



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

---



**PERFIL DE CITOCINAS NO SORO  
DE PACIENTES COM DENGUE EM UM INSTITUTO  
DE REFERÊNCIA EM MANAUS**

**MARIA RAIKA GUIMARÃES LOBO**

Orientador: Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos  
Co-Orientadora: Professora Doutora Lúcia de Paula

Manaus – AM  
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



---

**MARIA RAIKA GUIMARÃES LOBO**

**PERFIL DE CITOCINAS NO SORO  
DE PACIENTES COM DENGUE EM UM INSTITUTO  
DE REFERÊNCIA EM MANAUS**

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia Básica e Aplicada  
da Universidade Federal do Amazonas,  
como requisito para obtenção de título de  
Mestre.

Orientador: Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos

Co-Orientadora: Professora Doutora: Lúcia de Paula

Manaus – AM

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E  
APLICADA**

**MARIA RAIKA GUIMARÃES LOBO**

**PERFIL DE CITOCINAS NO SORO  
DE PACIENTES COM DENGUE EM UM INSTITUTO  
DE REFERÊNCIA EM MANAUS**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Mestrado em sessão pública realizada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Presidente: Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Assinatura: \_\_\_\_\_

Examinador (a): Professor (a): Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Instituição: Universidade Estadual Paulista- UNESP- Ribeirão Preto

Assinatura: \_\_\_\_\_

Examinador (a): Professor (a): Prof. Dr. Cristovão Alves da Costa

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

*“Procuremos não ser como as nuvens”...  
que o vento leva para onde quer...  
(Jander Mafra poeta amazonense)*

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabalho  
à memória da minha amada mãe, Waldira Brasil Guimarães  
retrato fiel do esforço, dedicação  
e amor incondicional, que mesmo sem condições primou por nos direcionar  
no caminho do saber... Mãe eu sei o quanto você lutou muito por mim e por nossa  
família! Comemora comigo ai do céu...essa vitória é sua!*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus que por seu infinito amor, permitindo-me concluir esse trabalho e subir mais um degrau na escada do conhecimento.*

*Agradeço a minha família e aos meus amados irmãos: Maria José Guimarães Lobo, Maria do Socorro Brasil Guimarães, Sebastião Emanuel Brasil Guimarães, Julio Guimarães Lobo Julio Cesar Mendes Brasil e Maria Shopia Guimarães, por todos os momentos de alegrias, lutas, e companheirismo. É de cada um de vocês essa vitória!!!*

*Ao Prof Dr. Fernando Marques que aceitou esse desafio de orientar esse trabalho provando que podemos superar barreiras, ditas como intransponíveis.*

*A Profa Dra. Lúcia de Paula que questionou e contribuiu com seus ensinamentos.*

*Aos queridos amigos e irmãos de luta e de coração: Silvania Furtado, Maria Inês Braga, Jarbas de Paula, Lilian Merini, Jaime Galvão, Luiz Boechat, Dayla Pontes e Flavio Souza por cada um dos momentos de auxílio e socorro durante essa longa caminhada.*

*As minhas queridas amigas/irmãs Lidiane Gomes e Maria Emilia Santos por todas aquelas vezes que vocês nunca deixaram de acreditar que eu conseguiria.*

*As queridas Márcia Poinho, Helaine Virgolino e Conceição Flores três anjos que Jesus colocou no meu caminho.*

*Aos queridos Super Power Amigos: Alysson Sena e Babbygthon Khell sem vocês eu jamais teria conseguido chegar até aqui.*

*Ivanete Sampaio, Joao Vicente, Erica Simplício pessoas amáveis que sempre me ajudaram nessa luta.*

*A Dra. Michele Bastos minha professora querida e a Dra. Maria Paula Gomes Mourão meus exemplos de pesquisadoras.*

*Aos colegas da Pós Graduação Alysson Guimaraes, Andrea Taragô, Maysa Porto, Crhistina Briglia, e a todos que direta e indiretamente participaram da consolidação deste trabalho.*

## RESUMO

A dengue é uma doença considerada como problema de saúde pública no Brasil. São conhecidos quatro sorotipos virais: 1, 2, 3 e 4, que são denominados de DENV 1, 2, 3 e 4. No Brasil todos os sorotipos estão circulantes e são capazes de causar doença ao homem, podendo evoluir para quadros graves, inclusive óbito. A transmissão da dengue ocorre exclusivamente pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* que se desenvolve amplamente em países tropicais e subtropicais. A resposta imunológica ao vírus da dengue (DENV) e seus sorotipos, ainda não está totalmente elucidada. Recentemente foi demonstrado aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes infectados com DENV-2, entre os quais foram observados altos níveis séricos de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17. No entanto, o papel das citocinas na resposta Th1, Th2 e Th-17 na dengue ainda é pouco compreendido. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi traçar o perfil de citocinas no soro de pacientes com dengue na cidade de Manaus. Este estudo foi retrospectivo de caráter transversal com componente analítico de casos de pacientes atendidos durante a epidemia de dengue na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT / HVD) no período de Janeiro a Dezembro de 2011, bem como controles oriundos da Fundação (FHEMOAM). Foram utilizadas 90 amostras de soro, sendo 60 de pacientes com dengue e 30 de indivíduos separados em: Grupo I: controle negativo – doadores de sangue (n= 30), Grupo II: controle positivo 1 DENGUE NÃO GRAVE (n= 30) e Grupo III: controle positivo 2 DENGUE GRAVE (n= 30). O diagnóstico foi feito por isolamento viral da proteína NS1, sorologia para dengue IgM, e finalmente o RT-PCR. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Amazonas UFAM sob parecer nº 256.163 via CONEP. As dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL17A foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo (kit CBA da *BD® Biosciences*). A comparação de médias dos níveis séricos de citocinas foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Os gráficos foram elaborados utilizando o software Graphprisma®. Em todas as citocinas quantificadas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A e TNF- $\alpha$ ) foi possível avaliar que os grupos de dengue (grave e não grave) apresentaram concentrações aumentadas e estatisticamente significativas em relação ao grupo controle negativo. Não houve diferença entre as citocinas quando comparados o grupo de dengue grave com o de dengue não grave. Este estudo, pioneiro nessa linha na Região Norte, possibilitou identificar o perfil de um grupo de citocinas e inferir no seu envolvimento/relação na resposta imunológica aos sorotipos circulantes em Manaus no ano de 2011. Observando isoladamente o comportamento da citocina IL-10, houve tendência no seu aumento no grupo composto por pacientes que evoluíram para dengue grave quando comparado ao grupos dengue não grave.

Palavras-chave: dengue, febre da dengue, citocinas, resposta imune

## ABSTRACT

Dengue disease is a serious public health problem in Brazil. There are four serotypes, DENV 1 to 4. In Brazil, all serotypes are circulating and are able to cause disease to humans, and may progress to a severe level, including death. Dengue transmission occurs by the bite of the female mosquito *Aedes aegypti*, widely distributed in tropical and subtropical countries. Brazil underwent a major epidemic in 1955 after which the disease was considered eradicated, causing disinterest among the medical community. The objective of this project was to trace the profile of cytokines in serum from patients with dengue in the city of Manaus. The immune response to dengue virus (DENV) and their serotypes has not yet been fully elucidated. Recently, studies demonstrated increased proinflammatory cytokines in patients infected with DENV-2, as IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-17. However, the role of cytokines in the immune response Th1, Th2 and Th17 in dengue disease is still poorly understood. Tropical countries such as Brazil are conducive to a proliferation of vectors making it necessary to investigate the cytokine profile in the serum of patients with dengue, especially in a locality like Manaus. This study was a retrospective cross-sectional analytical component with cases of patients seen during the dengue epidemic in the Tropical Medicine Foundation of Amazonas Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT / HVD) in the period of January to December 2011, as well as negative controls from the Foundation of Hematology and Hemotherapy of the State of Amazonas (FHEMOAM). There were 90 serum samples, 60 from patients with dengue and 30 control patients divided into: Group I: negative control - blood donors (n = 30), Group II: positive control - DENGUE NOT SEVERE (n = 30) and Group III: positive control DENGUE SEVERE (n = 30). The diagnosis was made by viral protein NS1, dengue IgM serology, and finally the RT-PCR. The project was approved by the Ethics Committee of the Universidade do Amazonas (UFAM), n. 256-163 - CONEP. The dosages of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL17A were performed by flow cytometry (BD CBA Kit  $\text{\textcircled{R}}$  Biosciences). We used the nonparametric Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). The graphics were designed using Graphprisma  $\text{\textcircled{R}}$  software. In all quantified cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-17A and TNF- $\alpha$ ) it was possible to evaluate that in dengue groups (severe and non-severe) they had concentrations increased and statistically significant when compared to the negative control group. There was no difference in these cytokines when comparing the severe and not severe groups. Observing the behavior of cytokine IL-10, there was a trend in increase when comparing patients from dengue group who progressed to severe dengue. This pioneer study in this field in the northern region enabled us to identify the profile of a group of cytokines and infer their involvement in the immune response in circulating serotypes in Manaus in 2011.

*Keywords:* dengue, dengue fever, cytokines, immune response

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Modelo esquemático do vírus da dengue (DENV-2) através de microscopia.....	19
<b>Figura 02</b> – Número de óbitos e incidência habitante/ano.....	21
<b>Figura 03</b> - Número de óbitos e incidência habitante/ano.....	22
<b>Figura 04</b> - Esquematização do ciclo de transmissão da dengue.....	23
<b>Figura 05</b> - Classificação dos níveis de severidade da dengue sugeridos: Explicação do diagrama.....	26
<b>Figura 06</b> - Esquema ilustrativo da resposta imunológica.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIT- Citocina

DENV - Vírus da Dengue

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PNMPC – Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF – Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

IFN – Interferon - $\gamma$

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01** - Perfil do comportamento da citocina IL-10, comparando os grupos dengue não grave, dengue grave, e controle negativo.....42
- Gráfico 02** - Perfil do comportamento das citocinas : IL-2, IFN-  $\gamma$ , IL-4 e IL-17A. Comparando os grupos dengue não grave (DNG) dengue grave (DG) e controle negativo (CN).....45
- Gráfico 03** - Perfil do comportamento das citocinas: TNF- $\alpha$  e IL-6 Comparando os grupos dengue não grave (DNG) dengue grave (DG) e controle negativo (CN).....46

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 A doença.....	16
2.2 O Vírus .....	16
2.3 Epidemiologia.....	17
2.3.1 Epidemiologia da Dengue no Brasil.....	18
2.3.2 Epidemiologia da Dengue em Manaus .....	20
2.4 Vetores e Formas de contato .....	21
2.5 Sinais e Sintomas.....	22
2.6 Classificação da Dengue.....	23
2.7 Respostas Imunológicas ao vírus da Dengue .....	25
2.8 Citocinas das respostas Th1, Th2 e Th17 .....	27
2.8.1 Interleucina – 2 (IL-2) .....	28
2.8.2 Interleucina – 4 (IL-4) .....	28
2.8.3 Interleucina – 6 (IL-6) .....	29
2.8.4 Interleucina – 17A (IL-17A) .....	29
2.8.5 Interleucina – 10 (IL-10) .....	30
2.8.6 Interleucina IFN- $\gamma$ .....	30
2.8.6 Interleucina TNF- $\alpha$ .....	31
3 JUSTIFICATIVA .....	32
4 OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivo Geral .....	33
4.2 Objetivos Específicos .....	33

5 MATERIAIS E MÉTODOS: .....	34
5.1 Modelos do Estudo .....	34
5.2 População do Estudo .....	34
5.2.1 Pacientes com dengue.....	34
5.2.2 Elegibilidade das amostras .....	35
5.2.3 Indivíduos controle .....	35
5.2.4 Informações Éticas .....	36
5.2.5 Critérios de Inclusão.....	36
5.2.6 Critérios de Exclusão.....	36
5.3 Processamentos das amostras .....	37
5.4 Análises Estatística.....	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
7 CONCLUSÃO.....	46
8 REFERÊNCIAS .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma arbovirose que apresenta destaque mundial. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas, principalmente as que residem em áreas tropicais e subtropicais do planeta, estão ameaçadas de infectar-se por esta doença (WORLD, 2012).

