

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Denise Maciel Carvalho

**Níveis séricos *in vivo* da proteína não estrutural 1 e parâmetros da resposta imune em pacientes infectados com o vírus dengue apresentando diferentes desfechos clínicos.**

Uberaba

2014

Denise Maciel Carvalho

**Níveis séricos *in vivo* da proteína não estrutural 1 e parâmetros da resposta imune em pacientes infectados com o vírus dengue apresentando diferentes desfechos clínicos.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. David Nascimento  
Silva Teixeira

Uberaba

2014

DENISE MACIEL CARVALHO

**Níveis séricos *in vivo* da proteína não estrutural 1 e parâmetros da resposta imune em pacientes infectados com o vírus dengue apresentando diferentes desfechos clínicos.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Uberaba, 29 de outubro de 2014.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Cristina da C. H. Barata de Oliveira – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Lucio Roberto C. Castellano – Universidade Federal da Paraíba

---

Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias – Universidade Federal de Alfenas

---

Profa. Dra. Luciana de A. S. Teixeira – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. David Nascimento S. Teixeira – Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Orientador)

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

C322n Carvalho, Denise Maciel  
Níveis séricos *in vivo* da proteína não estrutural 1 e parâmetros da resposta imune em pacientes infectados com o vírus dengue apresentando diferentes desfechos clínicos / Denise Maciel Carvalho. -- 2014.  
99 f. il. : fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2014  
Orientador: Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira

1. Dengue. 2. Proteínas não estruturais virais. 3. Óxido nítrico. 4. Receptor 4 Toll-Like. 5. Fator de necrose tumoral alfa. I. Teixeira, David Nascimento Silva. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.993

*Dedico esse trabalho a meus pais, **Denis e Lêda**, e a meus filhos, **Paulo Ricardo e Ana Julia**, gerações que me antecedem e sucedem e que são a razão de minha vida, o motivo de minha dedicação e perseverança, pessoas maravilhosas que me oferecem aconchego, respeito e amor gratuitamente, todos os dias...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por me conceder a graça de poder estudar, e, a partir do estudo, enriquecer a minha vida e a de quem comigo convive, de melhores possibilidades, conhecimentos, oportunidades.

Agradeço à **Universidade Federal do Triângulo Mineiro**, pela honra de aqui ter estudado, pelo acolhimento dos professores, companheirismo dos colegas, apoio dos colaboradores administrativos e pela estrutura oferecida aos alunos, professores, colaboradores e pacientes.

Agradeço à **Pós-Graduação em Ciências da Saúde**, pela organização e respeito com que nós alunos somos tratados, bem como pelas orientações recebidas.

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira**, pela oportunidade de aprendizado, por compartilhar sua experiência e conhecimento, pela presteza em responder meus apelos, muitas vezes insistentes, disponibilizando com atenção seu tempo e dedicação.

Agradeço à **Profa. Dra. Ana Paula Sarreta Terra**, por sua disponibilidade, companheirismo, colaboração, e por ter me auxiliado em momentos de dúvida e dissabor, inquietação e desestímulo: MUITO OBRIGADA!

Agradeço à **Fernanda Gonçalves Garcia, Ana Cristina Lopes Tosta, Jorge Marcelo Marsson e Jhony Robson de Oliveira**, por sua parceria e apoio nas atividades de bancada e análises estatísticas, meu sincero OBRIGADA!

Agradeço às colaboradoras **Renata Reis Vitalli e Regina Rabelo** por responderem sempre prontamente e auxiliarem o desenvolvimento dessa e de tantas pesquisas, OBRIGADA!

Agradeço aos professores doutores **Alexandre de Paula Rogério, Ana Rita Marinho Machado e Camila Lourencini Cavellani**, por suas pertinentes contribuições durante o exame de qualificação, MUITO OBRIGADA!

Agradeço aos órgãos **CAPES, FAPEMIG, FUNEPU e UFTM** pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Agradeço aos responsáveis e colaboradores das instituições participantes do presente estudo: **Ambulatório de Dengue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Unidade de Pronto Atendimento do**

**bairro Abadia (UPA-Abadia) e Pronto-Socorro do Hospital São Marcos**, cuja anuência foi fundamental para o seu desenvolvimento.

Agradeço aos **participantes** desse estudo, por sua doação em caráter voluntário, para o bem da pesquisa e do conhecimento, MUITO OBRIGADA!

Agradeço os colegas de trabalho na Superintendência Regional de Saúde, de modo especial à **Janaína dos Santos Machado Lacerda** e **Márcia Maria de Souza** pela colaboração na realização desse trabalho e à coordenadora do Núcleo de Vigilância Epidemiológica, **Mirley Maria de Azambuja**, pela compreensão e visão técnica/profissional, meus cumprimentos e sinceros agradecimentos!

Por fim, agradeço antecipadamente aos **professores doutores titulares e suplentes** que aceitaram compor a banca para avaliação desse trabalho, por sua disponibilidade e contribuições, MUITO OBRIGADA!!!

“Mais do que de máquinas,  
precisamos de humanidade. Mais do que de  
inteligência, precisamos de afeição e doçura.  
Sem essas virtudes, a vida será de violência  
e tudo será perdido.”

Charles Chaplin  
O Grande Ditador (1940)

## RESUMO

Mecanismos imunopatológicos envolvidos no desenvolvimento de manifestações clínicas graves durante a infecção pelo vírus da dengue (DENV) ainda não são totalmente compreendidos, entretanto, verifica-se que interações monócito-endoteliais desempenham um papel central na patofisiologia da doença grave. Durante a infecção por DENV, monócitos ativados produzem fatores solúveis importantes, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 10 e 12 (IL-10 e IL-12p40) e óxido nítrico (NO), que podem ser críticos para a imunopatogênese. Estas moléculas podem ser produzidas por monócitos em resposta à estimulação do receptor toll-like 4 (TLR4). A intensidade da replicação do DENV durante o início da infecção pode contribuir para desfechos clínicos distintos, tornando-se importante conhecer o impacto de proteínas virais em alguns parâmetros da resposta imune de pacientes infectados pelo DENV, tais como a expressão de TLR4 e a produção de NO, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12p40. Uma ligação precisa entre os níveis secretados da proteína não-estrutural 1 (NS1) e possíveis alterações da resposta imune nas infecções pelo DENV ainda é obscura. O objetivo do presente estudo foi investigar as relações entre níveis *in vivo* de NS1 solúvel e parâmetros da resposta imune (expressão de TLR4 e produção de TNF- $\alpha$ , NO, IL-10 e IL-12p40) em pacientes infectados com o DENV apresentando diferentes desfechos clínicos. Em um grupo de 196 pacientes infectados pelo DENV foram avaliados os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p40 e NS1 (ELISA) e de NO (Reação de Griess). Além disto, foram avaliados em um subgrupo de 37 pacientes com dengue (apresentando diferentes desfechos clínicos) e 20 voluntários saudáveis não infectados, a produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e a expressão de TLR4 em células CD14 por citometria de fluxo. Verificou-se uma reduzida expressão de TLR4 em pacientes com dengue grave quando comparados com os pacientes com dengue clássica (DC). Foram encontrados níveis mais altos de NS1 e níveis reduzidos de NO séricos, além de uma menor resposta de TLR4 à estimulação por LPS com uma consequente redução da produção de TNF- $\alpha$  por PBMC de pacientes com dengue grave quando comparados aos pacientes com DC. Estes resultados mostram que no curso da doença dengue, alguns dos parâmetros da resposta imune sofrem alterações, dependendo da fase e da gravidade da doença. Pacientes com dengue

grave apresentaram níveis séricos mais elevados de NS1 e alterações em alguns parâmetros da resposta imune, quando comparado com pacientes com dengue clássica, o que pode contribuir para desfechos clínicos diferentes observados nas infecções por DENV em humanos.

Palavras-Chave: Dengue. Proteínas não Estruturais Virais. Óxido Nítrico. Receptor 4 Toll-Like. Fator de Necrose Tumoral alfa. Interleucina-10. Subunidade p40 da Interleucina-12.

## ABSTRACT

Immunopathological mechanism involved in the development of severe clinical manifestations during dengue virus (DENV) infection are not yet fully understood. However, it is apparent that monocyte-endothelial interactions play a central role in the pathophysiology of severe disease. During DENV infection, activated monocytes produce important soluble factors, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 10 and 12 (IL-10 and IL-12p40) and nitric oxide (NO), which might be critical to immunopathogenesis. These molecules are produced by monocytes in response to toll like receptor 4 (TLR4) stimulation. Given the fact that intensity of DENV replication during the early times of infection could determine clinical outcomes, it's important to know the impact of viral proteins on innate immune parameters of DENV infected patients, such as TLR4 expression and IL-10, TNF- $\alpha$  and NO production. A precise link between dengue nonstructural protein 1 (NS1) levels and alterations of innate immune response is still obscure. Thus, the aim of the present study was to investigate the relationships between *in vivo* dengue nonstructural protein 1 (NS1) levels and immune response parameters (TLR4 expression, IL-10, IL-12p40, TNF- $\alpha$  and NO production) on infected dengue patients with different clinical outcomes. We evaluated TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p40 and NS1 serum levels (ELISA) and NO (Griess Reaction) on a group of 196 DENV infected patients. Besides that, TNF- $\alpha$  production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and TLR4 expression on CD14+ cells (flow cytometry) were also analyzed on a subgroup of 37 dengue patients with different clinical outcomes and 20 healthy controls. We detected a lower expression of TLR4 in patients with severe dengue when compared to patients with dengue fever (DF). In addition, we also found higher NS1 and lower NO serum levels and a poor response of TLR4 to LPS (with a reduced TNF- $\alpha$  production) in PBMCs obtained from severe dengue patients when compared to DF patients. These results show that in the course of dengue disease, some innate immune parameters may changes, depending on the phase and severity of the disease. During the acute phase of DENV infection, severe dengue patients display higher serum levels of NS1 and alterations on some innate immune response parameters, that may contribute to different clinical outcomes observed on dengue virus infection in humans.

