT, P.; HERRING, A.; MABEY, D.; POOLE, F.; SMITH, P. G.; SRIRAM, N.; WONGSRICHANALAI, C.; LINKE, R.; O'BRIEN, R.; PERKINS, M.; CUNNINGHAM, J.; MATSOSO, P.; NATHANSON, C. M. et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, n. 12 Suppl, p. S17-29 2010.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue fever: a call for local, national, and international action. *Lancet*, v. 372, n. 9634, p. 205 2008.

- BELCH, J. J.; BRIDGES, A. B.; SCOTT, N.; CHOPRA, M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J*, v. 65, n. 5, p. 245-8 1991.
- BENTE, D. A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models*, v. 3, n. 1, p. 97-103 2006.
- BETHELL, D. B.; FLOBBE, K.; CAO, X. T.; DAY, N. P.; PHAM, T. P.; BUURMAN, W. A.; CARDOSA, M. J.; WHITE, N. J.; KWIATKOWSKI, D. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, v. 177, n. 3, p. 778-82 1998.
- BHAKDI, S.; KAZATCHKINE, M. D. Pathogenesis of dengue: an alternative hypothesis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 21, n. 4, p. 652-7 1990.
- BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, v. 15, p. 749-95 1997.
- BOKISCH, V. A.; TOP, F. H., JR.; RUSSELL, P. K.; DIXON, F. J.; MULLER-EBERHARD, H. J. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. *N Engl J Med*, v. 289, n. 19, p. 996-1000 1973.
- BOZZA, F. A.; CRUZ, O. G.; ZAGNE, S. M.; AZEREDO, E. L.; NOGUEIRA, R. M.; ASSIS, E. F.; BOZZA, P. T.; KUBELKA, C. F. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*, v. 8, p. 86 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54 1976.
- BRASIL. Informe epidemiológico Dengue - semana epidemiológica 1 a 39 de 2011. *Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde*, 2011.
- CARDIER, J. E.; MARINO, E.; ROMANO, E.; TAYLOR, P.; LIPRANDI, F.; BOSCH, N.; ROTHMAN, A. L. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine*, v. 30, n. 6, p. 359-65 2005.
- CASTRO, J. E.; VADO-SOLIS, I.; PEREZ-OSORIO, C.; FREDEKING, T. M. Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. *Clin Dev Immunol*, v. 2011, p. 370872 2011.
- 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*, v. 123, n. 1, p. 25-30 2006.

- CHATURVEDI, U. C. Tumour necrosis factor & dengue. *Indian J Med Res*, v. 123, n. 1, p. 11-4 2006.
- CHATURVEDI, U. C.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI, E. A.; MUSTAFA, A. S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 28, n. 3, p. 183-8 2000.
- CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 56, n. 1, p. 9-24 2009.
- CHEN, C. C.; LIN, Y. C.; CHEN, S. A.; LUK, H. N.; DING, P. Y.; CHANG, M. S.; CHIANG, C. E. Shortening of cardiac action potentials in endotoxic shock in guinea pigs is caused by an increase in nitric oxide activity and activation of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel. *Crit Care Med*, v. 28, n. 6, p. 1713-20 2000.
- CHEN, H. C.; HOFMAN, F. M.; KUNG, J. T.; LIN, Y. D.; WU-HSIEH, B. A. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol*, v. 81, n. 11, p. 5518-26 2007.
- CHEN, K. Haemostatic disorder in Dengue hemorrhagic fever. *Acta Med Indones*, v. 36, n. 2, p. 55-6 2004.
- CHEN, L. C.; LEI, H. Y.; LIU, C. C.; SHIESH, S. C.; CHEN, S. H.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; WANG, S. T.; SHYU, H. W.; YEH, T. M. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*, v. 74, n. 1, p. 142-7 2006.
- CHEN, S. T.; LIN, Y. L.; HUANG, M. T.; WU, M. F.; CHENG, S. C.; LEI, H. Y.; LEE, C. K.; CHIOU, T. W.; WONG, C. H.; HSIEH, S. L. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*, v. 453, n. 7195, p. 672-6 2008.
- CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; HILEMAN, R. E.; FROMM, J. R.; ESKO, J. D.; LINHARDT, R. J.; MARKS, R. M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*, v. 3, n. 8, p. 866-71 1997.
- CHEUNG, R.; SHEN, F.; PHILLIPS, J. H.; MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J.; HEYWORTH, P. G.; PIERCE, R. H. Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice. *J Clin Invest*, v. 121, n. 11, p. 4446-61 2011.
- CHHINA, D. K.; GOYAL, O.; GOYAL, P.; KUMAR, R.; PURI, S.; CHHINA, R. S. Haemorrhagic manifestations of dengue fever & their management in a tertiary care hospital in north India. *Indian J Med Res*, v. 129, n. 6, p. 718-20 2009.

CHRYSOHOOU, C.; PITSAVOS, C.; BARBETSEAS, J.; KOTROYIANNIS, I.; BRILI, S.; VASILIADOU, K.; PAPADIMITRIOU, L.; STEFANADIS, C. Chronic systemic inflammation accompanies impaired ventricular diastolic function, detected by Doppler imaging, in patients with newly diagnosed systolic heart failure (Hellenic Heart Failure Study). *Heart Vessels*, v. 24, n. 1, p. 22-6 2009.

CHUA, J. J.; BHUVANAKANTHAM, R.; CHOW, V. T.; NG, M. L. Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3beta protein. *Virus Res*, v. 112, n. 1-2, p. 85-94 2005.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*, v. 80, n. 23, p. 11418-31 2006.