O agente causador da doença é o vírus da dengue (DENV) agrupados em quatro sorotipos antigenicamente relacionados, mas distintos entre si e nomeados em DENV-1, 2, 3 e 4, a infecção primária causada pela exposição a um dos sorotipos não confere imunidade contra os outros (GUBLER, 1998).

Em relação à resposta imunológica ao DENV, a mesma delimita uma linha tênue, uma vez que o entendimento da sincronia dos eventos que buscam debelar a infecção e vencer o patógeno ainda está em constantes estudos. O esclarecimento de que a imunidade a um dado sorotipo viral promove ótima proteção contra reinfeção por este sorotipo já está consolidada na literatura. No entanto, a infecção subsequente por outro sorotipo, exacerba o risco para as formas graves da infecção, marcadas por uma permeabilidade vascular anormal, evolução para choque e até mesmo o óbito.

A primeira epidemia de dengue no Brasil, com o isolamento do vírus, ocorreu em 1981, no estado de Roraima, quando o DENV-1 e DENV-4 foram identificados (OSANAI; ROSA et al., 1983).

A cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas, com quase 2 milhões de habitantes, está localizada no meio da floresta amazônica e sofreu surtos de dengue a partir de 1998, quando um grande surto aconteceu pela primeira vez em que cerca de 20 mil casos, causados pelo sorotipo 1 (FIGUEIREDO; THATCHER et al., 2004).

No final do mesmo ano, o sorotipo 2 foi detectado pela primeira vez nesta cidade e em 2001, o DENV-2 produziu o segundo grande surto com 30.000 casos notificados, incluindo 60 casos de dengue hemorrágica (FIGUEIREDO; BASTOS et al., 2002). O sorotipo 3 foi detectado em Manaus em 2002 e desde então, durante a estação chuvosa vem sofrendo surtos com o aumento do número de casos graves, principalmente em crianças (ROCHA; TAUILL, 2009). Em janeiro de 2008, o sorotipo 4 foi detectado outra vez no Brasil, na cidade de Manaus após um lapso de 26 anos (DE FIGUEIREDO; NAVECA et al., 2008).

Seguindo uma tendência de aumento da dengue no Brasil, nos primeiros meses de 2011, um novo surto de dengue começou na capital do Amazonas, com quase 40.000 casos, afetando os moradores de todas as regiões da cidade com gravidades distintas (BASTOS; FIGUEIREDO et al., 2012). Neste caso, a situação da cidade de Manaus pode ser considerada preocupante uma vez que foi a única cidade brasileira à identificar infecções com vírus da dengue 1, 2, 3 e 4 e um caso de co-infecção com o vírus da dengue 2 e 3 (FIGUEIREDO; MOURÃO et al., 2013).

Os mecanismos que elencam a resposta imunológica ao DENV ainda não estão totalmente elucidados, uma vez que esses eventos dispõem de peculiaridades dos envoltórios de populações celulares, citocinas, leucotrienos e prostaglandinas que ainda estão em processo de estudos. A fim de compreender tal fato é importante traçar o perfil de citocinas das respostas Th1, Th2 e Th17 nos casos de dengue grave e não grave oriundo do surto ocorrido em Manaus no ano de 2011, onde todos os sorotipos estavam circulando ao mesmo tempo, o que poderia denotar um referencial de gravidade para os habitantes de nossa cidade.

Neste estudo foram avaliadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17A as quais compõem os diversos perfis de respostas imunológicas a fim de avaliá-las nos quadros de dengue grave e dengue não grave.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A doença

A dengue é uma doença transmitida por artrópodes que apresenta distribuição mundial, tendo maior incidência nos centros urbanos das regiões tropicais e subtropicais (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÈS et al., 2005).

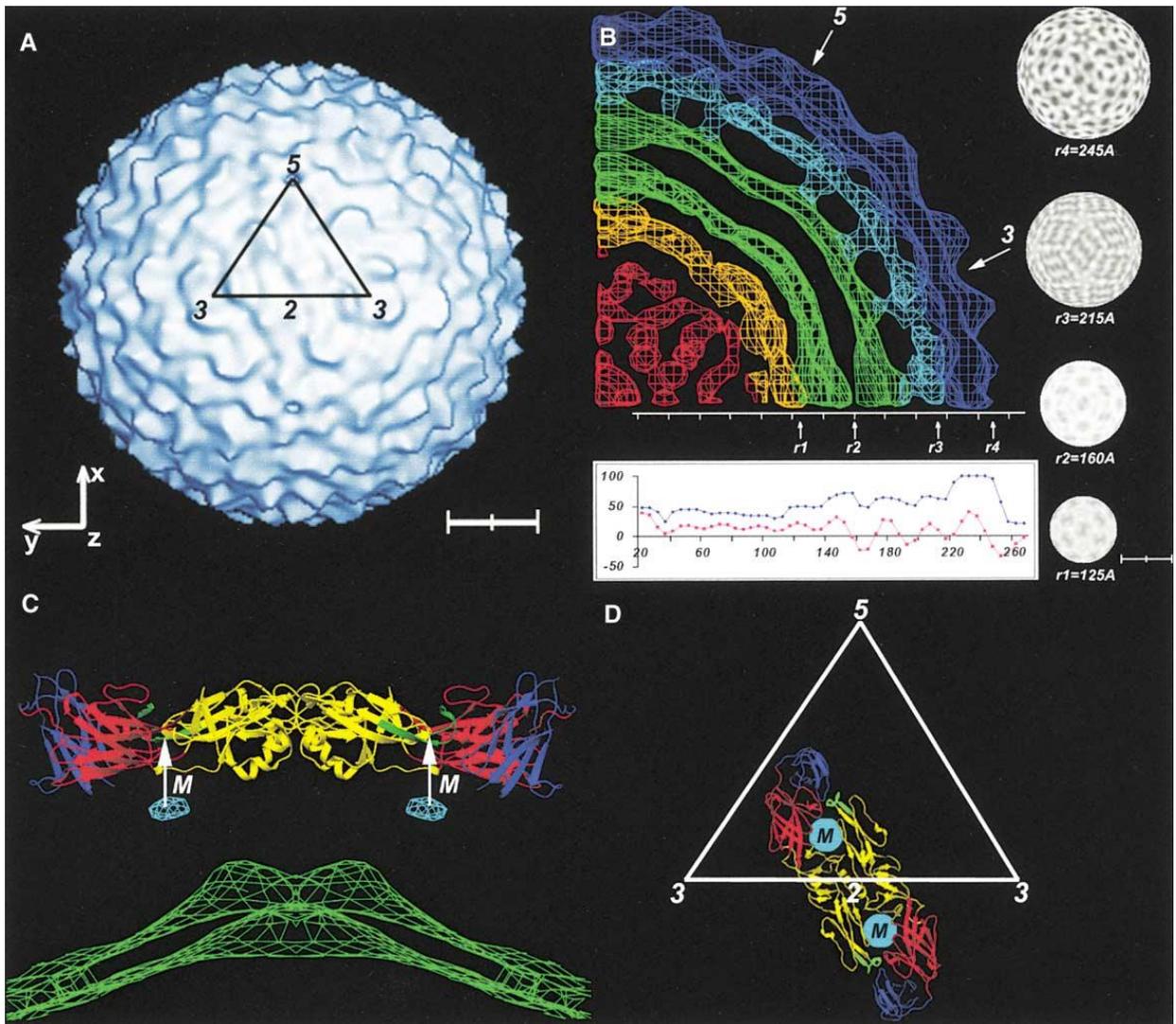
Classificada como a doença emergente e reemergente mais importante em morbidade e mortalidade na atualidade, sem perspectiva de mudança em futuro próximo, onde 55% da população mundial está sob-risco de contrair essa enfermidade (TAUIL, 2008).

Trata-se de uma doença infecciosa aguda, que apresenta formas polissintomáticas, com quadros clínicos que podem evoluir desde o choque, hemorragias até o óbito (ROCHA; TAUIL, 2009). Esses sinais e sintomas podem variar de acordo com o vírus circulante ou a epidemia instalada, apresentando características distintas tendo em vista as peculiaridades de cada região afetada (FIGUEIREDO; OWA et al., 1992).

### 2.2 O Vírus

O DENV é um vírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Corresponde a um vírus RNA de cadeia simples, agregado em sentido positivo com arcabouço antigênico e simetria icosaédrico. Apresenta um envelope lipídico associado a proteínas de membrana e espículas glicoproteicas. O genoma viral codifica três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C) e proteínas de envelope, pré-M, precursora da proteína de membrana (M) e (E) e ainda, sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4A, NS4B, e NS5 (LEITMEYER; VAUGHN et al., 1999).

São conhecidos quatro sorotipos: DENV-1, 2, 3 e 4, destes, cada um apresenta grau de especificidade, com características filogenéticas distintas, sendo que todos os sorotipos podem causar doença. Na figura 01 pode-se observar a estrutura do vírus DENV-2.



**Figura 01** - Modelo esquemático do vírus da dengue (DENV-2) através de microscopia crioelétrica (crio-EM). (A) representação da superfície do DENV-2, mostrando o contorno de uma assimetria icosaedral; (B) secção transversal central mostrando a densidade de crio-EM com um enredo de densidade média (roxo) e máxima (azul). As setas indicam a posição dos eixos de 5 vezes e de 3 vezes. Mostrado também cortes radiais na densidade dos raios definido, R1, R2, R3 e R4. (C) desenho da fita do dímero E situado em um eixo 2 vezes icosaedral. O folheto externo da bicamada lipídica é mostrado em verde. Os peptídeos de fusão estão em verde. (D) desenho da fita que mostra a posição e orientação do dímero associados a um eixo de 2 vezes icosaédrica. **Fonte:** Adaptado de (KUHN; ZHANG et al., 2002).

### 2.3 Epidemiologia

Os primeiros relatos históricos sobre dengue reportam-se a Ilha de Java na Indonésia, em 1779 e Filadélfia (EUA), em 1780, como locais dos primeiros casos. Porém, existem algumas evidências de que quadros semelhantes à doença tenham ocorrido na China desde o ano de 992. Desde esta época o mosquito transmissor e o vírus do dengue podem ter se disseminado pelos trópicos, em virtude da navegação e do comércio marítimo, ocorridos nos séculos XVIII e XIX (GUZMÁN; KOURI, 2002).

Estima-se que em todo o mundo 2,5 bilhões de pessoas, estejam em risco de adquirir a doença, e destas, 50 milhões são infectadas a cada ano, incluindo 500.000 mil hospitalizações por dengue hemorrágica especialmente em crianças, onde em média 2,5 % evoluem a óbito (TAUIL, 2008; GUZMAN; HALSTEAD *et al.*, 2010).

A infecção viral é apontada como uma das maiores causadoras de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, destacando países do Sul e Sudeste da Ásia, Américas Central e do Sul (LAN; HIRAYAMA, 2011).

### 2.3.1 Epidemiologia da Dengue no Brasil

A primeira epidemia de dengue no Brasil com confirmação laboratorial ocorreu em Boa Vista (RR) entre 1981-1982 sendo que nesta ocasião foram isolados os sorotipos 1 e 4 (TRAVASSOS DA ROSA; ROCHA *et al.*, 1982).

A partir de 1982 com campanha intensiva de combate ao vetor, não se reportou epidemia até 1999. Só então os índices de incidência estiveram entre os maiores do país, com circulação dos sorotipos 1 e 2 o que caracteriza o Estado como hiperendêmico, uma condição crítica para a ocorrência de febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD) (GUBLER, 1998).