Keywords: Dengue. Viral Nonstructural Proteins. Nitric Oxide. Toll-Like Receptor 4. Tumor Necrosis Factor-alpha. Interleukin-10. Interleukin-12 Subunit p40.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Impacto econômico das epidemias de dengue em regiões do mundo	20
<b>Figura 2</b> - A mudança na distribuição dos sorotipos da dengue, 1970 e 2004	23
<b>Figura 3</b> - Casos notificados de dengue e circulação viral. MG, 1993-2013.....	24
<b>Figura 4</b> - Manifestações da infecção pelo DENV. ....	30
<b>Figura 5</b> - O curso da doença dengue .....	31
<b>Figura 6</b> - Classificação de casos de dengue, níveis de gravidade e tratamento a ser instituído.....	32
<b>Figura 7</b> - Gerenciamento de casos de dengue.....	33
<b>Figura 8</b> - Genoma do DEN V.....	34
<b>Figura 9</b> - Comparação entre os testes de diagnóstico de dengue.....	36
<b>Figura 10</b> - Linha do tempo de infecções primária e secundária por DENV. ....	37
<b>Figura 11</b> - Resposta inflamatória ao DENV .....	41
<b>Figura 12</b> - Principais atribuições do TNF- $\alpha$ 43	
<b>Figura 13</b> - Mecanismos de indução de NO durante as infecções virais .....	48
<b>Figura 14</b> - Desenho do estudo .....	53
<b>Figura 15</b> - Coleta e processamento das amostras de sangue.....	55
<b>Figura 16</b> - Ensaio Imunoenzimático .....	56
<b>Figura 17</b> - Exame Imunocromatográfico.....	57
<b>Figura 18</b> - Distribuição dos níveis séricos de proteína não estrutural 1 secretada pelo DENV durante a fase aguda.....	62
<b>Figura 19</b> - Distribuição dos níveis de proteína não estrutural 1 secretada pelo DENV durante a fase de defervescência.....	62
<b>Figura 20</b> - Níveis séricos de proteína não estrutural 1 do DENV durante a fase aguda e na fase de defervescência em pacientes com dengue clássica e dengue grave (DCC/FHD).....	63
<b>Figura 21</b> - Níveis de óxido nítrico (NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> -) em amostras de soro de pacientes com dengue clássica, dengue grave (DCC/FHD) e indivíduos saudáveis não infectados.....	63
<b>Figura 22</b> - Níveis séricos de óxido nítrico (NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> -) de amostras de grupos de pacientes infectados com DENV com baixos e altos níveis séricos de NS1 .....	64

<b>Figura 23</b> - Níveis séricos de TNF- $\alpha$ em amostras de soro de pacientes na fase aguda da infecção com dengue clássica, dengue com complicações, febre hemorrágica do dengue e indivíduos saudáveis não infectados .....	66
<b>Figura 24</b> - Níveis séricos de TNF- $\alpha$ em amostras de soro de pacientes na fase de defervescência da infecção com dengue clássica, dengue com complicações, febre hemorrágica do dengue e indivíduos saudáveis não infectados .....	66
<b>Figura 25</b> - Níveis séricos de IL-10 em amostras de soro de pacientes na fase aguda da infecção com dengue clássica, dengue com complicações, febre hemorrágica do dengue e indivíduos saudáveis não infectados.....	67
<b>Figura 26</b> - Níveis séricos de IL-10 em amostras de soro de pacientes na fase de defervescência da infecção com dengue clássica, dengue com complicações, febre hemorrágica do dengue e indivíduos saudáveis não infectados .....	67
<b>Figura 27</b> - Níveis séricos de IL-12p40 em amostras de soro de pacientes na fase aguda da infecção com dengue clássica, dengue com complicações, febre hemorrágica do dengue e indivíduos saudáveis não infectados .....	68
<b>Figura 28</b> - Níveis séricos de IL-12p40 em amostras de soro de pacientes na fase de defervescência da infecção com dengue clássica, dengue com complicações, febre hemorrágica do dengue e indivíduos saudáveis não infectados .....	68
<b>Figura 29</b> - Níveis séricos de TNF- $\alpha$ em amostras de soro de pacientes infectados com DENV com baixos e altos níveis séricos de NS1 .....	69
<b>Figura 30</b> - Níveis séricos de IL-10 em amostras de soro de pacientes infectados com DENV com baixos e altos níveis séricos de NS1 .....	69
<b>Figura 31</b> - Níveis séricos de IL-12p40 em amostras de soro de pacientes infectados com DENV com baixos e altos níveis séricos de NS1 .....	70
<b>Figura 32</b> - Produção de TNF- $\alpha$ (pg/ml) por $1 \times 10^6$ células mononucleares do sangue periférico de pacientes com dengue clássica, dengue hemorrágica e indivíduos saudáveis não infectados.....	70
<b>Figura 33</b> - Produção de TNF- $\alpha$ (pg/ml) por $1 \times 10^6$ células mononucleares do sangue periférico de grupos de pacientes infectados pelo DENV contendo com baixos e altos níveis séricos de NS1 .....	70
<b>Figura 34</b> - Expressão de TLR-4 por células CD14+ de pacientes infectados pelo DENV.....	71

<b>Quadro 1</b> - Casos confirmados de dengue clássica, dengue com complicação e febre hemorrágica por dengue em Uberaba e Região, de 2008 a 2013.....	26
<b>Quadro 2</b> - Óbitos causados por dengue, classificados como dengue com complicação e febre hemorrágica por dengue em Uberaba e Região, de 2009 a 2013 .....	26
<b>Quadro 3</b> - Classificação de casos de Dengue (WHO, 2009).....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Informações demográficas e classificação dos casos de dengue utilizados nos estudos <i>ex vivo</i> : quantificação dos níveis séricos de NS1, NO e citocinas.....	60
<b>Tabela 2</b> - Informações demográficas e classificação dos casos de dengue utilizados nos estudos <i>in vitro</i> de cultivo celular. ....	61

## LISTA DE SIGLAS

- ADE** - *Antibody-Dependent Enhancement*
- ALT** - Alanina aminotransferase
- AST** - Aspartato aminotransferase
- BCDF- $\gamma$**  - Fator de diferenciação de linfócitos B
- BSF-1** - Fator estimulador de linfócitos B
- CD14** - *Cluster of differentiation 14*
- DC** - Célula Dendrítica
- DC** - Dengue Clássico
- DCC** – Dengue com Complicações
- DENV** - Dengue Vírus
- DENV-1** - Dengue vírus sorotipo 1
- DENV-2** - Dengue vírus sorotipo 2
- DENV-3** - Dengue vírus sorotipo 3
- DENV-4** - Dengue vírus sorotipo 4
- DMSO** - Dimetil-Sulfóxido
- D-PBS** - Tampão fosfato-salino (Dulbecco)
- ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)
- eNOS** - Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- FCS** - Soro fetal bovino inativado
- FHD** - Febre Hemorrágica da Dengue
- FITC** - Isotiocianato de Fluoresceína
- HIV** - Vírus da Imunodeficiência Adquirida
- IFN** - Interferon
- IgM** - Imunoglobulina M
- IgG** - Imunoglobulina G
- IL** - Interleucina
- iNOS** - Óxido Nítrico Sintase Induzível
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- MAC-ELISA** - *IgM antibody capture ELISA*
- MTT** - Phenyltetrazolium Brometo
- NK** - Células Natural Killer
- NO** - Óxido Nítrico

**NO<sub>2</sub>** - Dióxido de Nitrogênio

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - Nitrato

**NOS** - Óxido Nítrico Sintase

**nNOS** - Óxido Nítrico Sintase Neuronal

**NS1** - Proteína não estrutural 1 do dengue vírus

**ORF** - *Open Reading Frame*

**PBMCs** - Células Mononucleares do Sangue Periférico

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)*

**PE** - Ficoeritrina

**PNCD** - Programa Nacional de Controle da Dengue

**Real Time RT-PCR** - Transcriptase Reversa PCR em Tempo Real

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**RT-PCR** - Transcriptase Reversa PCR

**SCD** - Síndrome do Choque por Dengue

**SESMG** - Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais

**SINAN** - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

**Sinan Online** - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (acesso via Internet)

**SRS/Uberaba** - Superintendência Regional de Saúde de Uberaba

**SSC** - *Side Scatter*

**TH<sub>1</sub>** - *T helper cell type 1*

**TH<sub>2</sub>** - *T helper cell type 2*

**THP-1** - linha de célula monocítica humana derivada de paciente com leucemia aguda

**TLRs** - Receptores Toll-like

**TLR4** - Receptor Toll 4

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

**UPA** - Unidade de Pronto-Atendimento

## SUMÁRIO

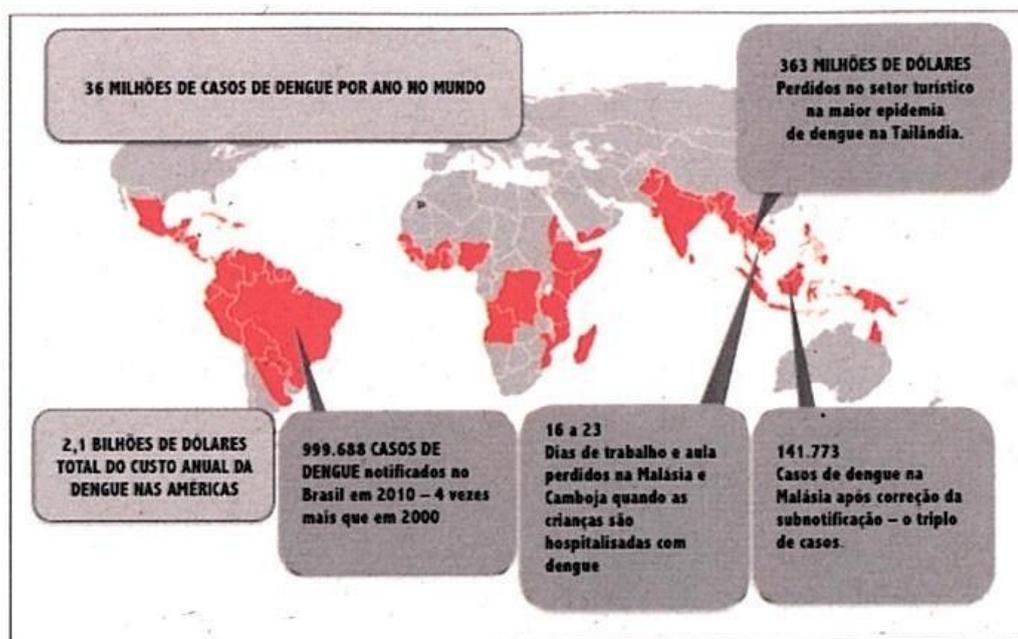
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 A EVOLUÇÃO DA DENGUE NAS AMÉRICAS E NO BRASIL .....	21
1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	24
1.3 A QUESTÃO AMBIENTAL E A PRESENÇA DO MOSQUITO VETOR .....	27
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	29
1.5 DENGUE VÍRUS .....	33
1.6 EXAMES LABORATORIAIS .....	35
1.7 A RESPOSTA IMUNOLÓGICA .....	38
<b>1.7.1 Interferon (IFN)</b> .....	42
<b>1.7.2 Fator de necrose tumoral <math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</b> .....	42
<b>1.7.3 Interleucina-10 (IL-10)</b> .....	43
<b>1.7.4 Interleucina-12 (IL-12)</b> .....	44
<b>1.7.5 Interleucina-4 (IL-4)</b> .....	44
1.8 ÓXIDO NÍTRICO E DENGUE .....	44
<b>1.8.1 O óxido nítrico</b> .....	44
<b>1.8.2 Papel do óxido nítrico no sistema imune</b> .....	46
<b>1.8.3 Papel do óxido nítrico durante uma infecção viral</b> .....	47
<b>1.8.4 Papéis do óxido nítrico na definição da infecção como dengue clássica ou grave (FHD, DCC, SCD)</b> .....	49
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	51
2.1 OBJETIVO GERAL .....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
<b>3 PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	52
3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO .....	54
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	54
3.3 GRUPO DE ESTUDO E CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS .....	54
3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE .....	54
3.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE DENGUE .....	55
3.6 DOSAGEM DE CITOCINAS .....	55
3.7 NÍVEIS SÉRICOS DE NS1 .....	57
3.8 ISOLAMENTO E ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs) .....	57