COFFEY, L. L.; MERTENS, E.; BREHIN, A. C.; FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; AMARA, A.; DESPRES, P.; SAKUNTABHAI, A. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes Infect*, v. 11, n. 2, p. 143-56 2009.

COOPER, L. T., JR. Myocarditis. *N Engl J Med*, v. 360, n. 15, p. 1526-38 2009.

COSTA, V. V. Papel do IFN- γ e da iNOS na patogênese do Dengue experimental. *Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.*, 2009.

CROSS, A. S.; SAKARYA, S.; RIFAT, S.; HELD, T. K.; DRYSDALE, B. E.; GRANGE, P. A.; CASSELS, F. J.; WANG, L. X.; STAMATOS, N.; FARESE, A.; CASEY, D.; POWELL, J.; BHATTACHARJEE, A. K.; KLEINBERG, M.; GOLDBLUM, S. E. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem*, v. 278, n. 6, p. 4112-20 2003.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D. P.; CAPUTI, A. P.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, v. 53, n. 1, p. 135-59 2001.

DE SOUZA, L. J.; GONCALVES CARNEIRO, H.; SOUTO FILHO, J. T.; FERREIRA DE SOUZA, T.; AZEVEDO CORTES, V.; NETO, C. G.; BASTOS, D. A.; DA SILVA SIQUEIRA, E. W. Hepatitis in dengue shock syndrome. *Braz J Infect Dis*, v. 6, n. 6, p. 322-7 2002.

DE SOUZA, L. J.; NOGUEIRA, R. M.; SOARES, L. C.; SOARES, C. E.; RIBAS, B. F.; ALVES, F. P.; VIEIRA, F. R.; PESSANHA, F. E. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferase levels. *Braz J Infect Dis*, v. 11, n. 4, p. 407-10 2007.

DECKER, T.; STOCKINGER, S.; KARAGHIOSOFF, M.; MULLER, M.; KOVARIK, P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest*, v. 109, n. 10, p. 1271-7 2002.

DENNERT, R.; CRIJNS, H. J.; HEYMANS, S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J*, v. 29, n. 17, p. 2073-82 2008.

DEWALD, O.; ZYMEK, P.; WINKELMANN, K.; KOERTING, A.; REN, G.; ABOU-KHAMIS, T.; MICHAEL, L. H.; ROLLINS, B. J.; ENTMAN, M. L.; FRANGOGIANNIS, N. G. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*, v. 96, n. 8, p. 881-9 2005.

DEWI, B. E.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods*, v. 121, n. 2, p. 171-80 2004.

DI SILVIO, M.; GELLER, D. A.; GROSS, S. S.; NUSSLER, A.; FREESWICK, P.; SIMMONS, R. L.; BILLIAR, T. R. Inducible nitric oxide synthase activity in hepatocytes is dependent on the coinduction of tetrahydrobiopterin synthesis. *Adv Exp Med Biol*, v. 338, p. 305-8 1993.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, v. 101, n. 1, p. 33-9 2000.

ELLIS, C. R.; DI SALVO, T. Myocarditis: basic and clinical aspects. *Cardiol Rev*, v. 15, n. 4, p. 170-7 2007.

ENGVALL, E. Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. *Med Biol*, v. 55, n. 4, p. 193-200 1977.

ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Superoxide, NO, peroxynitrite and PARP in circulatory shock and inflammation. *Front Biosci*, v. 14, p. 263-96 2009.

FAGUNDES, C. T.; COSTA, V. V.; CISALPINO, D.; AMARAL, F. A.; SOUZA, P. R.; SOUZA, R. S.; RYFFEL, B.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, T. A.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; SOUSA, L. P.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. IFN-gamma Production Depends on IL-12 and IL-18 Combined Action and Mediates Host Resistance to Dengue Virus Infection in a Nitric Oxide-Dependent Manner. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5, n. 12, p. e1449 2011.

FAGUNDES, C. T.; SOUZA, D. G.; NICOLI, J. R.; TEIXEIRA, M. M. Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system. *Microbes Infect*, v. 13, n. 14-15, p. 1121-32 2011.

FENG, W.; LI, W.; LIU, W.; WANG, F.; LI, Y.; YAN, W. IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure. *Exp Mol Pathol*, v. 87, n. 3, p. 212-8 2009.

FENG, Y.; ZOU, L.; ZHANG, M.; LI, Y.; CHEN, C.; CHAO, W. MyD88 and Trif signaling play distinct roles in cardiac dysfunction and mortality during endotoxin shock and polymicrobial sepsis. *Anesthesiology*, v. 115, n. 3, p. 555-67 2011.

FRANCA, R. F.; ZUCOLOTO, S.; DA FONSECA, B. A. A BALB/c mouse model shows that liver involvement in dengue disease is immune-mediated. *Exp Mol Pathol*, v. 89, n. 3, p. 321-6 2010.

GAO, R. M.; YUAN, Z. B.; ZHAO, Z. Q.; GAO, X. R. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 45, n. 1, p. 41-45 1998.

GERMI, R.; CRANCE, J. M.; GARIN, D.; GUIMET, J.; LORTAT-JACOB, H.; RUIGROK, R. W.; ZARSKI, J. P.; DROUET, E. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, v. 292, n. 1, p. 162-8 2002.