O Estado de Roraima faz fronteira com a Guiana (à nordeste) e com a Venezuela (à noroeste), sendo considerado uma possível porta de entrada para novos sorotipos e genótipos de dengue no Brasil. De acordo com dados da Organização Pan-Americana de Saúde, atualmente circulam os quatro sorotipos de

dengue na Venezuela, por onde pode ocorrer a reintrodução do sorotipo 4 (DA SILVA CORDEIRO, 2008).

A figura 02 mostra que de 2001 a 2011 o Ministério da Saúde registrou uma incidência crescente de casos de dengue no Brasil e que a partir de 2005, observou-se um decréscimo no ano de 2009. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), no ano de 2010 foram registrados os maiores índices de mortalidade relacionados à dengue no país, onde a incidência alcançou 530 casos para cada 100.000 habitantes.



**Figura 02** – Número de óbitos e incidência habitante/ano – casos dengue. 5.570 Municípios – total de habitantes: 193.976.530.

**Fonte:** Sinan/SIM/IBGE – MS, 2012 <http://189.28.128.178/sage/> Acesso em 03/07/2013.

De acordo com dados do Ministério da Saúde foram notificados no Brasil 715.666 casos de dengue até julho de 2011 sendo que a Região Norte apresentou 110.711 casos, representando 15% do número total de casos registrados. Os municípios de Manaus (AM) e Rio Branco (AC) apresentam os maiores números de casos notificados, com 49.259 e 19.998 casos, respectivamente. Esses dois municípios foram responsáveis por 62,5% dos casos notificados na Região Norte (SAÚDE, 2011).

### 2.3.2 Epidemiologia da Dengue em Manaus

A primeira epidemia de dengue na cidade de Manaus ocorreu em 1998, que transcorreu por conta do sorotipo DENV-1, chegando à notificação de 13.894 casos. Ao final do ano 2000, foram identificados os primeiros casos pelo DENV-2, desencadeando em 2001, uma epidemia de grandes proporções, com o registro de 19.927 casos, com circulação simultânea também do vírus DENV-1. Nesse mesmo ano, detectou-se a presença de formas graves da doença, com 52 casos confirmados de Febre Hemorrágica da Dengue e ocorrência de um óbito (BASTOS, 2004).

Houve significativa redução no número de casos durante os anos de 2002 e 2003, com 2.063 e 3.554 casos respectivamente, embora tenha se registrado a introdução do sorotipo DENV-3. A partir de 2004, o número de casos notificados manteve-se baixo, com menos de 1.000 casos anuais. Em 2008, ocorreu um aumento significativo com registro de 8.633 casos notificados, porém em 2009, houve uma redução de 85,2% em relação ao ano de 2008, registrando 1.279 casos notificados. Embora tenha ocorrido redução dos casos, a capital do Estado vem sendo considerada, nos últimos anos, como área de alto risco para o desenvolvimento de epidemia de dengue, em decorrência da grande susceptibilidade da população à infecção e à presença do vetor, que pelas condições ambientais locais encontra situação ideal para a sua procriação (DE FIGUEIREDO; NAVECA et al., 2008).

A figura 03 mostra uma incidência crescente de casos de dengue a partir de 2006, com destaque para os anos de 2008 e 2011. Nestes anos a cidade de Manaus apresentou 187 e 2.953 casos para cada 100.000 habitantes, respectivamente, demonstrando um aumento significativo na incidência de dengue no ano de 2011 em relação ao Brasil.



**Figura 03** - Número de óbitos e incidência habitante/ano - dengue. Localidade: Manaus/ AM (capital) – 1.861.838 habitantes.

**Fonte:** Sinan/SIM/IBGE–MS, 2012 <http://189.28.128.178/sage/> Acesso em 03/07/2013.

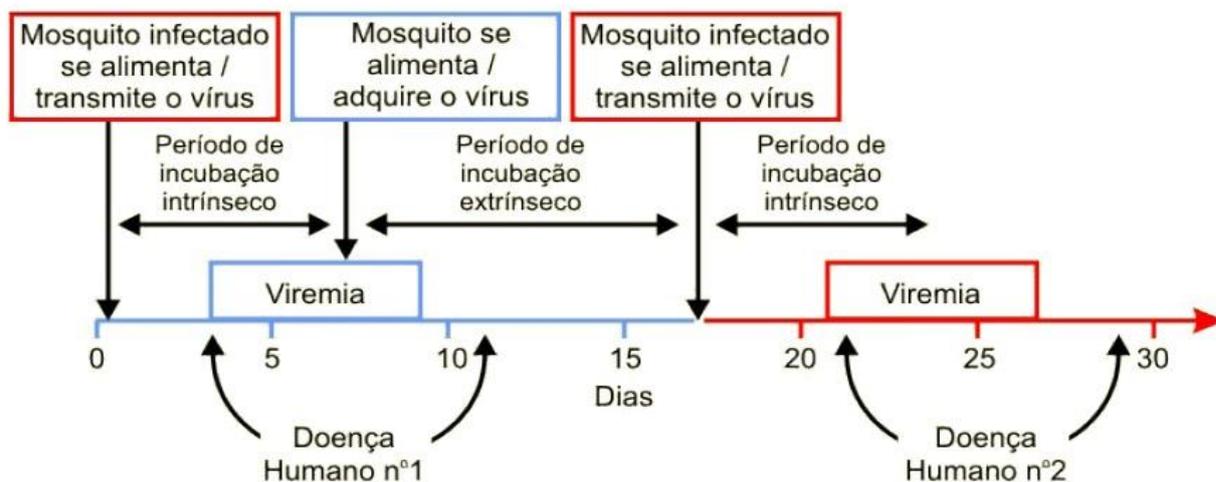
#### 2.4 Vetores e Formas de contato

O principal vetor responsável pela transmissibilidade da doença é o mosquito *Aedes aegypti*, da ordem *Diptera*, subordem *Nematocera*, família *Culicidae*, que contém inúmeros gêneros, entre eles o *Flavivirus*, maioria representada por espécies de hábito hematófago (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Trata-se de uma espécie amplamente distribuída nas regiões tropicais e totalmente adaptada ao meio urbano. O mosquito adquire o vírus ao se alimentar do sangue de doente que se encontra na fase de viremia, a qual começa um dia antes do surgimento da febre e vai até o sexto dia de doença. O vírus se instala nas glândulas salivares do mosquito, onde se prolifera e aí permanece, deixando o artrópode infectante durante toda a sua vida (DA SILVA CORDEIRO, 2008).

Apontado como vetor secundário o *Aedes albopictus* contribui para a transmissão do DENV (KNUDSEN, 1995; LAMBRECHTS; SCOTT et al., 2010), sobretudo em áreas onde o *A. aegypti* encontra-se ausente como nas regiões que vão desde a China até o Japão (HOTTA, 1998).

Na figura 04 é possível verificar o ciclo de desenvolvimento da dengue, destacando cada uma das fases dos períodos de viremia.



**Figura 04-** Esquemática do ciclo de transmissão da dengue.  
**Fonte:** Adaptado Manual de Dengue do Ministério da Saúde 2011.

## 2.5 Sinais e Sintomas

O quadro infeccioso causado pela dengue pode manifestar-se através de diversas formas, podendo evoluir de estágios brandos, não aparentes, até formas hemorrágicas, tais como o choque e até mesmo o óbito (SAÚDE, 2011 Brasília/DF).

Em se tratando de dengue clássica, a febre alta (39° a 40 °C) apresenta-se geralmente de início súbito, sendo apontada como a primeira manifestação, seguida de cefaléia, prostração, mialgia, artralgia, dor retro-orbitária, exantema maculopapular, que pode ou não ser acompanhado de prurido. As demais manifestações tais como: anorexia, náuseas, vômitos e diarreia podem ou não serem observadas. Porém podem ocorrer algumas manifestações graves que podem caracterizar quadros hemorrágicos, tais como: epistaxe, petéquias, gengivorragia, metrorragia, todos ocorrendo no final do quadro febril e em casos raros, hematêmese, melena e hematúria, além de trombocitopenia (contagem de

plaquetas menor que  $100.000\text{mm}^3$ ) entre o terceiro e o sétimo dia após a infecção (SAÚDE, 2011 Brasília/DF).

Em crianças pode ocorrer febre indeterminada, ou febre associada à mialgia, dor retro-orbital, e como alteração hematológica importante observa-se a leucopenia, acompanhada ou não de erupções cutâneas. Estas alterações podem ou não estar acompanhadas de petéquias e manifestações hemorrágicas (TORRES, 2006).

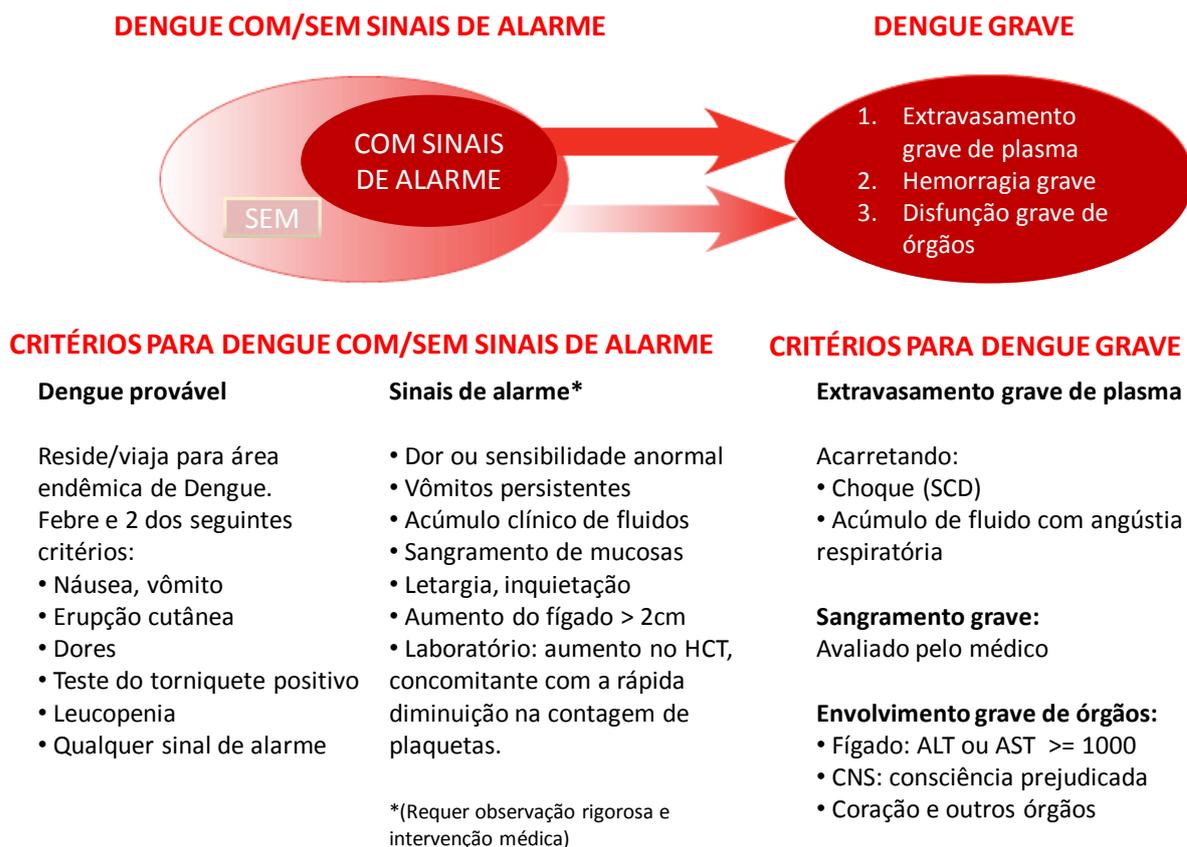
A gravidade na dengue se traduz essencialmente pela presença de um ou mais dos sinais de ameaça, estes indicam a possibilidade de um paciente evoluir para um quadro de gravidade, entre eles destacamos: Dor abdominal intensa e contínua; vômitos persistentes; hipotensão postural ou lipotimia, hepatomegalia dolorosa; hemorragias importantes (hematêmese, melena e metrorragia); sangramento de mucosa; sonolência ou irritabilidade; diminuição da diurese, ou ainda a diminuição repentina da temperatura ou hipotermia ( $<35^{\circ}\text{C}$ ); aumento repentino do hematócrito; queda abrupta das plaquetas; desconforto respiratório e manifestações neurológicas (convulsão, paresia, alteração da consciência) (MOURÃO, 2011).