3.9 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	58
3.10 QUANTIFICAÇÃO DE TNF- $\alpha$ EM SOBRENADANTES DE CULTURA.....	58
3.11 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO SÉRICO. ....	58
3.12 CITOMETRIA DE FLUXO. ....	59
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	59
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
4.1 CASUÍSTICA.....	60
4.2 ESTUDOS <i>ex vivo</i> : NÍVEIS SÉRICOS DE NS1, NO E CITOCINAS .....	61
<b>4.2.1 Quantificação de NS1 sérico .....</b>	<b>61</b>
<b>4.2.2 Níveis séricos de NO.....</b>	<b>61</b>
4.2.2.1 <i>Níveis séricos de NO e forma clínica.....</i>	61
4.2.2.2 <i>Níveis séricos de NO e quantificação de NS1 .....</i>	63
<b>4.2.3 Níveis séricos de citocinas.....</b>	<b>64</b>
4.2.3.1 <i>Níveis séricos de citocinas e forma clínica .....</i>	64
4.2.3.2 <i>Níveis séricos de citocinas e quantificação de NS1 .....</i>	67
4.3 ESTUDOS DE CULTIVO CELULAR <i>in vitro</i> : EXPRESSÃO DE TLR4 E PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ .....	69
<b>4.3.1 Estimulação do TLR4 e produção de TNF-<math>\alpha</math>, níveis séricos de NS1 e forma clínica .....</b>	<b>69</b>
<b>4.3.2 Expressão de TLR4 por células CD14 + .....</b>	<b>70</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença dengue é um grave problema de saúde pública, sendo considerada uma das mais importantes arboviroses que acometem seres humanos. Estima-se que cerca de 50 milhões de novas infecções pelo vírus da dengue e que em torno de 500 mil hospitalizações por casos graves de dengue ocorram anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; GUZMÁN et al., 2010). Historicamente, a dengue vem sendo considerada debilitante, mas não uma doença fatal. Entretanto, durante a década de 60, estudos relataram a ocorrência de casos fatais de dengue em crianças no sudeste da Ásia, iniciando a mudança dessa percepção (SRIKIATKHACHORN et al., 2011). A taxa de letalidade, nesses casos, é de aproximadamente 5%, principalmente em pessoas menores de 15 anos (GUZMÁN, KOURI, 2003; NOISAKRAN, PERNG, 2008). O impacto econômico nas regiões afetadas por epidemias é preocupante, uma vez que o grande número de indivíduos doentes interfere nas atividades produtivas (figura 1) (SHEPARDI et al., 2011).

Figura 1 – Impacto econômico das epidemias de dengue em regiões do mundo.



Fonte: SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.

Os mecanismos imunopatológicos que conduzem ao desenvolvimento das formas severas ainda não são totalmente conhecidos, mas estão envolvidos na

interface vírus, células vasculares e resposta imunológica (AZEREDO et al., 2010). Em áreas endêmicas de dengue com circulação viral dos quatro sorotipos há infecção concorrente de mais de um sorotipo, aumentando ainda mais o risco da ocorrência de formas graves da doença. Esforços intensivos têm sido movidos em vários países para se estudar a patogênese da infecção por dengue, com vistas a identificar as mais relevantes causas das formas graves e contribuir para o atendimento adequado aos doentes, identificação de marcadores de evolução para a gravidade e redução da taxa de letalidade (CHATURVEDI, NAGAR, 2009).

Interações monócito-endoteliais têm um papel fundamental na fisiopatologia da doença grave. Durante uma infecção pelo vírus da dengue (DENV), monócitos ativados produzem fatores solúveis importantes como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e o Óxido Nítrico (NO), que podem ser críticos para a imunopatogênese (BRAGA et al., 2001; VALERO et al., 2002; YEN et al., 2008). Estas moléculas podem ser produzidas por monócitos e macrófagos ativados em resposta à estimulação do receptor Toll 4 (TLR4) (ESSAKALLI et al., 2009).

O Dengue vírus (DENV), por sua vez, sintetiza uma poliproteína que é clivada em dez proteínas virais, sendo três estruturais e sete não estruturais (MUKHOPADHYAY et al., 2005; NOISAKRAN, PERNG, 2008; GUZMAN et al., 2010; MURPHY, WHITEHEAD, 2011). Dentre as proteínas não estruturais, destaca-se a NS1, por circular em altos níveis no soro de pacientes com dengue, sendo detectada durante o curso clínico da doença, principalmente durante a fase aguda. Desse modo, acredita-se que a mesma possa apresentar papel importante na patofisiologia das infecções pelo DENV, mas uma conexão precisa entre seus níveis circulantes e alterações de diversos parâmetros da resposta imune inata ainda permanece obscura.

### 1.1 A EVOLUÇÃO DA DENGUE NAS AMÉRICAS E NO BRASIL

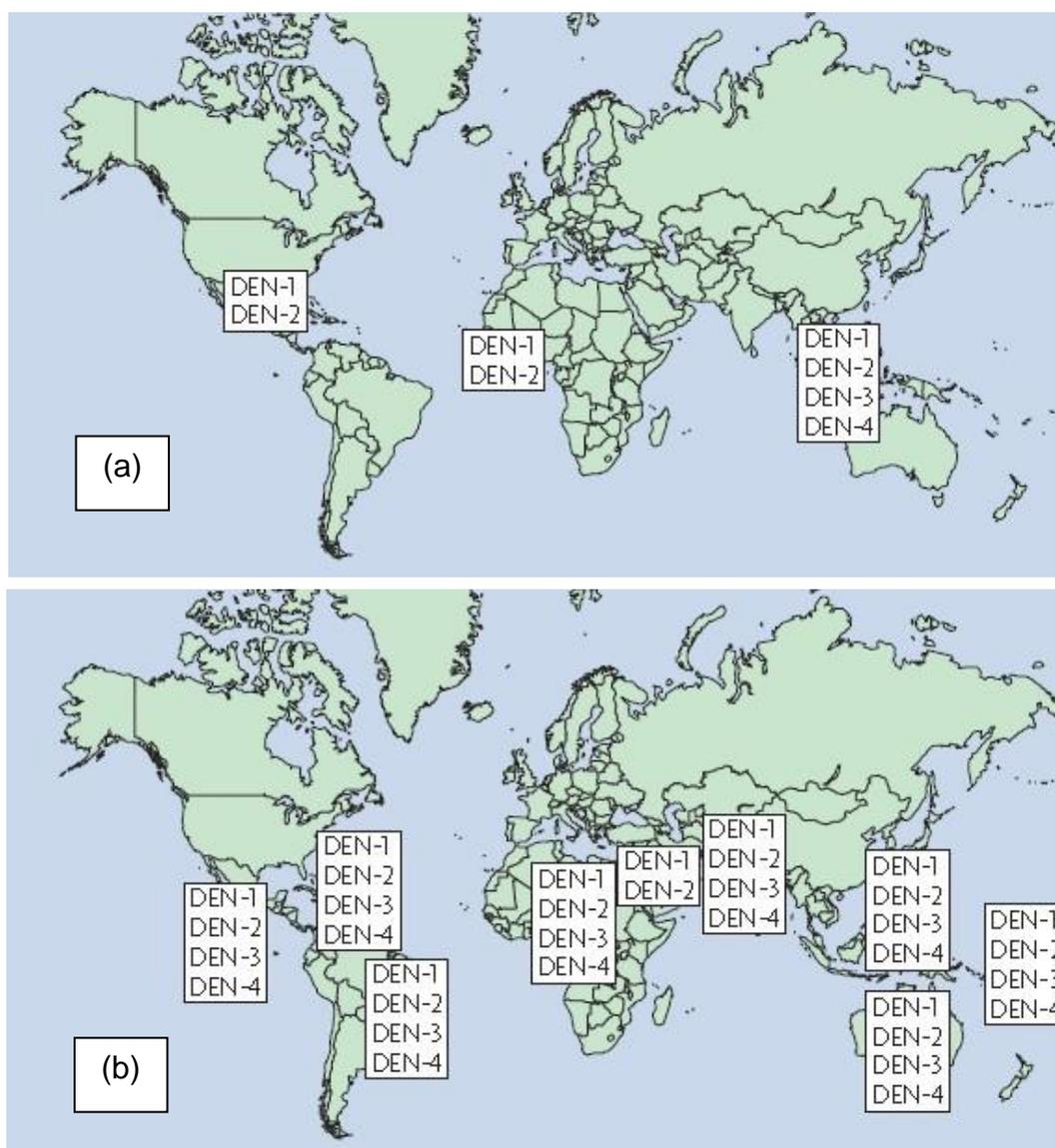
Segundo GLUBER (1998), a dengue era uma doença restrita aos países asiáticos, sendo que a atual pandemia teria iniciado nos países do Pacífico durante e após a Segunda Guerra Mundial. Na década de 60, a doença se disseminou pelas Américas, devido à presença do mosquito vetor, inicialmente com uma epidemia no Caribe e Venezuela e, na década de 70, na Colômbia. A interrupção da transmissão da dengue em grande parte das Américas resultou de uma campanha de erradicação do *A. aegypti*, principalmente durante a década de 1960 e início de 1970. No entanto,

as medidas de vigilância e controle do vetor não foram sustentadas e havia reinfestações subseqüentes do mosquito, seguidas por epidemias no Caribe, América Central e América do Sul. A dengue, desde então, se espalhou com epidemias cíclicas que ocorrem a cada 3 - 5 anos. A maior delas ocorreu em 2002 com mais de 1 milhão de casos relatados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O Brasil manteve-se livre da presença do mosquito vetor até 1976, ocorrendo posterior reinfestação de áreas urbanas que contribuiu para a introdução do vírus da dengue em 1981, no Estado de Roraima e, em 1986, no Estado do Rio de Janeiro. A partir daí, tornou-se uma infecção endêmica com epidemias anuais acometendo milhares de pessoas (MASSAD et al., 2001). Nas últimas décadas, tem-se observado o aumento da densidade do vetor, a circulação simultânea de vários sorotipos, o aparecimento de formas graves da doença e aumento da taxa de letalidade (GUZMAN; KOURI, 2003). Esses fatos corroboram a importância da doença nas Américas e, mais especificamente, no Brasil (OLIVEIRA, 2012). A figura 2 apresenta a distribuição global dos sorotipos da dengue em dois momentos, em 1970 (a) e em 2004 (b) (GUZMAN et al, 2010).