GIL, L.; MARTINEZ, G.; TAPANES, R.; CASTRO, O.; GONZALEZ, D.; BERNARDO, L.; VAZQUEZ, S.; KOURI, G.; GUZMAN, M. G. Oxidative stress in adult dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*, v. 71, n. 5, p. 652-7 2004.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*, v. 19, n. 5, p. 429-36 2006.

GUABIRABA, R.; MARQUES, R. E.; BESNARD, A. G.; FAGUNDES, C. T.; SOUZA, D. G.; RYFFEL, B.; TEIXEIRA, M. M. Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. e15680 2010.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, v. 11, n. 3, p. 480-96 1998.

GULATI, S.; MAHESHWARI, A. Atypical manifestations of dengue. *Trop Med Int Health*, v. 12, n. 9, p. 1087-95 2007.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTINEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16 2010.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*, v. 2, n. 1, p. 33-42 2002.

HALSTEAD, S. B. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis*, v. 140, n. 4, p. 527-33 1979.

- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, v. 239, n. 4839, p. 476-81 1988.
- HALSTEAD, S. B. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis*, v. 11 Suppl 4, p. S830-9 1989.
- HALSTEAD, S. B. Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 21, n. 4, p. 636-41 1990.
- HALSTEAD, S. B.; ROJANASUPHOT, S.; SANGKAWIBHA, N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg*, v. 32, n. 1, p. 154-6 1983.
- HALSTEAD, S. B.; UDOMSAKDI, S.; SIMASTHIEN, P.; SINGHARAJ, P.; SUKHAVACHANA, P.; NISALAK, A. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. *Yale J Biol Med*, v. 42, n. 5, p. 261-75 1970.
- HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, v. 391, n. 2, p. 85-100 1981.
- HAYES, E. B.; GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*, v. 11, n. 4, p. 311-7 1992.
- HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*, v. 148, n. 1, p. 291-300 1996.
- HOBER, D.; POLI, L.; ROBLIN, B.; GESTAS, P.; CHUNGUE, E.; GRANIC, G.; IMBERT, P.; PECARERE, J. L.; VERGEZ-PASCAL, R.; WATTRE, P.; ET AL. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg*, v. 48, n. 3, p. 324-31 1993.
- HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*, v. 3, n. 1, p. 19-28 2003.
- HORIO, T. [Pathophysiological role of cytokines in heart failure]. *Nihon Rinsho*, v. 64, n. 5, p. 843-7 2006.
- HORTA VELOSO, H.; FERREIRA JUNIOR, J. A.; BRAGA DE PAIVA, J. M.; FARIA HONORIO, J.; JUNQUEIRA BELLEI, N. C.; VICENZO DE PAOLA, A. A. Acute atrial fibrillation during dengue hemorrhagic fever. *Braz J Infect Dis*, v. 7, n. 6, p. 418-22 2003.

HOTTA, H.; MURAKAMI, I.; MIYASAKI, K.; TAKEDA, Y.; SHIRANE, H.; HOTTA, S. Inoculation of dengue virus into nude mice. *J Gen Virol*, v. 52, n. Pt 1, p. 71-6 1981.

HUANG, Y. H.; LEI, H. Y.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; LIU, C. C.; YEH, T. M. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg*, v. 63, n. 1-2, p. 71-5 2000.

HUANG, Y. H.; LIU, C. C.; WANG, S. T.; LEI, H. Y.; LIU, H. L.; LIN, Y. S.; WU, H. L.; YEH, T. M. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J Med Virol*, v. 63, n. 3, p. 247-51 2001.

HUDZIK, B.; SZKODZINSKI, J.; ROMANOWSKI, W.; DANIKIEWICZ, A.; WILCZEK, K.; LEKSTON, A.; POLONSKI, L.; ZUBELEWICZ-SZKODZINSKA, B. Serum interleukin-6 concentration reflects the extent of asymptomatic left ventricular dysfunction and predicts progression to heart failure in patients with stable coronary artery disease. *Cytokine*, v. 54, n. 3, p. 266-71 2011.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, v. 5, n. 10, p. 987-95 2004.

JAIYEN, Y.; MASRINOUL, P.; KALAYANAROOJ, S.; PULMANAUSAHAKUL, R.; UBOL, S. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol*, v. 53, n. 8, p. 442-50 2009.

KAPRIELIAN, R.; DEL MONTE, F.; HAJJAR, R. J. Targeting Ca²⁺ cycling proteins and the action potential in heart failure by gene transfer. *Basic Res Cardiol*, v. 97 Suppl 1, p. I136-45 2002.

KAWAI, C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation*, v. 99, n. 8, p. 1091-100 1999.

KELL, R.; HAUNSTETTER, A.; DENGLER, T. J.; ZUGCK, C.; KUBLER, W.; HAASS, M. Do cytokines enable risk stratification to be improved in NYHA functional class III patients? Comparison with other potential predictors of prognosis. *Eur Heart J*, v. 23, n. 1, p. 70-8 2002.

KHONGPHATTHALLAYOTHIN, A.; CHOTIVITAYATARAKORN, P.; SOMCHIT, S.; MITPRASART, A.; SAKOLSATTAYADORN, S.; THISYAKORN, C. Morbitz type I second degree AV block during recovery from dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 31, n. 4, p. 642-5 2000.

KHONGPHATTHANAYOTHIN, A.; LERTSAPCHAROEN, P.; SUPACHOKCHAIWATTANA, P.; LA-ORKHUN, V.; KHUMTONVONG, A.; BOONLARPTAVEECHOKE, C.; PANCHAROEN, C. Myocardial depression in dengue hemorrhagic fever: prevalence and clinical description. *Pediatr Crit Care Med*, v. 8, n. 6, p. 524-9 2007.