## 2.6 Classificação da Dengue

A dengue é uma doença que pode apresentar-se com diversas formas de evolução e manifestações graves e não graves. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dengue possui amplo espectro de apresentações clínicas, frequentemente com evolução e desfechos imprevisíveis. Enquanto a recuperação da maioria dos pacientes segue um curso clínico autolimitado, uma pequena proporção evolui para a doença severa, geralmente caracterizada por extravasamento de plasma com ou sem hemorragia. Nestes casos, é necessária terapia intravenosa para reidratação com intuito de reduzir a frequência de casos fatais para menos de 1% dos casos graves (WHO, 2009).

A figura 05 foi adaptada e traduzida da Organização Mundial de Saúde-OMS, que publicou no ano de 2009 novos critérios que determinam a gravidade para dengue. A OMS descreve a nova classificação em dengue grave e dengue não grave de acordo com sinais e sintomas, modificando a antiga classificação onde a

dengue era caracterizada como síndrome do choque da dengue e dengue hemorrágica. Essa mudança oportunizou aos serviços de saúde o melhoramento no atendimento aos casos de dengue.



**Figura 05-** Classificação sugerida dos níveis de severidade da dengue: diagrama traduzido na íntegra.

**Fonte:** Adaptado de Manual de Dengue (WHO, 2009).

Infecções sintomáticas pelo vírus da dengue estão agrupadas em três categorias: febre indeterminada, febre da dengue e febre hemorrágica da dengue. A febre hemorrágica da dengue foi ainda sub-classificada em 4 graus de gravidade, com os graus III e IV sendo definidos como síndrome do choque da dengue. Atualmente a classificação amplamente empregada é: febre da dengue, febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue (WHO, 2009).

Todos os sorotipos (DENV-1 a 4) pode causar infecção e esta pode evoluir para os quadros de dengue grave, antigamente classificado como febre hemorrágica da dengue / síndrome de choque da dengue hemorrágica (DHF/SCD), caracterizada por coagulopatia, aumento da fragilidade vascular, e da perda de fluido por permeabilidade capilar que pode evoluir para choque hipovolêmico e até o óbito (GUZMAN; ALVAREZ et al., 2013).

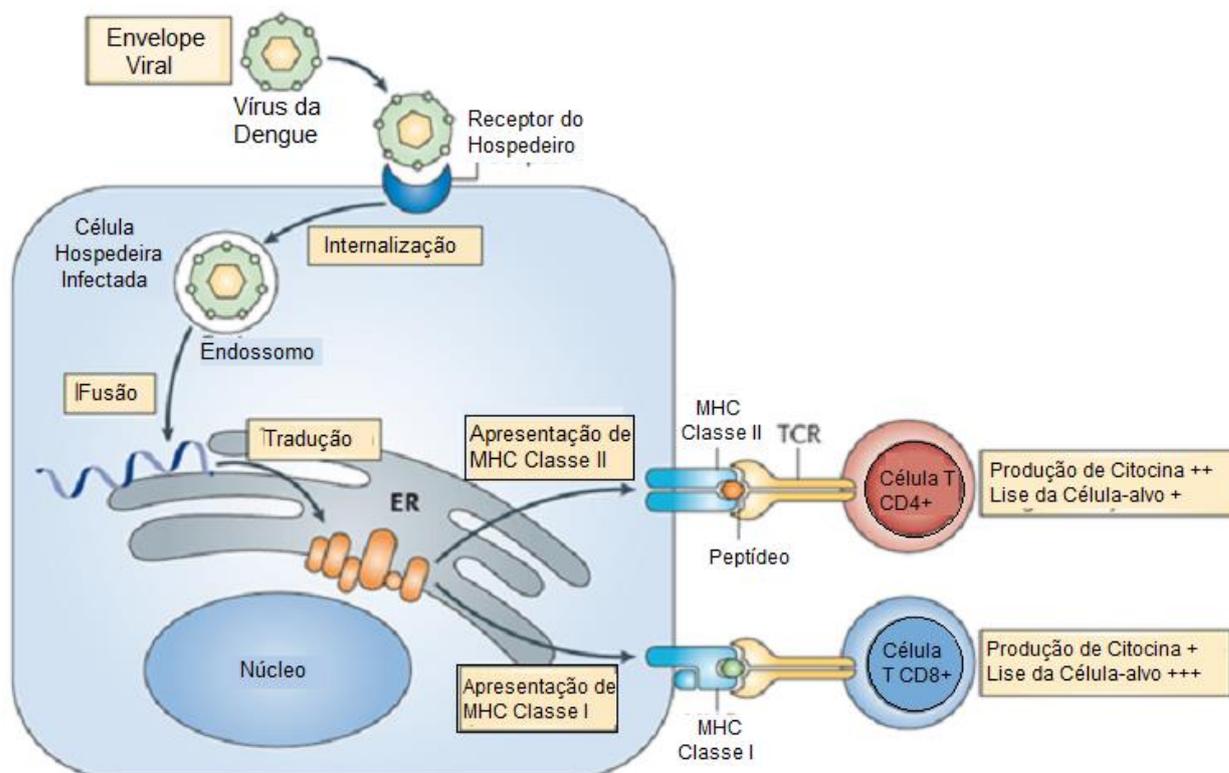
Um estudo clínico prospectivo multicêntrico realizado pela OMS sobre as regiões endêmicas da dengue foi iniciado para coletar evidências sobre os critérios para a classificação da dengue em níveis de severidade. Os achados deste estudo confirmaram que, utilizando um conjunto de parâmetros clínicos e/ou laboratoriais, houve visível diferença entre pacientes com dengue grave e dengue não grave. Por isso, por motivos práticos o grupo maior de pacientes com dengue não grave foi subdividido em dois subgrupos – pacientes com ou sem sinais de alerta (WHO, 2009).

## 2.7 Respostas Imunológicas ao vírus da Dengue

Os mecanismos imunológicos e moleculares envolvidos na patogênese da dengue ainda não estão completamente elucidados. Acredita-se que a dengue hemorrágica ocorra mais frequentemente em pacientes previamente infectados com DENV, e que, uma infecção posterior à sensibilização antigênica, resulte no aumento da ativação de monócitos e linfócitos T e conseqüentemente aumente a produção de mediadores vasoativos que possam desencadear complicações hematológicas graves.

O vírus da dengue é endocitado principalmente por macrófagos, células dendríticas e monócitos e em seguida, ocorre o rearranjo do material genético no retículo endoplasmático rugoso. Após a clivagem os vírions imaturos são transportados pela via secretora para o complexo de Golgi. Em seguida, ocorre a redução do pH que desencadeia o rearranjo das proteínas estruturais levando a liberação das partículas virais maduras por exocitose (ROTHMAN, 2011).

A figura 06 resume esquematicamente o processo de internalização, processamento e apresentação do vírus da dengue após a infecção.



**Figura 06** - Esquema ilustrativo da resposta imunológica ao vírus da dengue  
**Fonte:** Adaptado de (ROTHMAN, 2011).

O processo de resposta imunológica tem início com a elevação dos níveis séricos de citocinas liberadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T (LT) auxiliares ativados. Observam-se altos teores séricos de interleucina-2 (IL-2) e de seu receptor solúvel, de CD4 solúvel, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) que se mantêm elevado até a convalescença, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de ativação de plaquetas (PAF) também estão expressivamente presentes (FIGUEIREDO, 1999).

Nas doenças de origem viral e que cursam com quadros agudos, como é o caso da dengue a exacerbação do quadro clínico pode estar intimamente ligado a liberação de citocinas entre elas IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$  e de metabólitos derivados do ácido araquidônico e óxido nítrico (NO), os quais estão envolvidos nos mecanismos iniciais

da patogênese da dengue. Observou-se que os pacientes acometidos com FHD, na fase aguda da doença, apresentaram aumento no número de monócitos, produtores de citocinas pró-inflamatórias, entre elas TNF- $\alpha$  e IL-10 (ABBAS; LICHTMAN et al., 2008).

Além da via clássica de penetração do vírus da dengue na célula pela interação de proteínas virais com receptores celulares das células alvo, os vírus podem também entrar nas células quando estão complexados com anticorpos subneutralizantes. Os complexos vírus/anticorpos são reconhecidos e penetram nas células, via receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R). Esta forma de aumentar a infecção viral pela ligação do vírus a anticorpos é observada para vários vírus, incluindo o DENV (YOUNG, 2001).

Este mecanismo pode ter um papel central na infecção de DENV e poderia ser uma explicação para as manifestações clínicas mais graves observadas durante infecções secundárias por sorotipos diferentes daquele presente na primo infecção. De fato, os anticorpos contra o DENV de um determinado sorotipo, não neutralizam vírus de sorotipos diferentes, ao contrário, levam ao aumento da infecção *in vitro* (LEE; LEI et al., 2008).

A teoria de exacerbação da resposta imune da dengue propõe que anticorpos de infecções prévias se ligam aos vírions, sem neutralizá-los, favorecendo sua entrada nas células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os monócitos. O número de monócitos infectados aumenta, e por consequência, o número de células T ativadas, também. Estas células, em conjunto sintetizam citocinas, como o IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e fator ativador de plaquetas, que em conjunto atuam na permeabilidade vascular (GUBLER, 1998).

Há evidências de que complexos imunes circulantes presentes em pacientes com FHD atuam na ativação do complemento, além de várias outras citocinas que provocam a liberação de C3a e C5a, que atuam diretamente na permeabilidade vascular (KURANE et al., 1992; ROTHMAN et al., 1999 citado por LEI et al., 2001).

## 2.8 Citocinas das respostas Th1, Th2 e Th17

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas produzidas pelas células, atuando na superfície dos receptores celulares mediando a comunicação celular. Sozinho ou dentro de uma sequência determinada, estes mediadores levam as células a responderem a um estímulo ou a modificarem sua função (DINARELLO, 2007).

#### 2.8.1 Interleucina – 2 (IL-2)

A interleucina-2 é uma citocina produzida a partir de células T e são importantes na regulação do crescimento e diferenciação de células T, células B, células assassinas naturais (NK), e células da linhagem dos monócitos após interação com seus respectivos receptores. O sistema de sinalização de IL-2R prossegue através de pelo menos três vias diferentes, que medeiam o fluxo de sinais mitogênicos e de promoção de sinais de sobrevivência (SMITH, 1988).

Como fator de crescimento de células T, a IL-2 é um potente mitógeno que consegue amplificar as respostas dos linfócitos *in vivo*. A maior função fisiológica da IL-2 é a de limitar, em vez de aumentar as respostas de células T. Este paradoxo aparente foi recentemente resolvido com a descoberta de que a IL-2 é essencial para o desenvolvimento e expansão periférica de células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, ou seja, as células que promovem a autotolerância por respostas de células T supressoras *in vivo* (BARKETT; GILMORE, 1999).

#### 2.8.2 Interleucina – 4 (IL-4)

A interleucina-4 produzida por células T helper do tipo 2, intimamente ligada a ativação de mastócitos (ABBAS; LICHTMAN et al., 2008) desempenha um papel importante no aumento tanto da produção de IgE específica como da expressão de receptores de alta e baixa afinidade à IgE por muitas células inflamatórias (FRITSCHER; SOLÉ et al., 2002).