No Brasil, em 1981, ocorreu uma epidemia de dengue clássica no Estado de Roraima pelo sorotipo 1, que foi introduzido no Estado do Rio de Janeiro quatro anos depois, em 1986. A partir de então a doença ganhou importância epidemiológica, com a circulação do sorotipo 1 no território nacional. Até 1990, as epidemias estavam restritas a alguns estados do nordeste e sudeste, quando ocorreu a introdução do sorotipo 2 também no Rio de Janeiro. Entretanto, ao final da década de 90, já haviam sido identificadas três epidemias: 1986-1987, 1990-1991 e 1997-1998. No ano de 2000, o sorotipo 3 começou a circular simultaneamente aos outros sorotipos no Rio de Janeiro, dando início a mais uma epidemia em 2002; já o sorotipo 4, que teve uma curta circulação em 1982 restrita à região amazônica, voltou a ser registrado no território nacional em 2008, quando foi identificado em três casos na cidade de Manaus e, posteriormente, em 2010, com o surgimento de casos autóctones em Roraima e, em sequência, na região sudeste (SIQUEIRA et al., 2005; BRAGA, VALE, 2007; NOGUEIRA et al., 2007; BRASIL, 2008; OLIVEIRA, 2012).

Figura 2 – A mudança na distribuição dos sorotipos da dengue, 1970 e 2004.



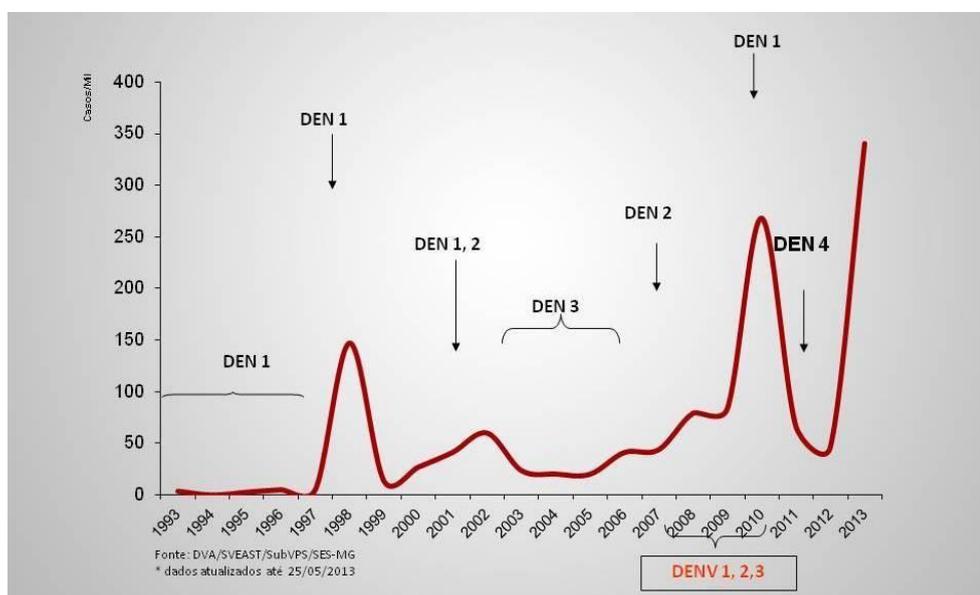
Fonte: Adaptado de GUZMAN, et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews – Microbiology**, December, p. S7-S16, 2010.

Estudos epidemiológicos realizados em 2008 e 2011 apontaram as seguintes diferenças, com relação aos tipos de vírus circulantes: em 2008, o sorotipo circulante mais frequente no país foi o DENV-3, detectado em 66% dos pacientes infectados, seguido pelo DENV-2, com uma frequência de 31% e pelo DENV-1, presente em apenas 2% dos casos; já em 2011, o DENV-1 foi identificado em 86,2% dos casos genotipados, DENV-2 em 10,1%, DENV-3 em 0,9% e DENV-4 em 2,8%. Esse fato pode ser explicado pela imunidade dos pacientes ao sorogrupo responsável pela infecção (BRASIL, 2008; OLIVEIRA, 2012; BRASIL, 2010; BRASIL, 2013).

A Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais identificou a transmissão simultânea do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 a partir de 2008, que contribuiu para o aumento da transmissão de dengue e ocorrência de maior número de casos na forma grave, identificando ainda, em 2011, a reintrodução do sorotipo DENV-4, através dos exames de uma paciente residente em Frutal, município da Regional de Uberaba, sendo identificado em Conceição das Alagoas em 2012 e em Delta, em 2013. Esse sorotipo não circulava no Estado há quase 30 anos, assim, a maior parte da população com menos de 30 anos de idade está mais susceptível à infecção pelo vírus (SESMG, 2013).

A figura 3 apresenta o número de casos notificados de dengue e a circulação viral em Minas Gerais, de 1993 a 2013, que evidencia as duas epidemias, em 1998 e 2010, pelo DENV-1, a introdução do DENV-2 em 2001, o predomínio das infecções pelo DENV-3 de 2002 a 2006, a simultaneidade da circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 de 2008 a 2010 e a introdução do DENV-4 em 2011.

Figura 3 - Casos notificados de dengue e circulação viral. Minas Gerais, 1993-2013.



Fonte: DVA/SVEAST/SubVPS/SES-MG

Nota: Dados atualizados em maio/2013

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

A dengue é a doença viral humana mais frequentemente transmitida por vetor. Dois quintos da população mundial está em risco e um número estimado de 50 a 100 milhões de casos ocorrem a cada ano no mundo. A Organização Mundial de Saúde

aponta o Brasil como o país com o maior número de casos registrados de dengue em todo o mundo, com 61% de todos os casos, sendo que, nos últimos anos, mais de cem países foram atingidos por epidemias de dengue clássica ou grave (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; TEIXEIRA et al., 2009; OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA-PINTO et al., 2012).

A dengue é uma doença com característica sazonal; no Brasil, este período coincide com o verão, devido à maior ocorrência de chuvas e aumento da temperatura. O maior número de notificações em Minas Gerais ocorre entre novembro e maio (SESMG, 2013), mas dados nacionais apontam que cerca de 70% dos casos concentram-se entre janeiro e maio, com exceção das Regiões Norte e Nordeste, onde as chuvas começam tardiamente, em março, e se estendem até julho. Apesar disso, o país tem condições climáticas favoráveis para a proliferação do mosquito durante todo o ano (BRASIL, 2013). A região sudeste desponta com o maior número de notificações. O Estado de Minas Gerais, com 853 municípios, 13 macrorregiões e 27 unidades regionais de saúde apresenta cerca de 663 municípios (cerca de 78%) comprovadamente infestados pelo vetor transmissor da dengue (ANEXO A).

Em 2011, o Ministério da Saúde identificou 106 municípios prioritários para o controle da dengue em Minas Gerais, sendo que seis destes estão na jurisdição da Superintendência Regional de Saúde de Uberaba: Araxá, Conceição das Alagoas, Delta, Frutal, Limeira do Oeste e Uberaba (SESMG, 2012b; ANEXO B). De 2008 a 2013, foram confirmados 705079 casos de dengue clássico em Minas Gerais, 527 casos de febre hemorrágica da dengue e 2380 casos de dengue com complicações, sendo que 303 pessoas evoluíram para óbito (SESMG, 2014). Até esse ano, adotava-se a classificação da Organização Mundial de Saúde de 1997 (WHO, 1997), considerando-se as formas clássica, hemorrágica e com complicações. Em Uberaba, em 2013, ocorreram vinte óbitos confirmados por dengue, sendo o município com maior número de óbitos no Estado (19,04%), superando Belo Horizonte (7,6%). Uberaba é um dos municípios com alta transmissão da doença, uma vez que apresenta, em média, coeficiente de incidência superior a 300 casos/100.000 habitantes (SESMG, 2012a) e é o município com melhor estrutura assistencial dentre os demais municípios nesta e das outras duas microrregiões (ANEXO C).

O quadro 1 retrata a situação epidemiológica de Uberaba e Região, de 2008 a 2013. Os casos de dengue com complicação e de febre hemorrágica por dengue são

considerados casos de dengue grave, na nova classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde de 2009 (WHO, 2009). Além desses, foi classificado apenas um caso como síndrome do choque da dengue, em 2013, no município de Delta, pertencente à Regional de Uberaba, sendo possível sua consulta no sistema do Ministério da Saúde denominado Sinan Online. Os dados da SRS/Uberaba referem-se aos vinte e sete municípios da jurisdição da Regional, inclusive Uberaba, que foi destacado por ser o município pólo com o maior número de casos e habitantes. Já o quadro 2 indica os óbitos causados por dengue em Uberaba e Região, de 2009 a 2013, uma vez que em 2008 não foi registrado nenhum óbito. Os valores são apresentados em número absoluto de casos, uma vez que não se justifica a apresentação dos valores relativos (por 100 mil habitantes), considerando-se que o tamanho da população não sofreu aumento significativo no período, ao contrário do número de casos confirmados.