- KHONGPHATTHANAYOTHIN, A.; SUESAOWALAK, M.; MUANGMINGSOOK, S.; BHATTARAKOSOL, P.; PANCHAROEN, C. Hemodynamic profiles of patients with dengue hemorrhagic fever during toxic stage: an echocardiographic study. *Intensive Care Med*, v. 29, n. 4, p. 570-4 2003.
- KING, C. A.; ANDERSON, R.; MARSHALL, J. S. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. *J Virol*, v. 76, n. 16, p. 8408-19 2002.
- KOBAYASHI, Y. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol*, v. 26, n. 4, p. 307-16 2006.
- KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*, v. 13, p. 2400-7 2008.
- KOBAYASHI, Y.; KUBO, A.; IWANO, M.; SAKAGUCHI, Y.; SAMEJIMA, K.; KYODA, Y.; YONEMASU, K.; HASHIMOTO, T. Levels of MCP-1 and GM-CSF mRNA correlated with inflammatory cytokines mRNA levels in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Autoimmunity*, v. 35, n. 2, p. 97-104 2002.
- KREGE, J. H.; HODGIN, J. B.; HAGAMAN, J. R.; SMITHIES, O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*, v. 25, n. 5, p. 1111-5 1995.
- KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 30, n. 5-6, p. 329-40 2007.
- KURANE, I.; ENNIS, F. E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol*, v. 4, n. 2, p. 121-7 1992.
- KURANE, I.; ROTHMAN, A. L.; LIVINGSTON, P. G.; GREEN, S.; GAGNON, S. J.; JANUS, J.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol Suppl*, v. 9, p. 59-64 1994.
- KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol*, v. 62, p. 71-92 2008.
- LAKSHMI, S. V.; PADMAJA, G.; KUPPUSAMY, P.; KUTALA, V. K. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys*, v. 46, n. 6, p. 421-40 2009.
- LEE, C. H.; TEO, C.; LOW, A. F. Fulminant dengue myocarditis masquerading as acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, v. 136, n. 3, p. e69-71 2009.

LEE, I. K.; LEE, W. H.; LIU, J. W.; YANG, K. D. Acute myocarditis in dengue hemorrhagic fever: a case report and review of cardiac complications in dengue-affected patients. *Int J Infect Dis*, v. 14, n. 10, p. e919-22 2010.

LEE, Y. R.; LIU, M. T.; LEI, H. Y.; LIU, C. C.; WU, J. M.; TUNG, Y. C.; LIN, Y. S.; YEH, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, H. S. 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*, v. 87, n. Pt 12, p. 3623-30 2006.

LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; DE, C.; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*, v. 73, n. 6, p. 4738-47 1999.

LEONG, A. S.; WONG, K. T.; LEONG, T. Y.; TAN, P. H.; WANNAKRAIROT, P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol*, v. 24, n. 4, p. 227-36 2007.

LEVINE, B.; KALMAN, J.; MAYER, L.; FILLIT, H. M.; PACKER, M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, v. 323, n. 4, p. 236-41 1990.

LEVY, A.; VALERO, N.; ESPINA, L. M.; ANEZ, G.; ARIAS, J.; MOSQUERA, J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 104, n. 1, p. 16-23 2010.

LI, H.; POULOS, T. L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem*, v. 99, n. 1, p. 293-305 2005.

LIGON, B. L. Emerging and re-emerging infectious diseases: review of general contributing factors and of West Nile virus. *Semin Pediatr Infect Dis*, v. 15, n. 3, p. 199-205 2004.

LIGON, B. L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention. *Semin Pediatr Infect Dis*, v. 16, n. 1, p. 60-5 2005.

LIN, C. F.; CHIU, S. C.; HSIAO, Y. L.; WAN, S. W.; LEI, H. Y.; SHIAU, A. L.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, C. C.; LIN, Y. S. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol*, v. 174, n. 1, p. 395-403 2005.

LIN, Y. L.; HUANG, Y. L.; MA, S. H.; YEH, C. T.; CHIOU, S. Y.; CHEN, L. K.; LIAO, C. L. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J Virol*, v. 71, n. 7, p. 5227-35 1997.

- LOZACH, P. Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J. L.; REY, F. A.; DESPRES, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; AMARA, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*, v. 280, n. 25, p. 23698-708 2005.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, v. 7, n. 2, p. 156-67 2008.
- MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, v. 15, p. 323-50 1997.
- MAHMUD, M.; DARUL, N. D.; MOKHTAR, I.; NOR, N. M.; ANSHAR, F. M.; MASKON, O. Atrial fibrillation as a complication of dengue hemorrhagic fever: non-self-limiting manifestation. *Int J Infect Dis*, v. 13, n. 5, p. e316-8 2009.
- MAHMUDUZZAMAN, M.; CHOWDHURY, A. S.; GHOSH, D. K.; KABIR, I. M.; RAHMAN, M. A.; ALI, M. S. Serum transaminase level changes in dengue fever and its correlation with disease severity. *Mymensingh Med J*, v. 20, n. 3, p. 349-55 2011.
- MALASIT, P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 18, n. 3, p. 316-20 1987.
- MANGADA, M. M.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. Quantitation of dengue virus specific CD4+ T cells by intracellular cytokine staining. *J Immunol Methods*, v. 284, n. 1-2, p. 89-97 2004.
- MARKOFF, L. J.; INNIS, B. L.; HOUGHTEN, R.; HENCHAL, L. S. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis*, v. 164, n. 2, p. 294-301 1991.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev*, v. 225, p. 300-13 2008.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-35 2008.
- MILLER, F. J., JR.; GUTTERMAN, D. D.; RIOS, C. D.; HEISTAD, D. D.; DAVIDSON, B. L. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*, v. 82, n. 12, p. 1298-305 1998.