Envolvida na resposta inflamatória, a IL-4, bem como outras citocinas, tais como IL-5 e IL-13, são responsáveis pelo início e manutenção do processo

inflamatório, nos casos onde ocorrem a infiltração eosinofílica, degranulação de mastócitos, lesão intersticial das paredes das vias aéreas e ativação de linfócitos (ROBINSON; HAMID et al., 1992).

### 2.8.3 Interleucina – 6 (IL-6)

A interleucina-6 é uma citocina que exerce atividades tanto nas respostas imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas e é considerada uma citocina pró-inflamatória (SOUZA; OLIVEIRA et al., 2008).

É possível destacar entre suas atividades a estimulação da produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T, células NK e macrófagos (OKAMURA; TSUTSUI et al., 1998). Em 2006, três estudos independentes mostraram que a combinação de duas citocinas, IL-6 e TGF- $\beta$ , eram capazes de diferenciar células T naíve em células produtoras de IL-17 (MANGAN; HARRINGTON et al., 2006; VELDHOEN; HOCKING et al., 2006; BETTELLI; KORN et al., 2008).

### 2.8.4 Interleucina – 17A (IL-17A)

A interleucina 17A é uma citocina pró-inflamatória que induz a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , NOS-2, metaloproteases e quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL5 e CXCL8) (NAKAE; SAIJO et al., 2003; KOLLS; LINDÉN, 2004). Além disso, a IL-17A é capaz de regular em camundongos a granulopoiese através do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), que por sua vez, aumenta o número de neutrófilos para o local da inflamação (STARK; HUO et al., 2005).

Diversas citocinas podem estar relacionadas à indução da resposta Th17, tais como IL-1- $\beta$ , IL-23 e IL-21, porém os resultados têm se mostrado controversos (LANGRISH; CHEN et al., 2005; ACOSTA-RODRIGUEZ; NAPOLITANI et al., 2007; KORN; BETTELLI et al., 2007; YANG; ANDERSON et al., 2008).

Embora trabalhos anteriores tenham descrito a presença de citocinas IL-17A na dengue ainda não se sabe ao certo a importância destas citocinas na imunopatogênese desta doença. Estudo realizado com pacientes africanos acometidos com o DENV-2, demonstrou aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-17, IL-6 e IFN- $\alpha$  dosadas no soro destes pacientes (PIERRE; NADIA et al., 2010).

#### 2.8.5 Interleucina – 10 (IL-10)

A IL-10 é um fator inibidor da síntese de citocinas produzidas pelas células T-helper do tipo 2. Ela exibe propriedades anti-inflamatórias, incluindo a inibição da secreção de mediadores imunes, a apresentação de antígenos, e estímulo a fagocitose e a interação da IL-10 e a replicação viral é considerado ainda especulativo, uma vez que o possível efeito patogênico pode resultar da inibição de IL-10 mediada por IFN- $\gamma$  da resposta antiviral (DUELL; TAN et al., 2012).

Atualmente a síntese de IL-10 está relacionada com numerosas células do sistema imune, incluindo as células dendríticas, os monócitos/macrófagos, as células B, células T, células natural killer (NK), neutrófilos e eosinófilos (FICKENSCHER; HÖR et al., 2002).

O que se confirma é que os números de células T estão negativamente correlacionados com níveis séricos de IL-10, enquanto que a apoptose das células T está positivamente correlacionada com os níveis de IL-10 e do dengue antes do término da febre (OLIVEIRA-PINTO et al., 2012).

#### 2.8.6 Interleucina IFN- $\gamma$

O Interferon- $\gamma$  é a principal citocina, responsável pela ativação de macrófago e suas ações estão intimamente ligadas, nos eventos tanto da imunidade inata, quanto da adaptativa, e ainda nas respostas a patógenos intracelulares. As células NK secretam IFN- $\gamma$ , em resposta à ativação aos ligantes na superfície das células hospedeiras infectadas (ABBAS; LICHTMAN et al., 2008). O IFN- $\gamma$  modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a

resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (MILLS; MCGUIRK, 2004).

#### 2.8.6 Interleucina TNF- $\alpha$

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina multifuncional que tem efeitos na inflamação, sepse, metabolismo lipídico e proteico, hematopoiese, angiogênese e resistência do hospedeiro a parasitas e tumores malignos (GORDON; GALLI, 1990).

O TNF- $\alpha$  é um importante mediador de apoptose onde a interação do receptor de TNF ao seu receptor TNF-1 (TNF-R1) ativa várias vias de transdução de sinal (WILEY; SCHOOLEY et al., 1995).

O TNF- $\alpha$  é conhecido por ser um dos mais potentes ativadores do endotélio microvascular e conseqüentemente indutor do aumento da permeabilidade capilar estando associado a mecanismos de ativação da coagulação e fibrinólise na síndrome do choque da dengue (WATI; RAWLINSON et al., 2011)

Estudos realizados por CARDIEIRA et al 2005, descrevem uma forte evidência de que o TNF- $\alpha$  é importante, mas não essencial, para a ativação do endotélio microvascular em pacientes com dengue, sugerindo que a ativação pode ser devido ao resultado dos efeitos combinados do TNF- $\alpha$  e de outros mediadores inflamatórios como o interferon-  $\gamma$ .

### **3 JUSTIFICATIVA**

O Brasil é um país de clima tropical e Manaus, em especial, configura como um lugar favorável à proliferação do vetor da dengue. Assim, faz-se necessário investigar o perfil de citocinas no soro de pacientes com dengue na cidade de Manaus-AM. A descrição deste perfil de citocinas nas respostas Th1, Th2 e no padrão Th-17 na dengue ainda é pouco compreendido e a resposta imunológica ao vírus da dengue e seus sorotipos DENV-1, 2, 3 e 4, ainda não está totalmente elucidada.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de citocinas na resposta imunológica ao vírus da dengue (DENV) no soro de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial positivo para dengue.

### 4.2 Objetivos Específicos

A) Determinar por citometria de fluxo as concentrações séricas das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A e TNF- $\alpha$  em pacientes com dengue grave e dengue não grave, bem como em indivíduos controles negativos;

B) Correlacionar os grupos de dengue grave, não grave e controle negativo em relação aos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A e TNF- $\alpha$  de forma a inferir na possibilidade de exacerbação do quadro clínico.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS:

### 5.1 Modelos do Estudo

Estudo retrospectivo de caráter transversal com componente analítico de casos de pacientes atendidos durante a epidemia de dengue na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT/HVD) no período de Janeiro a Dezembro de 2011 e controles oriundos da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (FHMOAM).

### 5.2 População do Estudo

A população do estudo consistiu de 90 amostras de soro, sendo 60 amostras de soro de pacientes com dengue e 30 amostras de soro de indivíduos controles.

As 60 amostras de pacientes com dengue mantiveram-se armazenadas em biofreezer a -20° C na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMTHVD), oriundas da epidemia de 2011, sob responsabilidade da gerência da virologia da referida Instituição.

Após a anuência da FMTHVD para liberação e processamento das amostras de acordo com a Resolução 441 da CNS de 12 de maio de 2011 itens III do artigo primeiro que regulamenta Biorrepositórios (ANEXO B) as amostras foram divididas em três grupos distintos:

Grupo I: controle negativo – doadores de sangue (n= 30).

Grupo II: controle positivo 1 / DENGUE NÃO GRAVE – DNG (n= 30).

Grupo III: controle positivo 2 / DENGUE GRAVE – DG (n= 30)

#### 5.2.1 Pacientes com dengue

Participaram deste estudo, pacientes com dengue, de ambos os sexos, atendidos na FMTHVD, com procedência dos Estados da Amazônia Legal e faixa etária de 18 a 65 anos. Esses pacientes foram convidados e concordaram em participar do estudo, além de aceitaram liberar suas amostras para futuros experimentos, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido TCLE

(ANEXO C), do projeto de pesquisa intitulado “Doenças febris agudas em uma unidade terciária de saúde da Amazônia Ocidental Brasileira: estudo de epidemiologia, caracterização clínica e diagnóstico” (ANEXO D).

Para o diagnóstico clínico de dengue o estudo contou com o apoio de médicos da FMTHVD que após levantar as evidências clínicas classificou-os, seguindo critérios de gravidade em dois grandes grupos DENV GRAVE e DENV NÃO GRAVE (WHO, 2009).

Para o diagnóstico laboratorial foram realizados os seguintes ensaios: isolamento viral da proteína NS1, posteriormente a sorologia para dengue IgM, e finalmente o RT-PCR para detecção dos genomas virais.

Foram critérios para exclusão: amostras que obtiveram diagnóstico de outras doenças tropicais atendidas na referida Fundação neste período.

### 5.2.2 Elegibilidade das amostras

As amostras positivas foram selecionadas aleatoriamente do Biorrepositório da FMTHVD sendo trinta amostras com diagnóstico para dengue grave e trinta amostras para dengue não grave, de pacientes adultos, não índios (separadas previamente das demais amostras de pacientes grávidas, menores e índios).

### 5.2.3 Indivíduos controle

O grupo controle negativo foi constituído de 30 indivíduos saudáveis, com idade variando entre 18 e 65 anos, ambos os sexos, todos doadores de sangue voluntários oriundos da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas - FHMOAM, que fossem considerados aptos para doação de sangue. Após abordagem previa aceitaram o convite para participar da pesquisa, assinando o TCLE (APÊNDICE C). A coleta ocorreu diariamente no período matutino por ordem de chegada ao hemocentro até a obtenção do N amostral (30 amostras).

#### 5.2.4 Informações Éticas

O presente estudo foi submetido via Plataforma Brasil (CONEP) e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Amazonas UFAM sob parecer nº 256.163 (ANEXO A).

Solicitou-se a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE, (Apêndices) dos pacientes com dengue devido ao fato de tratar-se de amostras previamente armazenadas, e liberadas provenientes de estudo anteriores realizados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas FMTM.

#### 5.2.5 Critérios de Inclusão

**Grupo Controle Positivo:** Pacientes adultos (acima de 18 anos), não índios, atendidos na FMTHVD no período de Janeiro a Abril do ano de 2011, com diagnóstico clínico/laboratorial para dengue.

**Grupo Controle Negativo:** Doadores voluntários de sangue oriundos da FHMOAM que concordarem participar deste estudo após a assinatura do TCLE, e que tiveram suas amostras aptas para a distribuição.

#### 5.2.6 Critérios de Exclusão

**Grupo Controle Positivo:** Pacientes menores de 18 anos, índios ou sem diagnóstico clínico/laboratorial confirmado para dengue.

Não participaram deste estudo as amostras que obtiveram diagnóstico de outras doenças tropicais atendidas na referida Fundação (co-infecção).

**Grupo Controle Negativo:** Doadores que não aceitarem assinar o TCLE, e ainda os que apresentaram suas amostras não aptas para distribuição pela FHMOAM.

### 5.3 Processamentos das amostras

O Procedimento de Quantificação de citocinas de padrão Th1, Th2 e Th17 foi realizado por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array - CBA).

As dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL17A foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo CBA, utilizando o Kit Th1, Th2 e Th17 (*BD Cytometric Bead Array (CBA) Human T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>17 Cytokine Kit - Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca BD® Biosciences, San Jose, CA*), seguindo as orientações técnicas contidas nos protocolos preconizados pelo fabricante.

O *BD™ CBA* utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads* com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente as várias citocinas solúveis através de uma superfície de captura).

Cada microesfera de captura foi conjugada a um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra foi analisada através do fluorocromo ficoeritrina (PE) – conjugado a anticorpos, que forneceu um sinal fluorescente, em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*.

Os complexos formados de partículas de capturas, citocina da amostra e reagente de detecção foram mensurados através da citometria de fluxo. A intensidade da fluorescência PE de cada complexo revelou a concentração em pg/mL de cada citocina.