Quadro 1 - Casos confirmados de dengue clássica, dengue com complicação e febre hemorrágica por dengue em Uberaba e Região, de 2008 a 2013.

Ano	Dengue Clássica		Dengue com Complicação		Febre Hemorrágica por Dengue	
	Uberaba	SRS Uberaba	Uberaba	SRS Uberaba	Uberaba	SRS Uberaba
2008	74	350	0	22	0	1
2009	478	1540	2	10	1	1
2010	2416	4918	2	10	0	0
2011	1554	2004	3	5	1	2
2012	2614	3361	3	5	1	2
2013	12566	19920	40	58	7	10

Fontes: SinanOnline e DVA/SVEAST/SubVPS/SES-MG.

Quadro 2 - Óbitos causados por dengue, classificados como dengue com complicação e febre hemorrágica por dengue em Uberaba e Região, de 2009 a 2013.

Ano	Óbitos - Dengue com Complicação		Óbitos - Febre Hemorrágica por Dengue	
	Uberaba	SRS Uberaba	Uberaba	SRS Uberaba
2009	1	2	0	0
2010	1	1	0	0
2011	3	3	0	0
2012	2	2	1	2
2013	17	22	3	3

Fontes: SinanOnline e DVA/SVEAST/SubVPS/SES-MG.

### 1.3 A QUESTÃO AMBIENTAL E A PRESENÇA DO MOSQUITO VETOR

As mudanças demográficas e sociais que ocorreram de modo acelerado nos últimos 50 anos têm sido apontadas como as principais causas do aumento do número de casos de dengue. O aumento populacional, associado à urbanização descontrolada e não planejada, presença de moradias deficientes, aumento da densidade demográfica, deterioração da água e precariedade dos sistemas de esgoto têm criado condições ideais para o aumento das doenças transmitidas por mosquitos em centros urbanos tropicais, especialmente em países em desenvolvimento (OLIVEIRA, 2012). O Brasil, além dos problemas sociais anteriormente mencionados, registra todos os fatores ideais que explicam a alta taxa de transmissão da doença: número de cidades infestadas pelo mosquito vetor, mobilidade da população, introdução e co-circulação dos diferentes sorotipos virais. A presença do mosquito vetor, somada à sua alta capacidade de adaptação aos locais habitados pelo homem, relacionados principalmente à sua organização \_ ou desorganização \_ urbana, tornam a doença dengue um dos principais problemas do mundo contemporâneo (TEIXEIRA et al., 1999, SIQUEIRA et al., 2005).

A dengue é uma virose transmitida por mosquitos da subfamília *Culicinae*, tribo *Aedini*, gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia*, sendo que as espécies importantes para a transmissão da doença são *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e alguns membros do grupo *A. scutellaris* (GLUBER, 1998). O *A. aegypti* e o *A. albopictus* são as espécies de importância epidemiológica nas Américas, mas o *A. aegypti* é considerado o principal responsável pela transmissão de dengue no Brasil, transmitindo também a febre amarela. Este mosquito é originário da África, onde adquiriu a capacidade de se adaptar ao ambiente urbano, tornando-se antropofílico e dispersando-se juntamente com o processo migratório (OLIVEIRA, 2012). No Brasil, sua introdução ocorreu no período colonial, estando relacionado ao tráfico de escravos dos países africanos. Entretanto, por causa das intensas campanhas de combate à febre amarela em meados de 1950, o *A. aegypti* foi considerado erradicado no país, mas voltou a ser encontrado no Estado do Pará, em 1967, no Estado do Rio de Janeiro, em 1977, e em Roraima no início da década de 80, decorrente da deficiência do sistema de vigilância e controle de zoonoses dos países vizinhos, como Guianas e Venezuela (CONSOLI, OLIVEIRA, 1994).

Os países tropicais e sub-tropicais já trazem consigo as características climáticas propícias para o desenvolvimento do vetor, considerando as estações

chuvosas e o calor. O clima afeta o comportamento do mosquito, uma vez que a baixa umidade diminui a sobrevivência da forma adulta, diminuindo também a proporção daqueles que atingem o estágio capaz de transmitir a doença. A associação entre chuva e abundância do vetor varia entre as regiões devido à disposição dos habitat disponíveis para a sobrevivência das larvas e as práticas de estocagem de água da população local (JANSEN, BEEBE, 2010). Embora possa manter uma população considerável durante as estações menos chuvosas, à custa dos criadouros semipermanentes principalmente quando há o descuido das autoridades governamentais e dos cidadãos, é durante a estação chuvosa que o mosquito vetor consegue alcançar níveis elevados de infestação e, conseqüentemente, altos índices de transmissão viral (CONSOLI, OLIVEIRA, 1994; OLIVEIRA, 2012).

A proliferação do *A. aegypti* é feita pela deposição de ovos em coleções de água no domicílio e peridomicílio, onde sua fase larvária se desenvolve. Os chamados criadouros de mosquitos são recipientes que possibilitam o acúmulo de água, como tanques de armazenamento, vasilhames temporários (garrafas de plástico e de vidro, potes, latas), utensílios descartados a céu aberto como lixo, pneus, vasos de plantas e outros. Desse modo, o mosquito vetor encontra um ambiente favorável para se proliferar, que passa de criadouro para foco, e a transmissão do vírus da dengue é facilitada pela proximidade física entre mosquito e seres humanos (BARRETO, TEIXEIRA, 2008).

Assim, a dinâmica da transmissão da dengue é influenciada por diversos fatores ambientais: presença do vírus e do vetor, disposição de locais para oviposição e desenvolvimento do vetor, variáveis climáticas, comportamentais e sociais, sendo as duas últimas ligadas diretamente ao hospedeiro. Entretanto, há de se lembrar de que, no Brasil, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), em vigor desde 2002, assume atualmente um caráter de política de saúde pública permanente, demandando ainda mais custos, somados àqueles gerados pela doença por si, resultados do absenteísmo laboral e escolar, do enfraquecimento das atividades turísticas e da sobrecarga do sistema de saúde, comprometendo toda a cadeia produtiva, principalmente nos períodos de epidemia (POLONI, 2013).

Portanto, é fundamental tanto a participação efetiva da população quanto das esferas de governo no controle da dengue. Estudos recentes realizados no estado de Minas Gerais indicam que mais de 80% dos focos do mosquito *A. aegypti* encontram-

se dentro dos domicílios, apontando a importância da conscientização de todos sobre a gravidade do problema (SESMG, 2013).

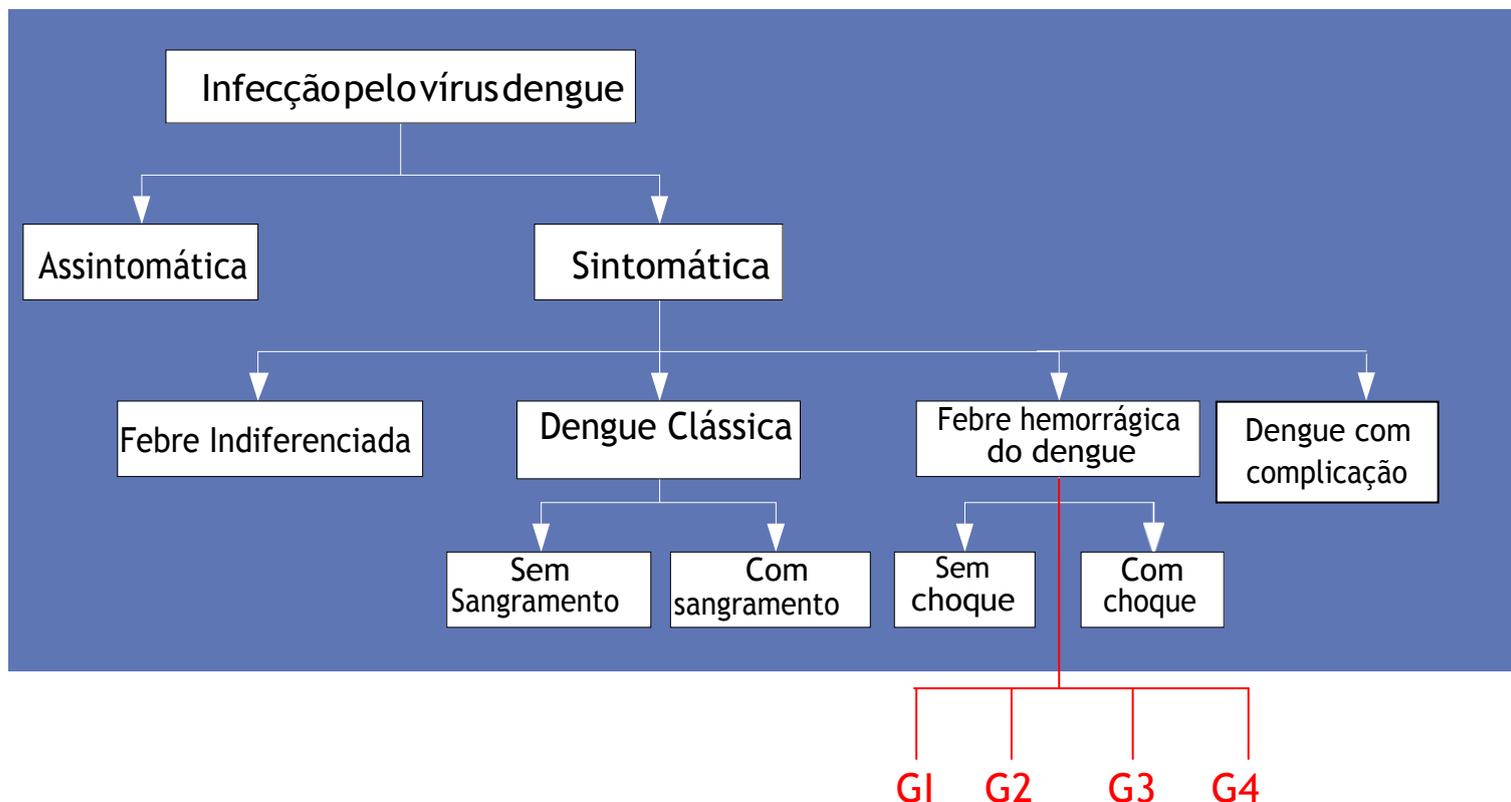
#### 1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Foram descritos quatro sorotipos do vírus da dengue, que são capazes de causar diferentes espectros de sintomas, variando de acordo com os fatores citados anteriormente. Uma infecção com um sorotipo leva à imunidade ao longo da vida para aquele sorotipo, mas a uma imunidade parcial e temporária para os demais. A circulação de mais de um sorotipo pode aumentar o risco de infecções de maior gravidade, descritas como febre hemorrágica por dengue e síndrome do choque da dengue (WHO, 1997). Entretanto, a infecção com qualquer sorotipo pode causar formas mais brandas (assintomática, indeterminada, clássica) ou graves (hemorrágicas, com complicações, choque, dentre outros) (WHO, 1997; NOISAKRAN, PERNG, 2008).