MILLER, J. L.; DE WET, B. J.; MARTINEZ-POMARES, L.; RADCLIFFE, C. M.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M.; GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog*, v. 4, n. 2, p. e17 2008.

MILLER, S.; KRIJNSE-LOCKER, J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, n. 5, p. 363-74 2008.

MOHAN, B.; PATWARI, A. K.; ANAND, V. K. Hepatic dysfunction in childhood dengue infection. *J Trop Pediatr*, v. 46, n. 1, p. 40-3 2000.

MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, n. 7, p. 2395-400 1994.

MOURAO, M. P.; LACERDA, M. V.; MACEDO, V. O.; SANTOS, J. B. Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. *Platelets*, v. 18, n. 8, p. 605-12 2007.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, v. 3, n. 1, p. 13-22 2005.

MULLANE, K. M.; KRAEMER, R.; SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods*, v. 14, n. 3, p. 157-67 1985.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol*, v. 29, p. 587-619 2011.

MURTHY, J. M. Neurological complication of dengue infection. *Neurol India*, v. 58, n. 4, p. 581-4 2010.

NAGARATNAM, N.; SIRIPALA, K.; DE SILVA, N. Arbovirus (dengue type) as a cause of acute myocarditis and pericarditis. *Br Heart J*, v. 35, n. 2, p. 204-6 1973.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; ALTMAYER, R.; AMARA, A.; SCHWARTZ, O.; FIESCHI, F.; VIRELIZIER, J. L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DESPRES, P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*, v. 4, n. 7, p. 723-8 2003.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; DESPRES, P.; CEDILLO-BARRON, L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res*, v. 36, n. 5, p. 425-35 2005.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem*, v. 49, n. 2, p. 474-8 1972.

NEVES-SOUZA, P. C.; AZEREDO, E. L.; ZAGNE, S. M.; VALLS-DE-SOUZA, R.; REIS, S. R.; CERQUEIRA, D. I.; NOGUEIRA, R. M.; KUBELKA, C. F. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis*, v. 5, p. 64 2005.

NGUYEN, T. H.; LEI, H. Y.; NGUYEN, T. L.; LIN, Y. S.; HUANG, K. J.; LE, B. L.; LIN, C. F.; YEH, T. M.; DO, Q. H.; VU, T. Q.; CHEN, L. C.; HUANG, J. H.; LAM, T. M.; LIU, C. C.; HALSTEAD, S. B. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis*, v. 189, n. 2, p. 221-32 2004.

NGUYEN, T. H.; NGUYEN, T. L.; LEI, H. Y.; LIN, Y. S.; LE, B. L.; HUANG, K. J.; LIN, C. F.; DO, Q. H.; VU, T. Q.; LAM, T. M.; YEH, T. M.; HUANG, J. H.; LIU, C. C.; HALSTEAD, S. B. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, v. 72, n. 4, p. 370-4 2005.

NIEBAUER, J. Inflammatory mediators in heart failure. *Int J Cardiol*, v. 72, n. 3, p. 209-13 2000.

NIU, J.; KOLATTUKUDY, P. E. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)*, v. 117, n. 3, p. 95-109 2009.

NOGUEIRA, R. M.; DE ARAUJO, J. M.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*, v. 22, n. 5, p. 358-63 2007.

NOISAKRAN, S.; PERNG, G. C. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 233, n. 4, p. 401-8 2008.

NUSSLER, A. K.; BILLIAR, T. R.; LIU, Z. Z.; MORRIS, S. M., JR. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *J Biol Chem*, v. 269, n. 2, p. 1257-61 1994.

OBEYESEKERE, I.; HERMON, Y. Myocarditis and cardiomyopathy after arbovirus infections (dengue and chikungunya fever). *Br Heart J*, v. 34, n. 8, p. 821-7 1972.

OBEYESEKERE, I.; HERMON, Y. Arbovirus heart disease: myocarditis and cardiomyopathy following dengue and chikungunya fever--a follow-up study. *Am Heart J*, v. 85, n. 2, p. 186-94 1973.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, v. 95, n. 2, p. 351-8 1979.