### 5.4 Análises Estatística

A comparação de médias dos níveis séricos de citocinas foi realizada por meio do Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ), uma vez que não foi observada normalidade quando aplicado o Teste de Barlett ( $P < 0,05$ ). Os gráficos foram elaborados a partir dos resultados obtidos utilizando o software Graphprisma®.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17A foram quantificadas a fim de verificar seu comportamento quando testadas entre os grupos de pacientes classificados em dengue não grave, dengue grave e controle negativo e estão representadas nos gráficos 01, 02 e 03.

### IL -2 na dengue

A interleucina-2 influencia várias subpopulações celulares durante a diferenciação, as respostas imunitárias e homeostase. Como comentado na revisão, a estimulação com IL-2 é essencial para a manutenção de T reguladoras, e para a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> em subconjuntos de células T efetoras por ativação mediada por antígeno. A utilização de IL-2 pode favorecer a estimulação ou a supressão imune. Assim, passando a ser uma via imunorregulatória importante na imunopatogênese da dengue (BOYMAN; SPRENT, 2012)

Neste estudo discordamos dos trabalhos, realizados por (VALERO; LARREAL et al., 2008), pois os mesmos encontraram aumento de IL-2 no grupo composto de 15 quinze pacientes que desenvolveram dengue grave, num total geral de 32 trinta e dois pacientes, seguindo os mesmos critérios da WHO 2009, usados neste trabalho. Os níveis séricos de IL-2 nos grupos dengue não grave em relação a dengue grave mostrou-se não significativo, porém quando ambos são comparados ao grupo controle negativo há uma elevação sérica significativa (gráfico 01).

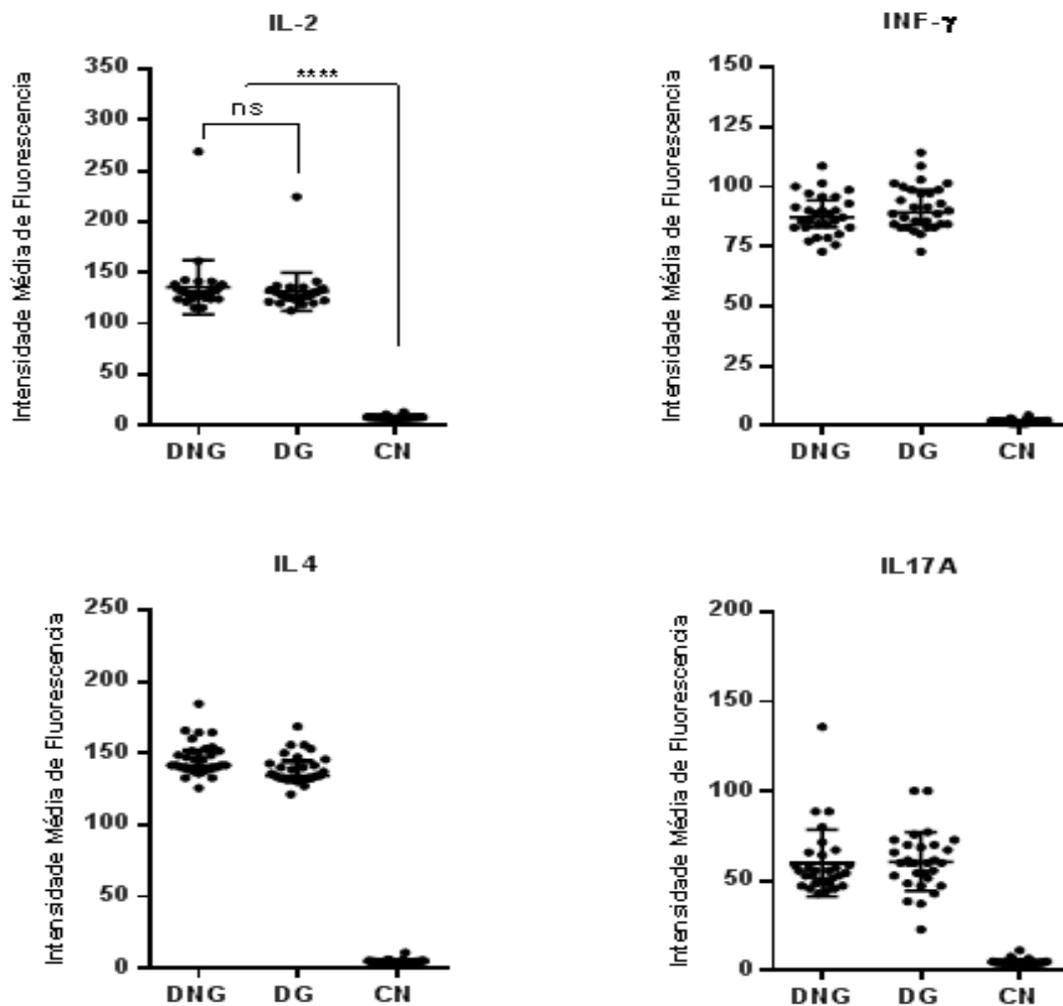


Gráfico 01 Intensidade média das citocinas séricas: IL-2, IFN-  $\gamma$ , IL-4 e IL-17A em pacientes dos grupos: dengue não grave (DNG), dengue grave (DG) e controle negativo (CN). \*\*\*\* = significativo entre si, ns = não significativo ( $P < 0,05$ ).

O IFN- $\gamma$  é produzido durante um determinado tipo de resposta do linfócito T auxiliar 1 e pode refletir a ativação de células T CD8<sup>+</sup> com produção de citocinas próinflamatórias, e é apontada como a chave da ativação endógena, promovendo efeitos antimicrobianos de macrófagos (DUARTE, 2002).

Nesse estudo o IFN- $\gamma$  apresentou níveis séricos semelhantes quando comparados os grupos de pacientes dengue não grave ao de dengue grave (gráfico 01), mostrando-se diferentes quando comparados ao grupo controle negativo. Dado este que difere dos estudos de (AZEREDO; ZAGNE et al., 2006). Neste estudo eles encontraram altos níveis de IFN- $\gamma$ , observados em pacientes com dengue em asiáticos e latino-americanos posteriormente associando a presença desta citocina a gravidade da doença.

Outros pesquisadores tais como (MANGADA; ENDY et al., 2002; MANGADA; ROTHMAN, 2005) estão a alguns anos estudando a ligação do IFN- $\gamma$ , e defendem que sua associação a outras citocinas, entre elas o TNF- $\alpha$ , e demais mediadores envolvidos no recrutamento e ativação de plaquetas, predeterminando aumento da permeabilidade endotelial, hipotensão e o choque, caracterizando desta forma o agravamento da doença. Por fim estudos realizados por (PRIYADARSHINI; GADIA et al., 2010), que analisou na Índia um total de 332 pacientes hospitalizados e destes 62 sessenta e dois apresentaram dengue grave, sendo o sorotipo DENV 1 o mais predominante, tendo porem a presença dos demais sorotipos exceto o DENV 4, e destes a diferem de nossos achados uma vez que o aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  foi observado em um maior número de casos de pacientes com dengue grave em relação ao grupo dengue não grave.

#### IL-4 na dengue

A IL-4 é de um fator de crescimento e de diferenciação de células B, e pode ser usado como um indicador da ativação e proliferação de células B. Além disso, a IL-4, geralmente induz células B ativadas para produzir anticorpos no plasma, assim, é característica da resposta imune humoral, podendo aumentar produção de anticorpos de neutralização (ABBAS; LICHTMAN et al., 2008).

Neste estudo foi possível determinar o comportamento de IL-4 (gráfico 01) onde os grupos de pacientes compostos por dengue grave e não grave apresentaram-se muito próximos, sendo considerado não significativo estatisticamente. Entretanto quando comparamos o grupo de pacientes com dengue não grave e o grupo de dengue grave ao grupo controle negativo, observamos que ambos apresentam aumento significativo (gráfico 01).

Estudos realizados por (KUMAR; LIANG et al., 2012), onde avaliando um grupo de 44 quarenta e quatro pacientes com dengue não grave e 18 dezoito paciente com dengue grave, verificou um aumento de IL-4 nesses pacientes que evoluíram para dengue grave. No nosso trabalho o aumento sérico desta citocina foi significativo quando comparado ao controle, mas não há uma diferença entre pacientes com dengue grave e não grave, não permitindo fazer a associação desta citocina a gravidade da doença.

#### IL -17 A na dengue

A IL-17A é uma potente citocina pro-inflamatória, secretada principalmente pelas células Th17 e medeia a inflamação e doenças autoimunes. Porém o papel da citocina IL-17, na infecção pelo vírus da dengue não é claro. (JAIN et al, 2013).

Nossos achados discordam dos trabalhos realizados por JAIN et al., (2013), onde altos níveis de IL-17 A associadas à dengue grave, foram observados nos primeiros dias de evolução da doença. Quando avaliamos o gráfico 02 é possível observar que tanto o grupo de pacientes com dengue não grave, comparado ao grupo de dengue grave apresentaram o mesmo comportamento, não sendo estatisticamente significativo. Porém quando estes grupos são comparados ao grupo controle negativo foi possível observar uma considerável diferença, como mostra o gráfico. Discordamos ainda dos trabalhos de (GUABIRABA; BESNARD et al., 2013), onde foram encontradas correlações entre IL-17A e dengue não grave, fato este não observado neste estudo.

Este estudo não corrobora com as correlações de (HELPER, 2009) entre IL -17A, IL 6 e demais citocinas, ligadas aos altos níveis de TNF- $\alpha$  detectados em quadros de dengue. Sabemos que presença de IL-17A estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, por meio da liberação de IL-1 $\beta$  envolvido

no processo de exacerbação das respostas inflamatórias, fato este associado ao extravasamento tecidual, amplificando o quadro hemorrágico, classificado com dengue grave.

Outro estudo realizado por (IVANOV; MCKENZIE et al., 2006; YANG; ANDERSON et al., 2008) que avaliou a ativação de TGF- $\beta$  e IL-6, mostrou que tais citocinas levam a produção de produção de IL-17A na dengue grave, fato este que não foi observado neste estudo. Neste trabalho não se pode associar a correlação de tais citocinas com a exacerbação dos quadros de dengue (gráfico 01).

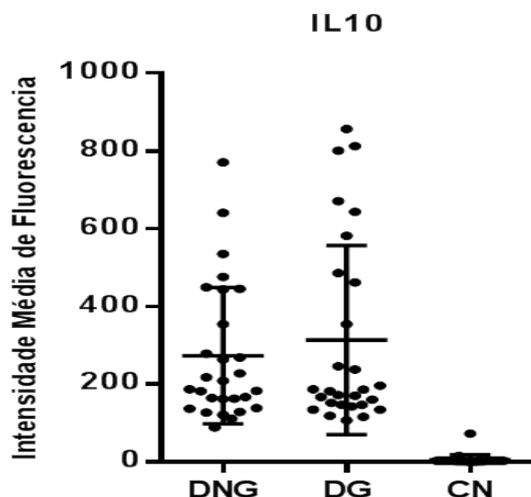


Gráfico 02 - Intensidade média da citocina séricas IL-10 em pacientes dos grupos: dengue não grave (DNG), dengue grave (DG) e controle negativo (CN). \*\*\*\* = significativo entre si, ns = não significativo ( $P < 0,05$ ).

### IL-10 na dengue

Neste estudo foi possível observar uma tendência ao aumento de IL-10 no grupo dengue grave, quando comparado ao grupo dengue não grave e controle negativo (gráfico 02). Alguns estudos encontraram os mesmos achados para IL 10, de nosso estudo, onde em um surto de DENV 2 em Taiwan, também foi encontrada

uma tendência de expressão de IL-10 em pacientes acometidos por dengue grave (DUELL; TAN et al., 2012).

Observa-se os mesmos achados encontrados por (CHEN; YANG et al., 2007), onde também encontraram um aumento de IL-10 no grupo de dengue grave e baixos níveis de INF- $\gamma$  em ambos os grupos em que são observados em pacientes infectados por DENV. E concorda-se com os trabalhos realizados por (TSAI; CHUANG et al., 2013), afirmando que a expressão aumentada de IL-10 pode também estar envolvida na patogênese da dengue, porém não esta ainda totalmente elucidada.