A Organização Mundial de Saúde propôs uma classificação, em 1997 (WHO, 1997) (figura 4), que considerava, com base em achados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, os casos de dengue como Dengue Clássica (DC), Febre Hemorrágica por Dengue (FHD), Síndrome do Choque da Dengue, atribuindo ainda subdivisões para os casos de FHD conforme sua gravidade (G1, G2, G3, G4) e instituindo o termo dengue com complicações (DCC) para aqueles casos que, apesar de graves, não apresentavam critérios suficientes para serem considerados hemorrágicos ou com choque. Entretanto, por dificuldades enfrentadas pelos profissionais de saúde na rotina dos serviços em classificar corretamente os casos, e, com vistas a padronizar condutas clínicas, essa classificação veio a ser revista em 2009 (WHO, 2009).

A classificação de 2009 foi elaborada com vistas a facilitar a compreensão, atendimento clínico aos doentes, notificação adequada dos casos e comparações internacionais (WHO, 2009). Esta classificação foi adotada pelo Brasil a partir de janeiro de 2014 em substituição à anterior, entretanto, ressalta-se que a mesma tem maior relevância para a intervenção clínica do que para o diagnóstico, com vistas ao atendimento oportuno dos pacientes e redução da taxa de letalidade, não sendo ainda completamente recomendada para uso em pesquisas (MACEDO et al., 2014).

Figura 4 – Manifestações da infecção pelo DENV



Fontes: WHO, 1997; Rocha, L. A. Dengue: diretrizes clínicas do Ministério da Saúde. II Seminário Dengue, FIOCRUZ, 2010.

Os sintomas da dengue começam a aparecer após um período de incubação de 5 a 8 dias. A doença apresenta uma fase aguda, inicial, febril, que corresponde ao período de viremia, que costuma durar em média até quatro dias. No curso natural da doença temos, entre o terceiro e o sexto dia (período de defervescência da febre), um período crítico, caracterizado pela queda da viremia e da temperatura, com disfunção orgânica causada pelo período anterior de desidratação, com queda na contagem de plaquetas e aumento do hematócrito (WHO, 2012) (quadro 3).

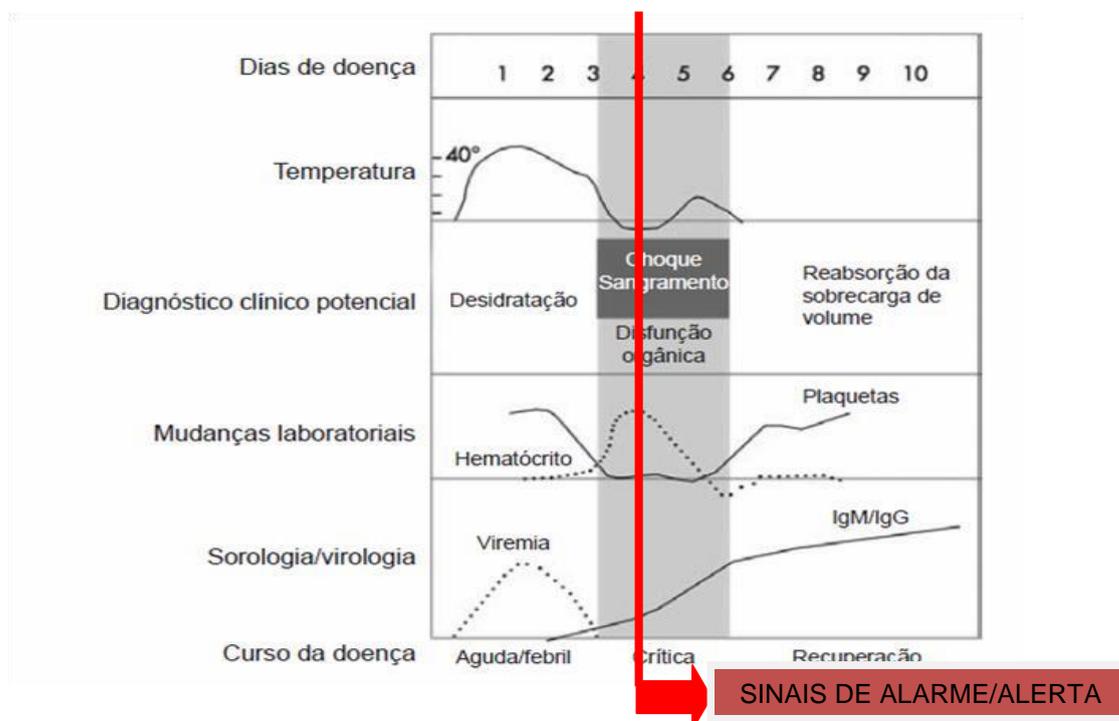
Em alguns casos podem ocorrer choque e/ou sangramento e o paciente evoluir para formas graves da doença. Caso o paciente esteja sendo adequadamente monitorado por equipe de saúde, esses sinais de alarme (alerta) serão detectados precocemente, evitando a evolução do caso para a hipotensão, extravasamento plasmático, choque e óbito (WHO, 2012) (figura 5).

Quadro 3 – Classificação de casos de Dengue

Dengue com/sem sinais de alarme		Dengue Grave
<p><b>Dengue provável:</b></p> <p>Morar ou viajar para área endêmica de dengue</p> <p>Febre com dois ou mais dos seguintes critérios:</p> <p>Náuseas/vômito</p> <p>Exantema</p> <p>Artralgia e mialgia</p> <p>Prova do laço+</p> <p>Leucopenia</p> <p>Algum sinal de alarme</p> <p>Exame laboratorial (específico) confirmado</p>	<p><b>Com sinais de alarme*:</b></p> <p>Dor abdominal</p> <p>Vômito persistente</p> <p>Evidência clínica de acúmulo de fluido</p> <p>Sangramento em mucosa</p> <p>Letargia/irritabilidade</p> <p>Aumento do fígado &gt;2cm</p> <p>Exame laboratorial inespecífico:</p> <p>↑Hematócrito simultâneo com ↓Plaquetas</p> <p><b>*Exige observação rigorosa e intervenção médica</b></p>	<p><b>Extravasamento plasmático grave evoluindo para:</b></p> <p><b>Choque</b></p> <p>Acúmulo de fluido com desconforto respiratório</p> <p><b>Hemorragia grave</b> (definido pelo médico)</p> <p><b>Envolvimento grave de órgãos:</b></p> <p>Fígado: AST/ALT ≥ 1000</p> <p>SNC: alteração da consciência</p> <p>Coração e outros órgãos</p>

Fontes: WHO, 2012; Rocha, L. A. Dengue: diretrizes clínicas do Ministério da Saúde. II Seminário Dengue, FIOCRUZ, 2010.

Figura 5 – O curso da doença dengue

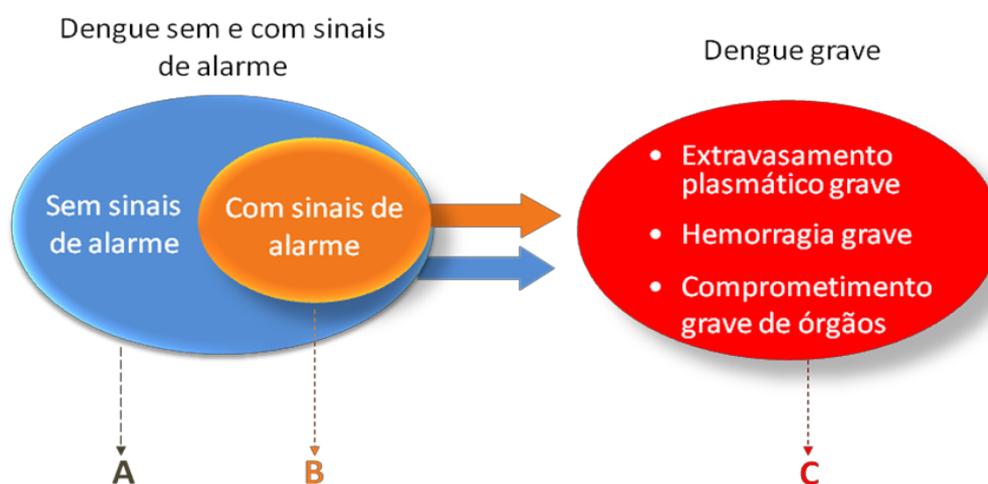


Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** [Internet]. New edition. Geneva: WHO: 2009. [cited 2011 Mar 1] por Frederico Figueiredo Amâncio. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)

Os sinais de alarme/alerta devem ser rotineiramente pesquisados, e os pacientes orientados a procurar a assistência médica na ocorrência deles. Em geral, os sinais de alarme anunciam a perda plasmática e a iminência de choque. O sucesso do tratamento do paciente com dengue está no reconhecimento precoce dos sinais de alarme. O período de extravasamento plasmático e choque leva de 24 a 48 horas, devendo o médico estar atento à rápida mudança das alterações hemodinâmicas (BRASIL, 2009; BRASIL, 2011).

A conduta da equipe de profissionais dependerá das manifestações clínicas e de outras circunstâncias relacionadas ao serviço: os pacientes podem ser enviados para casa (Grupo A); ser encaminhados para um hospital (Grupo B); ou necessitarem de tratamento de emergência e encaminhamento urgente (Grupo C) (figura 6) (WHO, 2012). Entretanto, no Brasil adota-se o gerenciamento de casos de dengue segundo quatro grupos, descritos na figura 7 (BRASIL, 2011).

Figura 6 Classificação de casos de dengue, níveis de gravidade e tratamento a ser instituído.