- OIKONOMOU, E.; TOUSOULIS, D.; SIASOS, G.; ZAROMITIDOU, M.; PAPAVALASSIOU, A. G.; STEFANADIS, C. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. *Hellenic J Cardiol*, v. 52, n. 1, p. 30-40 2011.
- PAES, M. V.; LENZI, H. L.; NOGUEIRA, A. C.; NUOVO, G. J.; PINHAO, A. T.; MOTA, E. M.; BASILIO-DE-OLIVEIRA, C. A.; SCHATZMAYR, H.; BARTH, O. M.; ALVES, A. M. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest*, v. 89, n. 10, p. 1140-51 2009.
- PAES, M. V.; PINHAO, A. T.; BARRETO, D. F.; COSTA, S. M.; OLIVEIRA, M. P.; NOGUEIRA, A. C.; TAKIYA, C. M.; FARIAS-FILHO, J. C.; SCHATZMAYR, H. G.; ALVES, A. M.; BARTH, O. M. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*, v. 338, n. 2, p. 236-46 2005.
- PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, v. 70, n. 1, p. 158-69 1967.
- PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*, v. 85, n. 1, p. 43-5 2007.
- PANKUWEIT, S.; PORTIG, I.; MAISCH, B. Pathophysiology of cardiac inflammation: molecular mechanisms. *Herz*, v. 27, n. 7, p. 669-76 2002.
- PEELING, R. W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J. L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M. J.; DEVI, S.; ENRIA, D. A.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; HUNSPERGER, E.; KLIKS, S.; MARGOLIS, H. S.; NATHANSON, C. M. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, n. 12 Suppl, p. S30-8 2010.
- PETERSEN, J. W.; FELKER, G. M. Inflammatory biomarkers in heart failure. *Congest Heart Fail*, v. 12, n. 6, p. 324-8 2006.
- PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*, v. 50, n. 3-4, p. 161-9 1997.
- PONGPANICH, B.; KUMPONPANT, S. Studies of dengue hemorrhagic fever. V. Hemodynamic studies of clinical shock associated with dengue hemorrhagic fever. *J Pediatr*, v. 83, n. 6, p. 1073-7 1973.
- PRIYADARSHINI, D.; GADIA, R. R.; TRIPATHY, A.; GURUKUMAR, K. R.; BHAGAT, A.; PATWARDHAN, S.; MOKASHI, N.; VAIDYA, D.; SHAH, P. S.; CECILIA, D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One*, v. 5, n. 1, p. e8709 2010.

RACHMAN, A.; RINALDI, I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. *Acta Med Indones*, v. 38, n. 2, p. 105-8 2006.

RAJENDIRAN, S.; LAKSHAMANAPPA, H. S.; ZACHARIAH, B.; NAMBIAR, S. Desialylation of plasma proteins in severe dengue infection: possible role of oxidative stress. *Am J Trop Med Hyg*, v. 79, n. 3, p. 372-7 2008.

RENNESON, J.; GUABIRABA, R.; MAILLET, I.; MARQUES, R. E.; IVANOV, S.; FONTAINE, J.; PAGET, C.; QUESNIAUX, V.; FAVEEUW, C.; RYFFEL, B.; TEIXEIRA, M. M.; TROTTEIN, F. A detrimental role for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection. *Am J Pathol*, v. 179, n. 4, p. 1872-83 2011.

RESTREPO, B. N.; ISAZA, D. M.; SALAZAR, C. L.; RAMIREZ, R.; OSPINA, M.; ALVAREZ, L. G. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, n. 1, p. 6-10 2008.

REYES-DEL VALLE, J.; CHAVEZ-SALINAS, S.; MEDINA, F.; DEL ANGEL, R. M. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol*, v. 79, n. 8, p. 4557-67 2005.

RIGAU-PEREZ, J. G. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. *Am J Trop Med Hyg*, v. 59, n. 2, p. 272-4 1998.

RIGAU-PEREZ, J. G. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis*, v. 6, n. 5, p. 297-302 2006.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*, v. 67, n. 16, p. 2773-86 2010.

ROJAS, E. M.; DIAZ-QUIJANO, F. A.; CORONEL-RUIZ, C.; MARTINEZ-VEGA, R. A.; RUEDA, E.; VILLAR-CENTENO, L. A. [Association between glutathione peroxidase levels and clinical manifestations of dengue]. *Rev Med Chil*, v. 135, n. 6, p. 743-50 2007.

ROLPH, M. S.; ZAID, A.; RULLI, N. E.; MAHALINGAM, S. Downregulation of interferon-beta in antibody-dependent enhancement of dengue viral infections of human macrophages is dependent on interleukin-6. *J Infect Dis*, v. 204, n. 3, p. 489-91 2011.

ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H. L.; SALES, P. A., JR.; NATALI, A. J.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; CRUZ, J. S. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol*, v. 104, n. 3, p. 238-46 2009.

ROTHMAN, A. L. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res*, v. 60, p. 397-419 2003.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*, v. 11, n. 8, p. 532-43 2011.

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

SALGADO, D. M.; ELTIT, J. M.; MANSFIELD, K.; PANQUEBA, C.; CASTRO, D.; VEGA, M. R.; XHAJA, K.; SCHMIDT, D.; MARTIN, K. J.; ALLEN, P. D.; RODRIGUEZ, J. A.; DINSMORE, J. H.; LOPEZ, J. R.; BOSCH, I. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J*, v. 29, n. 3, p. 238-42 2010.

SANGKAWIBHA, N.; ROJANASUPHOT, S.; AHANDRIK, S.; VIRIYAPONGSE, S.; JATANASEN, S.; SALITUL, V.; PHANTHUMACHINDA, B.; HALSTEAD, S. B. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol*, v. 120, n. 5, p. 653-69 1984.

SANGLE, S. A.; DASGUPTA, A.; RATNALIKAR, S. D.; KULKARNI, R. V. Dengue myositis and myocarditis. *Neurol India*, v. 58, n. 4, p. 598-9 2010.

SARIA, A.; LUNDBERG, J. M. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods*, v. 8, n. 1, p. 41-9 1983.

SCHATZMAYR, H. G. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 95 Suppl 1, p. 179-81 2000.

SCHEXNEIDER, K. I.; REEDY, E. A. Thrombocytopenia in dengue fever. *Curr Hematol Rep*, v. 4, n. 2, p. 145-8 2005.