Por ser uma citocina com efeitos pleiotrópicos na imunorregulação e inflamação, a IL-10 pode desempenhar um papel na patogênese da dengue, refletindo uma atividade imunossupressora que provoca resistência ao IFN- $\gamma$ . Na última década, diversos trabalhos relatam uma correlação positiva entre os níveis de IL-10 e sua ligação com a severidade da dengue. Os níveis elevados de IL-10 são detectados em pacientes com dengue grave, comparados com pacientes com febre da dengue (TSAI; CHUANG et al., 2013)

Estes resultados corroboram com os trabalhos realizados por (BRASIER et al 2012), onde a IL-10 eleva-se aproximadamente dentro de uma semana da doença, sendo altamente relacionada com o risco de desenvolver dengue grave (FHD). Segundo este estudo na dengue a IL-10, funciona como uma citocina imunossupressora, secretada por monócitos primários em resposta ao vírus da dengue, gerando uma infecção anticorpo – dependente.

A expressão aumentada de IL-10 pode também estar envolvida na patogênese da dengue, mas ainda não está elucidada (TSAI; CHUANG et al., 2013). Assim, os níveis séricos aumentados de IL-10 neste estudo para os pacientes do grupo dengue grave e dengue não grave sugere maior investigação na sua ligação a exacerbação dos quadros de dengue grave.

Altos níveis de IL-10 e baixos níveis de IFN- $\gamma$  são observados em pacientes infectados com DENV e que apresentam tendência à FHD (CHEN; YANG et al., 2007).

## TNF- $\alpha$ na dengue

Estes resultados corroboram com trabalhos realizados por BOZZA et al., (2008) que encontraram inconsistência nos níveis de TNF- $\alpha$  na doença grave contra formas de doença leve. Algumas hipóteses sugerem diferenças nos sorotipos de vírus da dengue ou na resposta imune do hospedeiro, como por exemplo, diferentes polimorfismos genéticos do TNF- $\alpha$  que poderiam explicar o resultado da doença.

Porém este estudo discorda de estudos realizados por (VITARANA; DE SILVA et al., 1991; BRAGA; MOURA et al., 2001), que associaram a presença de TNF- $\alpha$  a gravidade da doença, fato este não observado em nenhum dos grupos avaliados neste estudo.

Em contraste, aos nossos achados, pesquisas realizadas por (PRIYADARSHINI; GADIA et al., 2010), mostraram níveis elevados de TNF- $\alpha$  em pacientes com febre hemorrágica da dengue (PRIYADARSHINI; GADIA et al., 2010), discordando dos resultados que compõem o gráfico 03.

Os resultados para as citocinas pro inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, neste estudo mostraram no gráfico 03 a equiparação entre tais citocinas, quando comparados os grupos de pacientes classificados em dengue não grave, dengue grave, como mostra a não significância entre os grupos. Porém quando comparamos os grupos dengue não grave e dengue grave ao grupo controle negativo de ambos é possível determinar a significância quando verificado o p valor de  $< 0,0001$ .

## IL-6 na dengue

Os achados deste estudo corroboram com os estudos realizados por (PRIYADARSHINI; GADIA et al., 2010), que avaliando uma população na Índia encontrou que os níveis de IL-6 entre os casos de dengue grave e não grave não foram estatisticamente significativos. No entanto este estudo discorda dos achados de (CHEN; LEI et al., 2006), que em seus trabalhos associou a presença de IL-6 a exacerbação dos quadros de dengue, sendo encontrados até mesmo em pacientes que foram a óbito.

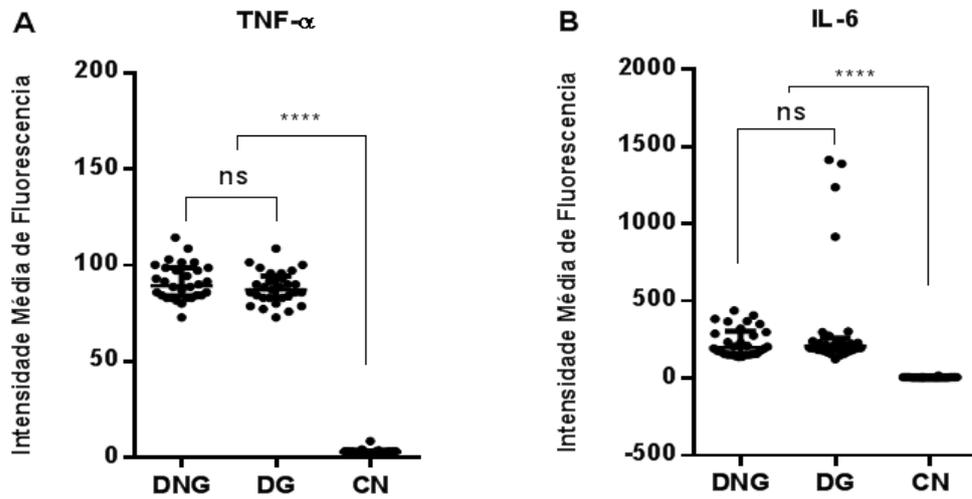


Gráfico 03. Intensidade média das citocinas séricas TNF- $\alpha$  e IL-6 em pacientes dos grupos: dengue não grave (DNG), dengue grave (DG) e controle negativo (CN). \*\*\*\* = significativo entre si, ns = não significativo ( $P < 0,05$ ).

## 7 CONCLUSÃO

Em todas as citocinas quantificadas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A e TNF- $\alpha$ ) foi possível avaliar que os grupos de dengue (grave e não grave) apresentaram concentrações aumentadas e estatisticamente significativas em relação ao grupo controle negativo.

Não há diferença entre os grupos dengue grave e não grave para as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A e TNF- $\alpha$  analisadas.

Não houve como inferir na existência de um padrão definido como Th1, Th2 ou Th17 para os casos de dengue grave e ou não grave.

Observando isoladamente o comportamento da citocina IL-10, houve tendência no seu aumento no grupo composto por pacientes que evoluíram para dengue grave quando comparado ao grupos dengue não grave.

Uma estratificação das amostras analisadas em relação aos seus sorotipos poderia elucidar a possível ligação destas citocinas com a gravidade da doença.

## 8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brazil, 2008. ISBN 8535222448.

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A. et al. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nature immunology**, v. 8, n. 9, p. 942-949, 2007.

AZEREDO, E. L.; ZAGNE, S. M.; ALVARENGA, A. R. et al. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 437-449, 2006.

BARKETT, M.; GILMORE, T. D. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6910-6924, 1999.

BASTOS, M. **Perfil soroepidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001)**. 2004. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.[Links]

BASTOS, M. S.; FIGUEIREDO, R. M. P.; RAMASAWMY, R. et al. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 393-394, 2012.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M. et al. Induction and effector functions of TH17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051-1057, 2008.

BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 180-190, 2012.

BRAGA, E. L.; MOURA, P.; PINTO, L. M. et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 229-232, 2001.

CHEN, L.-C.; LEI, H.-Y.; LIU, C.-C. et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 74, n. 1, p. 142-147, 2006.

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

CONSOLI, R. A. G.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1994.

DA SILVA CORDEIRO, J. Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 42, n. 6, p. 986-91, 2008.

DE FIGUEIREDO, R. M. P.; NAVECA, F. G.; DE SOUZA BASTOS, M. et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 4, p. 667, 2008.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European journal of immunology**, v. 37, n. S1, p. S34-S45, 2007.

DUARTE, T. A. **Avaliação do papel do interferon- $\gamma$  na modulação da resposta tecidual durante a infecção pelo *Mycobacterium bovis*; Evaluation of the role of interferon- $\gamma$  in the modulation of tissue response during infection with *Mycobacterium bovis***. 2002. Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

DUELL, B. L.; TAN, C. K.; CAREY, A. J. et al. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 295-313, 2012.

FICKENSCHER, H.; HÖR, S.; KÜPERS, H. et al. The interleukin-10 family of cytokines. **Trends in immunology**, v. 23, n. 2, p. 89-96, 2002.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 32, n. 1, p. 15-20, 1999.

FIGUEIREDO, L. T. M.; OWA, M. A.; CARLUCCI, R. H. et al. Estudo sobre diagnóstico laboratorial e sintomas do dengue, durante epidemia ocorrida na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 34, p. 121-30, 1992.

FIGUEIREDO, R.; BASTOS, M.; LIMA, M. et al. Dinâmica da sorologia e isolamento viral na epidemia de dengue em Manaus (1998-2001). **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. Supl I, p. 94, 2002.

FIGUEIREDO, R. M. P. D.; MOURÃO, M. P. G.; ABI-ABIB, Y. E. C. et al. Identification of dengue viruses in naturally infected *Aedes aegypti* females captured with BioGents (BG)-Sentinel traps in Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 221-222, 2013.

FIGUEIREDO, R. M. P. D.; THATCHER, B. D.; LIMA, M. L. D. et al. Exanthematous diseases and the first epidemic of dengue to occur in Manaus, Amazonas State, Brazil, during 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 476-479, 2004.

FRITSCHER, C.; SOLÉ, D.; ROSÁRIO III, N. Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. **J Pneumol**, v. 28, n. Supl 1, p. S4-S28, 2002.

GORDON, J. R.; GALLI, S. J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 274-276, 1990.

GUABIRABA, R.; BESNARD, A. G.; MARQUES, R. E. et al. IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection. **European journal of immunology**, 2013.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Archives of virology**, p. 1-15, 2013.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S7-S16, 2010.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

HELPER, T. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever? **Indian J Med Res**, v. 130, p. 5-8, 2009.

HOTTA, S. Dengue vector mosquitoes in Japan: the role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the 1942-1944 dengue epidemics of Japanese Main Islands. **Medical Entomology and Zoology**, v. 49, p. 267-274, 1998.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L. et al. The orphan nuclear receptor ROR [gamma] t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

KNUDSEN, A. B. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. **Parassitologia**, v. 37, n. 2-3, p. 91, 1995.

KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.

KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 484-487, 2007.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

KUMAR, Y.; LIANG, C.; BO, Z. et al. Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 11, p. e1887, 2012.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 5, p. e646, 2010.

LAN, N. T. P.; HIRAYAMA, K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. **Tropical Medicine and Health**, p. 1110060187, 2011.

LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, W. M. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 233, 2005.

LEE, Y. R.; LEI, H. Y.; LIU, M. T. et al. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. **Virology**, v. 374, n. 2, p. 240-248, 2008.

LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

MANGADA, M. M.; ENDY, T. P.; NISALAK, A. et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 12, p. 1697-1703, 2002.

MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4<sup>+</sup> T cells to heterologous serotypes. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2676-2683, 2005.

MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B. et al. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.

MILLS, K. H.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells—their induction and role in infection. *Seminars in immunology*, 2004. Elsevier. p.107-117.

MOURÃO, M. P. G. C., M; TAVARES, A.G.; ALVES, L; ALBUQUERQUE, B. MANEJO DE PACIENTES COM DENGUE. v. I n. I 2011.

NAKAE, S.; SAIJO, S.; HORAI, R. et al. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5986, 2003.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune responses to dengue virus. **Archives of medical research**, v. 36, n. 5, p. 425-435, 2005.

OKAMURA, H.; TSUTSUI, H.; KASHIWAMURA, S.-I. et al. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. **Advances in immunology**, v. 70, p. 281-312, 1998.

OSANAI, C. H.; ROSA, A.; TANG, A. et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima Nota previa.; Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-4, 1983.

PIERRE, B.; NADIA, W.; DIEUDONNÉ, N. et al. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. **BMC infectious diseases**, v. 10, 2010.

PRIYADARSHINI, D.; GADIA, R. R.; TRIPATHY, A. et al. 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.

ROBINSON, D. S.; HAMID, Q.; YING, S. et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 5, p. 298-304, 1992.