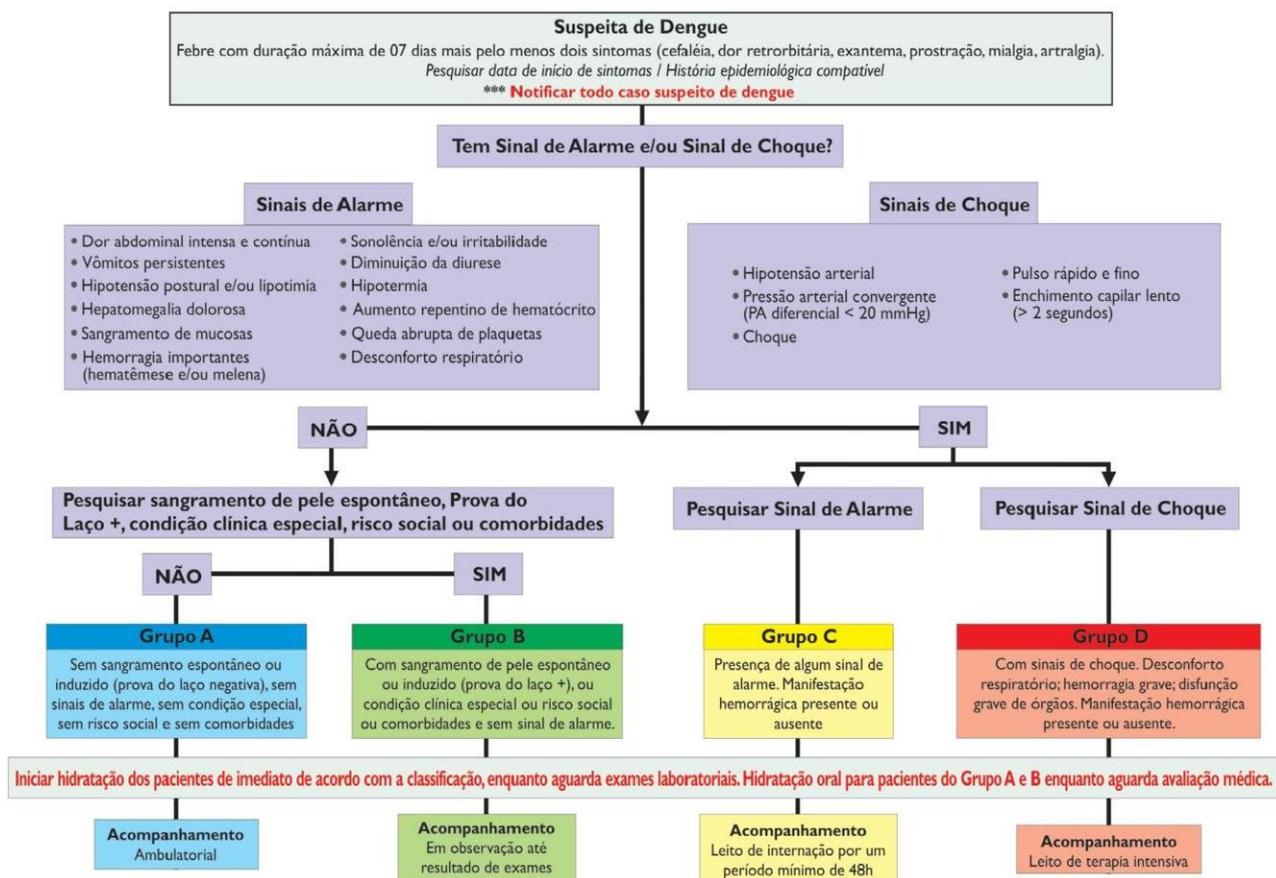
14

Fontes: WHO, 2012; Rocha, L. A. Dengue: diretrizes clínicas do Ministério da Saúde. II Seminário Dengue, FIOCRUZ, 2010.

Para atender a nova classificação, o Ministério da Saúde alterou a ficha de investigação de Dengue no SINAN – Sistema de Informação de Agravos de

Notificação, a ser utilizada em todo território nacional a partir de janeiro/2014 (ANEXOS E e F).

Figura 7 - Gerenciamento de casos de Dengue



Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 80 p.

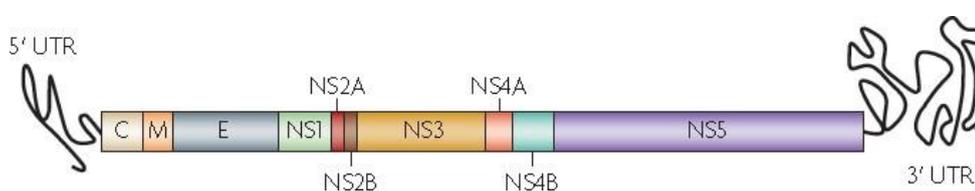
Importante lembrar que existem outras classificações para as formas graves da doença, como a proposta por AZEREDO et al. (2010), que indicam que trombocitopenia igual ou inferior a 50.000/mm<sup>3</sup> já é um sinal de gravidade.

### 1.5 DENGUE VÍRUS

O vírus causador da doença dengue é um arbovírus, pois sua transmissão é decorrente da picada de artrópodes. É um dos principais representantes da família *Flaviviridae*, sendo um vírus envelopado, com genoma de RNA de fita simples e senso positivo (MURRAY et al., 2006).

A fita de RNA que constitui seu genoma tem cerca de 10,8 kb e contém uma única fase aberta de leitura (Open Reading Frame – ORF). Seu material genético expressa uma longa poliproteína que, posteriormente, é processada por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais (capsídeo [C], proteína da membrana [M] e glicoproteína do envelope viral [E]) e, pelo menos, sete proteínas não-estruturais, essenciais na replicação do vírus (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (figura 8).

Figura 8 – Genoma do DEN V



Fonte: GUZMAN, et al. Dengue: a continuing global threat. **NATURE REVIEWS – MICROBIOLOGY**, December, p. S7-S16, 2010.

A NS1 é uma glicoproteína viral pouco comum, uma vez que não forma parte da estrutura do vírion, mas é expressa na superfície das células de hospedeiros mamíferos infectadas, não sendo encontrada em células de mosquitos vetores. A NS1 circula em altos níveis no soro de pacientes com dengue durante toda a fase clínica da doença e ainda nos primeiros dias de convalescença, sendo um marcador bem conhecido de diagnóstico precoce da infecção (MULLER, YOUNG, 2013). O fato da NS1 circular em altos níveis na corrente sanguínea dos pacientes com dengue durante a fase aguda da doença sugere que essa proteína pode contribuir, por si só, para a patofisiologia das infecções por DENV. A regulação dos monócitos por receptores Toll-like (TLRs) durante a doença pode, hipoteticamente, ser afetada pelas proteínas virais, entre elas a NS1 ou outras moléculas endógenas. Enquanto a função da NS1 não está ainda completamente definida, evidências prévias têm apontado o seu envolvimento na replicação do RNA viral (MULLER, YOUNG, 2013). Entretanto, um “link” preciso entre os níveis séricos de NS1 e a perturbação da resposta imune com alteração da permeabilidade vascular, que caracterizam a forma severa da doença, ainda permanece obscuro.

A replicação viral é lenta e inicia cerca de quinze horas após a infecção (NOISAKRAN, PERNG, 2008). O genoma do DENV contém regiões não traduzidas

(UTR) flanqueando a 3' e 5' a ORF, que tem papel fundamental na regulação da tradução e replicação do genoma. A UTR-5' é relativamente curta (aproximadamente 100 nucleotídeos) e tem uma estrutura *cap* tipo I; a UTR-3' é maior e contém várias estruturas conservadas de RNA apesar da ausência de uma sequência poliA. O vírion tem aproximadamente 50nm de diâmetro e contém as três proteínas estruturais (C, M, E) e o genoma de RNA. A superfície do genoma é formada por 180 cópias da glicoproteína E mais o envelope, resultado do brotamento dentro das vesículas intracelulares e não da superfície da célula (MUKHOPADHYAY et al., 2005; NOISAKRAN, PERNG, 2008; GUZMAN et al., 2010; MURPHY, WHITEHEAD, 2011).

O DENV apresenta quatro sorotipos antígenicamente distintos conhecidos como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Cada sorotipo contém uma abundante variação genética e pode ser subdividido em subtipos ou genótipos. Essa grande diversidade genética pode ser explicada pela alta taxa de mutações relacionada à enzima RNA-polimerase-RNA-dependente. Assim, cada um dos sorotipos apresenta vários genótipos diferentes, identificados pela análise da sequência do gene E/NS1. A variação dos genótipos pode também ser causada pela distribuição geográfica dos mesmos, resultando, por exemplo, em genótipos asiáticos, americanos, europeus. Outro aspecto que deve ser mencionado é o quanto os diferentes sorotipos ou genótipos podem influenciar na patogênese da doença, entretanto, a associação entre genótipos e formas clínicas da doença mantém-se uma questão em aberto (RICO-HESSE, 1990; HOLMES, TWIDDY, 2003; OLIVEIRA, 2012).

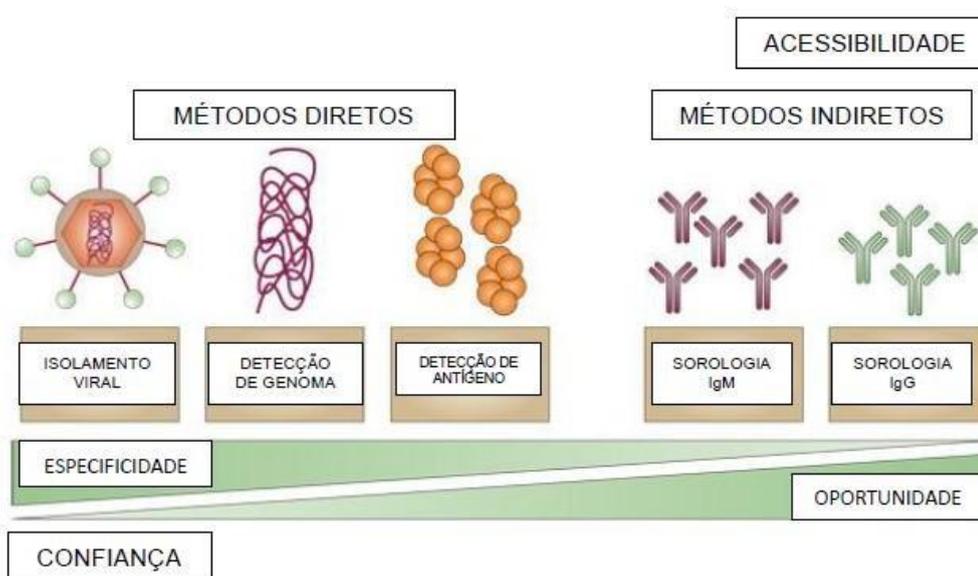
## 1.6 EXAMES LABORATORIAIS

O diagnóstico da dengue se torna difícil quando somente baseado em achados clínicos e epidemiológicos. O diagnóstico definitivo pode ser realizado em laboratório, através de métodos diretos e indiretos, sendo que os diretos podem ser realizados em amostras coletadas até sete dias após o início dos sintomas, utilizando amostras de sangue ou de tecido: isolamento do vírus, detecção do genoma e detecção de antígenos do vírus. Já os métodos indiretos residem basicamente na sorologia para detecção de anticorpos específicos (IgM ou IgG) e necessitam de pelo menos cinco dias para apresentarem positividade (PEELING et al., 2010; WHO, 2009). A figura 9 apresenta uma comparação entre os testes

realizados por métodos diretos e indiretos, considerando a acessibilidade, confiança, especificidade e oportunidade.