SCHNARE, M.; BARTON, G. M.; HOLT, A. C.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, v. 2, n. 10, p. 947-50 2001.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, v. 75, n. 2, p. 163-89 2004.

SCHULZ, R.; PANAS, D. L.; CATENA, R.; MONCADA, S.; OLLEY, P. M.; LOPASCHUK, G. D. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Pharmacol*, v. 114, n. 1, p. 27-34 1995.

SCOTT, R. M.; NISALAK, A.; CHEAMUDON, U.; SERIDHORANAKUL, S.; NIMMANNITYA, S. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, v. 141, n. 1, p. 1-6 1980.

SEET, R. C.; LEE, C. Y.; LIM, E. C.; QUEK, A. M.; YEO, L. L.; HUANG, S. H.; HALLIWELL, B. Oxidative damage in dengue fever. *Free Radic Biol Med*, v. 47, n. 4, p. 375-80 2009.

SHIOI, T.; MATSUMORI, A.; SASAYAMA, S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation*, v. 94, n. 11, p. 2930-7 1996.

SHIOYA, T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J Physiol Sci*, v. 57, n. 6, p. 327-35 2007.

SHRESTA, S.; KYLE, J. L.; ROBERT BEATTY, P.; HARRIS, E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology*, v. 319, n. 2, p. 262-73 2004.

SHRESTA, S.; KYLE, J. L.; SNIDER, H. M.; BASAVAPATNA, M.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol*, v. 78, n. 6, p. 2701-10 2004.

SHRESTA, S.; SHARAR, K. L.; PRIGOZHIN, D. M.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol*, v. 80, n. 20, p. 10208-17 2006.

SIERRA, B.; PEREZ, A. B.; VOGT, K.; GARCIA, G.; SCHMOLKE, K.; AGUIRRE, E.; ALVAREZ, M.; VOLK, H. D.; GUZMAN, M. G. MCP-1 and MIP-1alpha expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine*, v. 52, n. 3, p. 175-83 2010.

SINGHI, S.; JAYASHREE, M. Dengue shock syndrome: at the heart of the issue. *Pediatr Crit Care Med*, v. 8, n. 6, p. 583-4 2007.

SIQUEIRA, J. B., JR.; MARTELLI, C. M.; COELHO, G. E.; SIMPLICIO, A. C.; HATCH, D. L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*, v. 11, n. 1, p. 48-53 2005.

SONDEREGGER, I.; ROHN, T. A.; KURRER, M. O.; IEZZI, G.; ZOU, Y.; KASTELEIN, R. A.; BACHMANN, M. F.; KOPF, M. Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *Eur J Immunol*, v. 36, n. 11, p. 2849-56 2006.

SOSOTHIKUL, D.; SEKSARN, P.; PONGSEWALAK, S.; THISYAKORN, U.; LUSHER, J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thromb Haemost*, v. 97, n. 4, p. 627-34 2007.

SOUNDRAVALLY, R.; SANKAR, P.; HOTI, S. L.; SELVARAJ, N.; BOBBY, Z.; SRIDHAR, M. G. Oxidative stress induced changes in plasma protein can be a predictor of imminent severe dengue infection. *Acta Trop*, v. 106, n. 3, p. 156-61 2008.

SOUZA, D. G.; CASSALI, G. D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol*, v. 134, n. 5, p. 985-94 2001.

SOUZA, D. G.; FAGUNDES, C. T.; SOUSA, L. P.; AMARAL, F. A.; SOUZA, R. S.; SOUZA, A. L.; KROON, E. G.; SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; BUKIN, E.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106, n. 33, p. 14138-43 2009.

SOUZA, D. G.; SOARES, A. C.; PINHO, V.; TORLONI, H.; REIS, L. F.; TEIXEIRA, M. M.; DIAS, A. A. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol*, v. 160, n. 5, p. 1755-65 2002.

SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES.; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dengue : guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control*. New. Geneva: TDR : World Health Organization, 2009. 147 p.

SRIKIATKHACHORN, A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost*, v. 102, n. 6, p. 1042-9 2009.

SRIKIATKHACHORN, A.; GREEN, S. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 338, p. 67-82 2010.

SUN, P.; BAUZA, K.; PAL, S.; LIANG, Z.; WU, S. J.; BECKETT, C.; BURGESS, T.; PORTER, K. Infection and activation of human peripheral blood monocytes by dengue viruses through the mechanism of antibody-dependent enhancement. *Virology*, v. 421, n. 2, p. 245-52 2011.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, v. 17, n. 1, p. 1-14 2005.

TAKHAMPUNYA, R.; PADMANABHAN, R.; UBOL, S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol*, v. 87, n. Pt 10, p. 3003-11 2006.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M. A.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D. L.; STEINMAN, R. M.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M. A. DC-SIGN (CD209) mediates

dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*, v. 197, n. 7, p. 823-9 2003.

TEIXEIRA MDA, G.; COSTA MDA, C.; BARRETO, M. L.; MOTA, E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica*, v. 21, n. 5, p. 1307-15 2005.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. Diagnosis and management of dengue. *BMJ*, v. 339, p. b4338 2009.

TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Response to an infectious insult (e.g., bacterial or fungal infection). *Braz J Med Biol Res*, v. 34, n. 5, p. 1 p preceding 555 2001.

TOMASELLI, G. F.; ZIPES, D. P. What causes sudden death in heart failure? *Circ Res*, v. 95, n. 8, p. 754-63 2004.