ROCHA, L.; TAUIL, P. L. Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 18-22, 2009.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532-543, 2011.

SAÚDE, B. M. D. **Nota Técnica Nota No 33 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS, Isolamento do DENV 4 em Manaus /AM Atualização 03/02/2011**. SAÚDE, S. D. V. E. 2011.

SAÚDE, B. M. D. S. S. D. V. E. **DENGUE : Diagnóstico e Manejo Clínico adulto e criança** TRANSMISSÍVEIS, D. D. V. D. D. I 2011 Brasília/DF.

SMITH, K. A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. **Science**, v. 240, n. 4856, p. 1169-1176, 1988.

SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA, R. T.; BLOTTA, M. H. S. et al. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

STARK, M. A.; HUO, Y.; BURCIN, T. L. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 285-294, 2005.

TAUIL, P. L. Dengue: desafios para o seu controle:[editorial]; Dengue: challenges to its control:[editorial]. **Brasília méd**, v. 45, n. 1, p. 3-4, 2008.

TORRES, E. M. La prevención de la mortalidad por dengue: un espacio y un reto para la atención primaria de salud. **Rev Panam Salud Publica**, v. 20, n. 1, p. 61, 2006.

TRAVASSOS DA ROSA, A.; ROCHA, J.; SILVA, O. et al. Surto de dengue em Boa Vista, território de Roraima, Brasil. **Bol Epidemiol**, v. 14, n. 9, p. 93-101, 1982.

TSAI, T.-T.; CHUANG, Y.-J.; LIN, Y.-S. et al. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. **Journal of biomedical science**, v. 20, n. 1, p. 40, 2013.

VALERO, N.; LARREAL, Y.; ESPINA, L. et al. Elevated levels of interleukin-2 receptor and intercellular adhesion molecule 1 in sera from a venezuelan cohort of patients with dengue. **Archives of virology**, v. 153, n. 1, p. 199-203, 2008.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J. et al. TGF [beta] in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179-189, 2006.

VITARANA, T.; DE SILVA, H.; WITHANA, N. et al. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. **The Ceylon medical journal**, v. 36, n. 2, p. 63-65, 1991.

WATI, S.; RAWLINSON, S. M.; IVANOV, R. A. et al. Tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) stimulation of cells with established dengue virus type 2 infection induces cell death that is accompanied by a reduced ability of TNF- $\alpha$  to activate nuclear factor  $\kappa$ B and reduced sphingosine kinase-1 activity. **Journal of general virology**, v. 92, n. 4, p. 807-818, 2011.

WHO, D. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. **Geneva: World Health Organization**, 2009.

WILEY, S. R.; SCHOOLEY, K.; SMOLAK, P. J. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. **immunity**, v. 3, n. 6, p. 673-682, 1995.

WORLD, H. O. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**  
N°117, F. S. 1 2012.

YANG, L.; ANDERSON, D. E.; BAECHER-ALLAN, C. et al. IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human TH17 cells. **Nature**, v. 454, n. 7202, p. 350-352, 2008.

# **APÊNDICES**

**Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**



## APENDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TÍTULO DO ESTUDO:** Avaliação da resposta th17 no soro de pacientes com dengue.

**JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS:** Este estudo irá contribuir com informações sobre a resposta imune, isto é, como o indivíduo desenvolve defesa contra a dengue, durante o tratamento com medicamentos e quando desenvolve reação da doença.

**PROCEDIMENTOS:** Para este estudo será utilizada uma pequena parte (0,2ml) de soro da amostra de sangue já processada após doação voluntária na Fundação de Hematologia e Hemoterapia (FHEMOAM), em Manaus.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha, sendo que esta última já seria realizada como rotina durante o processo de doação voluntária.

**BENEFÍCIOS:** A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento da dengue podendo auxiliar futuramente no tratamento da doença.

**ORIENTAÇÃO:** Os indivíduos participantes deste estudo poderão, tirar suas dúvidas podendo entrar em contato com os pesquisadores: Prof.Dr José Fernando Marques Barcellos - Tel: **92-8166-2222** celular ou fixo **3305-1496**; ou Maria Raika Guimarães Lobo - Tel: celular : **92-9142-3329** ou fixo : **3651-3693** ou através do contato profissional Universidade Federal do Amazonas Endereço : Av General Rodrigo Otavio n 3000 – Coroado. UFAM : **3305-4351**; ou o Comitê Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Manaus – AM Fone: (92) 3305-5130 - (92) 9171-2496 ; E-mail: [cep@ufam.edu.br](mailto:cep@ufam.edu.br) - [cep.ufam@gmail.com](mailto:cep.ufam@gmail.com)

**VOLUNTARIEDADE:** A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento como doadores de sangue na Fundação de Hematologia e Hemoterapia FHEMOAM.

**CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO:** Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar identidade dos participantes.

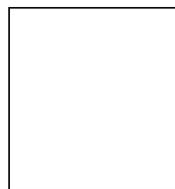
**USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO:** O material biológico coletado (sangue periférico) será utilizado para o que se propõe neste estudo. Neste caso, estão previstos estudos para avaliação de como o corpo se defende nos casos de dengue.

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do participante)

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do pesquisador)



Manaus, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

(Impressão dactiloscópica)

# **ANEXOS**

## ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Universidade do Amazonas- UFAM.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIACAO DA RESPOSTA TH 17 NO SORO DE PACIENTES COM DENGUE

**Pesquisador:** José Fernando Marques Barcellos

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 14569813.9.0000.5020

**Instituição Proponente:** FUNDACAO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 256.163

**Data da Relatoria:** 24/04/2013

#### Apresentação do Projeto:

A dengue é uma doença causada por um arbovírus RNA do gênero *Flavivirus*, pertencente a família *Flaviviridae* considerada como problema de saúde pública no Brasil (MS). No Brasil todos os sorotipos estão circulantes e são capazes de causar doença ao homem, podendo evoluir para quadros graves, inclusive levando a óbito. A transmissão da dengue ocorre exclusivamente pela picada da fêmea hematófaga do mosquito *Aedes aegypti* de hábitos urbanos que se desenvolve amplamente em países tropicais e subtropicais. O Brasil já foi alvo de grandes epidemias e em 1955 foi considerada erradicada, gerando desinteresse pela dengue. Dados atuais mostram que a dengue ainda leva a óbito em média 20.000 mil brasileiros em decorrência das complicações da doença de norte a sul de nosso país. De acordo com dados disponíveis no SINAM (Sistema de Informação de Agravos e Notificação), a Região Norte do Brasil sofreu aumento de 277 %, sendo que em 2010 o número de casos registrados foi 129 e em 2011 487 casos. Acredita-se que a recidiva da doença, seja um dos fatores para justificar o agravamento do quadro e a evolução para forma mais grave da doença como a dengue hemorrágica ou síndrome do choque da dengue. Pacientes acometidos pelo vírus da dengue ou que evoluíram para o quadro hemorrágico da dengue apresentam altos índices de citocinas inflamatórias, entre as quais IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17.

Pesquisador Responsável Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos, Lúcia de Paula, Maria Paula Gomes Mourão, Maria Raika Guimarães Lobo.

Endereço: Rua Teresina, 4950  
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br

**ANEXO B – Parecer de aprovação do Biorrepositorio da Fundação de Medicina Tropical de Manaus FMHVD.**



**FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL**  
"Doutor Heitor Vieira Dourado"  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FMT-HVD**



**OFÍCIO Nº 029-GDP/FMT-HVD**

Manaus, 07 de dezembro de 2012

Da : Coordenação do CEP/FMT-HVD  
Para : Prof. Dr. José Fernando Marques Barcelos  
Departamento de Morfologia/ICB-UFAM  
Coordenador do Projeto de Pesquisa "Avaliação da Resposta Th  
17 no Soro de Pacientes com Dengue"

Senhor Coordenador,

Em atenção ao seu ofício com data de 06 passado, em anexo, encaminhamos uma cópia do Regulamento do Biorrepositório da FMT-HVD, para os fins contidos no documento antes mencionado.

Sem mais, renovamos votos de estima e consideração.

Atenciosamente.

  
Prof. Dr. FRANCISCO NAILSON SANTOS PINTO  
Coordenador

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SÉRIES HUMANOS  
AV. PEDRO TEIXEIRA, 25 - DOM PEDRO  
CEP:69.040-000 - MANAUS-AMAZONAS-BRASIL  
TEL: 2127-3555 - E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL  
DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO



**ANEXO C – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Trabalho que Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira - FMHTVD.**



**DOENÇAS FEBRIS AGUDAS EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA DE SAÚDE DA  
AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA: ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA,  
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E DIAGNÓSTICO**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PÓS-INFORMAÇÃO**

O paciente abaixo assinado ou o seu parente próximo abaixo identificado, sob a responsabilidade do investigador ou médico que assina este documento, declara estar ciente após ter lido ou ouvido o presente Termo de Consentimento que lhe informa o seguinte:

- I. Que está participando de um estudo para saber qual a causa do quadro febril que apresenta, a partir da investigação de várias doenças como: malária, dengue, mononucleose, febre por Oropouche, febre por Mayaro, leptospirose, febre tifóide e febre amarela. Além disso, se os testes forem negativos para essas doenças, novos vírus serão pesquisados, como Saint Louis, Oeste do Nilo, Ilhéus, Bussuquara e Cacipacoré;
- II. Que a participação neste estudo é voluntária, e que a recusa em participar não provocará qualquer tratamento diferenciado ou perda de benefícios a que o paciente tenha direito;
- III. Que, havendo concordância para a participação no estudo, se procederão as seguintes condutas:
  - 1 - Preenchimento da ficha clínica (constando de dados relativos ao paciente e à doença);
  - 2 - Coleta de sangue da veia do braço (10mL para adultos e 3mL para crianças), com uso de agulhas e seringas descartáveis, por profissional qualificado;
- IV. Após os primeiros teste de laboratório, se houver necessidade e consentimento do participante e/ou seu responsável, o paciente poderá ser contactado para proceder uma nova coleta de sangue;
- V. Que o médico assistente poderá pedir outros exames como sangue, fezes e urina, dependendo da necessidade e que não terão qualquer relação com a pesquisa;
- VI. Que, participando do estudo, o paciente ou a família não obterão quaisquer benefícios adicionais além dos já citados (diagnóstico da infecção e/ou doença), podendo desta forma beneficiar outros indivíduos;
- VII. Que a participação nessa pesquisa é voluntária e o indivíduo receberá todos os cuidados quanto ao diagnóstico e tratamento da sua doença.

**ANEXO D – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da**

## Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado - FMHTVD.



Fundação de Medicina Tropical do Amazonas  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos  
Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro  
Cep: 69040-000  
Manaus – Amazonas - Brasil



### APROVAÇÃO Nº 2015

**Registro CEP Nº2337-10**

**CAAE – 0038.0.114.000-09**

**Processo Nº2337/2010-FMT-AM**

**Projeto de Pesquisa:** Doenças Febris agudas em uma unidade terciária de saúde da Amazônia Ocidental Brasileira: estudos de epidemiologia, caracterização clínica e diagnóstico

**Pesquisador responsável:** Maria Paula Gomes Mourão

**Instituição Sediadora:** Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

**Instituição Vinculada:** Não se aplica

**Área Temática Especial:** Não se aplica

**Patrocinador:** PPSUS

**Registro para armazen. de mat. Biológico humano:** Não se aplica.

Ao se proceder à análise relativo do Projeto em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em sessão ordinária do dia 25 de outubro de 2010 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Situação do Protocolo:** APROVADO

Manaus, 25 de outubro de 2010.

  
Luiz Carlos de Lima Ferreira  
Coordenador de Ética em Pesquisa  
FMT-AM

**Obs:** Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP, os relatórios parciais e finais sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº196, de 10.10.1996, inciso IX. 2 letra "c") conforme o Formulário de acompanhamento dos Projetos aprovados no CEP, disponível em nossa home Page.