TSUTSUI, H.; IDE, T.; KINUGAWA, S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure. *Antioxid Redox Signal*, v. 8, n. 9-10, p. 1737-44 2006.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res*, v. 81, n. 3, p. 449-56 2009.

URCUQUI-INCHIMA, S.; PATINO, C.; TORRES, S.; HAENNI, A. L.; DIAZ, F. J. Recent developments in understanding dengue virus replication. *Adv Virus Res*, v. 77, p. 1-39 2010.

VALERO, C. N.; REYES, V. I.; LARREAL, E. Y.; MALDONADO, E. M. [Aminotransferases serum levels in patients with Dengue type 3]. *Rev Med Chil*, v. 135, n. 10, p. 1304-12 2007.

VARATHARAJ, A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. *Neurol India*, v. 58, n. 4, p. 585-91 2010.

VAUGHN, D. W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T. P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A.; NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*, v. 181, n. 1, p. 2-9 2000.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol*, v. 31, n. 6, p. 507-20 1978.

WALI, J. P.; BISWAS, A.; CHANDRA, S.; MALHOTRA, A.; AGGARWAL, P.; HANDA, R.; WIG, N.; BAHL, V. K. Cardiac involvement in Dengue Haemorrhagic Fever. *Int J Cardiol*, v. 64, n. 1, p. 31-6 1998.

WARKE, R. V.; XHAJA, K.; MARTIN, K. J.; FOURNIER, M. F.; SHAW, S. K.; BRIZUELA, N.; DE BOSCH, N.; LAPOINTE, D.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L.; BOSCH, I. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol*, v. 77, n. 21, p. 11822-32 2003.

WEERAKOON, K. G.; KULARATNE, S. A.; EDUSSURIYA, D. H.; KODIKARA, S. K.; GUNATILAKE, L. P.; PINTO, V. G.; SENEVIRATNE, A. B.; GUNASENA, S. Histopathological diagnosis of myocarditis in a dengue outbreak in Sri Lanka, 2009. *BMC Res Notes*, v. 4, p. 268 2011.

WESTAWAY, E. G.; BRINTON, M. A.; GAIDAMOVICH, S.; HORZINEK, M. C.; IGARASHI, A.; KAARIAINEN, L.; LVOV, D. K.; PORTERFIELD, J. S.; RUSSELL, P. K.; TRENT, D. W. Flaviviridae. *Intervirology*, v. 24, n. 4, p. 183-92 1985.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*, v. 5, n. 7, p. 518-28 2007.

WILLS, B.; TRAN, V. N.; NGUYEN, T. H.; TRUONG, T. T.; TRAN, T. N.; NGUYEN, M. D.; TRAN, V. D.; NGUYEN, V. V.; DINH, T. T.; FARRAR, J. Hemostatic changes in Vietnamese children with mild dengue correlate with the severity of vascular leakage rather than bleeding. *Am J Trop Med Hyg*, v. 81, n. 4, p. 638-44 2009.

WILLS, B. A.; ORAGUI, E. E.; STEPHENS, A. C.; DARAMOLA, O. A.; DUNG, N. M.; LOAN, H. T.; CHAU, N. V.; CHAMBERS, M.; STEPNIIEWSKA, K.; FARRAR, J. J.; LEVIN, M. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome. *Clin Infect Dis*, v. 35, n. 3, p. 277-85 2002.

WINK, D. A.; HINES, H. B.; CHENG, R. Y.; SWITZER, C. H.; FLORES-SANTANA, W.; VITEK, M. P.; RIDNOUR, L. A.; COLTON, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol*, v. 89, n. 6, p. 873-91 2011.

YAJIMA, T. Viral myocarditis: potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection. *Future Microbiol*, v. 6, n. 5, p. 551-66 2011.

YAJIMA, T.; KNOWLTON, K. U. Viral myocarditis: from the perspective of the virus. *Circulation*, v. 119, n. 19, p. 2615-24 2009.

YANG, K. D.; YEH, W. T.; YANG, M. Y.; CHEN, R. F.; SHAIQ, M. F. Antibody-dependent enhancement of heterotypic dengue infections involved in suppression of IFN γ production. *J Med Virol*, v. 63, n. 2, p. 150-7 2001.

YAUCH, L. E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res*, v. 80, n. 2, p. 87-93 2008.

YEN, Y. T.; CHEN, H. C.; LIN, Y. D.; SHIEH, C. C.; WU-HSIEH, B. A. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol*, v. 82, n. 24, p. 12312-24 2008.

ZANOTTI-CAVAZZONI, S. L.; GUGLIELMI, M.; PARRILLO, J. E.; WALKER, T.; DELLINGER, R. P.; HOLLENBERG, S. M. Fluid resuscitation influences cardiovascular performance and mortality in a murine model of sepsis. *Intensive Care Med*, v. 35, n. 4, p. 748-54 2009.

ZHANG, X. H.; LI, G. R.; BOURREAU, J. P. The effect of adrenomedullin on the L-type calcium current in myocytes from septic shock rats: signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 293, n. 5, p. H2888-93 2007.

ZHONG, J.; HWANG, T. C.; ADAMS, H. R.; RUBIN, L. J. Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from endotoxemic guinea pigs. *Am J Physiol*, v. 273, n. 5 Pt 2, p. H2312-24 1997.

VIII. ANEXO

**Artigo desenvolvido durante o mestrado em colaboração submetido para
publicação na PLoS Neglected Tropical Diseases**