Dentre todos os métodos para diagnóstico da dengue, o isolamento viral é o mais específico, entretanto, é um exame de difícil realização na rotina dos serviços de saúde pública, por seu alto custo e difícil operacionalização. É necessário que a amostra de soro seja coletada na fase de viremia da doença (primeiros 3 a 5 dias), mas, em caso de óbito, pode-se utilizar plasma, leucócitos, sangue total e tecidos obtidos durante a autópsia (GUZMAN at al., 2010).

Figura 9 – Comparação entre os testes de diagnóstico de dengue

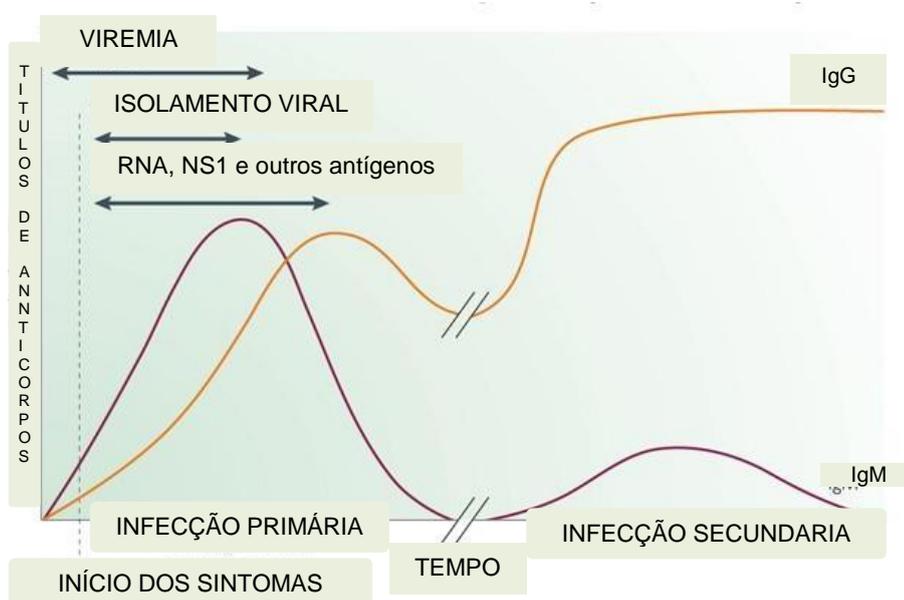


Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** [Internet]. New edition. Geneva: WHO: 2009. [cited 2011 Mar 1] por Frederico Figueiredo Amâncio. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)

Os ensaios sorológicos são mais comumente utilizados para diagnóstico de infecção por dengue, uma vez que são de custo mais baixo e mais fáceis de realizar do que os métodos diretos. Quando a infecção ocorre em indivíduos que já tiveram uma infecção prévia por outro sorogrupo do DENV, ocorrerá uma resposta imune secundária, com altos níveis de IgG por causa da estimulação das células B de memória da infecção anterior, associada à resposta IgM da infecção atual (figura 10). Os testes MAC-ELISA são utilizados para captura de anticorpos IgM e IgG, apresentando em média uma sensibilidade de 90% e especificidade de 98%, em amostras coletadas após cinco dias do início dos sintomas (GUZMAN at al., 2010).

Muitos testes de amplificação de ácido nucleico têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de infecção por DENV. Algumas técnicas são quantitativas e outras podem ser utilizadas para sorotipagem. Pode-se citar a Transcriptase Reversa PCR (RT-PCR) e a Transcriptase Reversa PCR em Tempo Real (Real Time RT-PCR), cuja principal vantagem dessa última seria sua capacidade em determinar títulos virais nas fases precoces da doença, sendo considerada por muitos como importante preditor de severidade (GUZMAN et al., 2010).

Figura 10 - Linha do tempo de infecções primária e secundária por DENV



Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** [Internet]. New edition. Geneva: WHO, 2009. [cited 2011 Mar 1] por Frederico Figueiredo Amâncio. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)

Os antígenos do DENV podem ser detectados em tecidos como fígado, baço e linfonodos, bem como em tecidos obtidos por autópsia em casos fatais. Já a NS1 é uma glicoproteína produzida por todos os flavivírus, sendo essencial para a replicação e viabilidade viral. Uma vez que essa proteína é secretada na corrente sanguínea, muitos testes vêm sendo realizados para diagnosticar infecções por DENV utilizando a NS1. Kits para detecção de antígeno NS1 e de anticorpos NS1 específicos estão disponíveis comercialmente, entretanto, não estabelecem diferença entre os diferentes sorogrupos do DENV (GUZMAN et al., 2010). O Brasil vem adotando os testes rápidos NS1 com vistas à identificação precoce da infecção e atenção adequada ao paciente. Entretanto, segundo a Organização Mundial de

Saúde, estes ensaios ainda não devem substituir os testes de sorologia, principalmente por seu alto custo e baixa sensibilidade (WHO, 2009).

A detecção da proteína NS1 pode ser realizada por métodos qualitativos como a Imunocromatografia, ou pelo método Imunoenzimático (ELISA), que indica sua presença por densidade óptica. A detecção da NS1 também pode ser realizada através de métodos quantitativos, pelo estabelecimento de uma curva padrão com a NS1 glicosilada, ou pela quantificação da proteína em unidades. O kit proposto pela marca BIO-RAD® mensura a quantidade de NS1 através de uma estimativa própria utilizando uma NS1 glicosilada (controle positivo), adotada pelo fabricante, denominada BR Units/ml (BIO-RAD®, 2012).

O uso da proteína NS1 tem uma alta especificidade (82 a 100%), e moderada sensibilidade (mediana 64%, intervalo de 34-72%), mas, segundo estudos realizados previamente, a sensibilidade é mais baixa nas infecções secundárias, quando comparada com as infecções primárias. Importante ressaltar que o resultado NS1 negativo não exclui a possibilidade da doença. O período adequado para a realização do exame é entre o terceiro e quinto dia da doença (BRASIL, 2011).

Outros exames podem ser aliados no diagnóstico da dengue, principalmente em situações de epidemia, uma vez que, em função da alta demanda, pode ser inviável a realização de exames específicos para todos os casos. O hemograma, além de contribuir com o diagnóstico, pode auxiliar no acompanhamento da evolução da doença, pois, com frequência, são encontradas alterações como leucopenia, neutropenia com presença de linfócitos atípicos e trombocitopenia com valores abaixo de 100.000 plaquetas/ $\mu$ L (OLIVEIRA et al., 2012).

## 1.7 A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Segundo Espada-Murao and Morita (2011), existem duas formas opostas de resposta imune à dengue: uma eficaz, capaz de conter a infecção e propiciar a recuperação do paciente e outra ineficaz, que favorece a evolução do quadro clínico para formas mais graves. Assim, a primeira linha de defesa contra os agentes patogênicos é mediada pelo sistema imune inato.

Os receptores Toll-like (TLRs) dão início ao processo e reconhecem invasores através da detecção de padrões moleculares associados a patógenos. Até o momento, pelo menos dez TLRs foram descritos em seres humanos, dos quais seis (TLR 2, 3, 4, 7, 8 e 9) estão implicados no reconhecimento de componentes

virais, ou seja, ácidos nucleicos virais e proteínas. Os TLRs são abundantemente expressos em monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs), as principais células alvo do DENV, que, por sua vez, disparam defesas antivirais, como a produção de interferon e citocinas pró-inflamatórias. A ativação de TLR3 e TLR7 inibe a replicação do DENV, indicando que estes TLRs possuem atividade antiviral para DENV. Estudos têm sido realizados e indicam que as alterações na produção de citocinas pró-inflamatórias, como observado em pacientes com FHD, podem ser atribuídas a reconhecimento através dos TLRs. Tomados em conjunto, o reconhecimento e subsequente ativação de TLRs pode ser um fator contribuinte na patogênese da doença dengue. Pode-se observar que, nesses estudos, os resultados indicam que existe uma regulação diferencial de perfis de expressão de TLR durante a fase aguda da dengue clássica e da dengue hemorrágica (TORRES et al., 2013).

O TLR4 é bem conhecido como receptor para o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana de bactérias gram negativas (TAKEUCHI, AKIRA, 2009; ESSAKALLI et al., 2009). Um estudo anterior constatou uma interação entre DENV, LPS e CD14 na superfície de monócitos e macrófagos humanos, sendo que o LPS bacteriano, um ligante do complexo CD14 – TLR4, foi capaz de bloquear a entrada do DENV e regular a viremia, alterando a produção de citocinas por monócitos e macrófagos (de KRUIF et al., 2008).

O DENV, quando entra no hospedeiro, depara-se inicialmente com células dendríticas, macrófagos e monócitos, que são a primeira barreira contra o estabelecimento da infecção (JESSIE et al., 2004). Rapidamente, essas células tornam-se alvos da replicação do vírus que ativamente penetra nessas células ou, como no caso de infecção secundária, pode ser auxiliado pela formação de um complexo antígeno-anticorpo que, ao invés de neutralizá-lo, facilita sua entrada via receptores encontrados nessas células, conhecido como fenômeno ADE (*Antibody-Dependent Enhancement*) (ROTHMAN, 2011). Após sua entrada, o vírus parece inibir moléculas da via de sinalização do interferon (IFN) tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ), além de dificultar o reconhecimento de seus produtos por receptores intracelulares de PAMP (padrões moleculares associados a patógenos) (MORRISON et al., 2012). Nesse momento, uma indução de IFN tipo I é fundamental para abortar a infecção logo no início, entretanto não é o que geralmente acontece. Estudos relacionam altas concentrações desse tipo de IFN com formas mais brandas da doença (UBOL et al.,

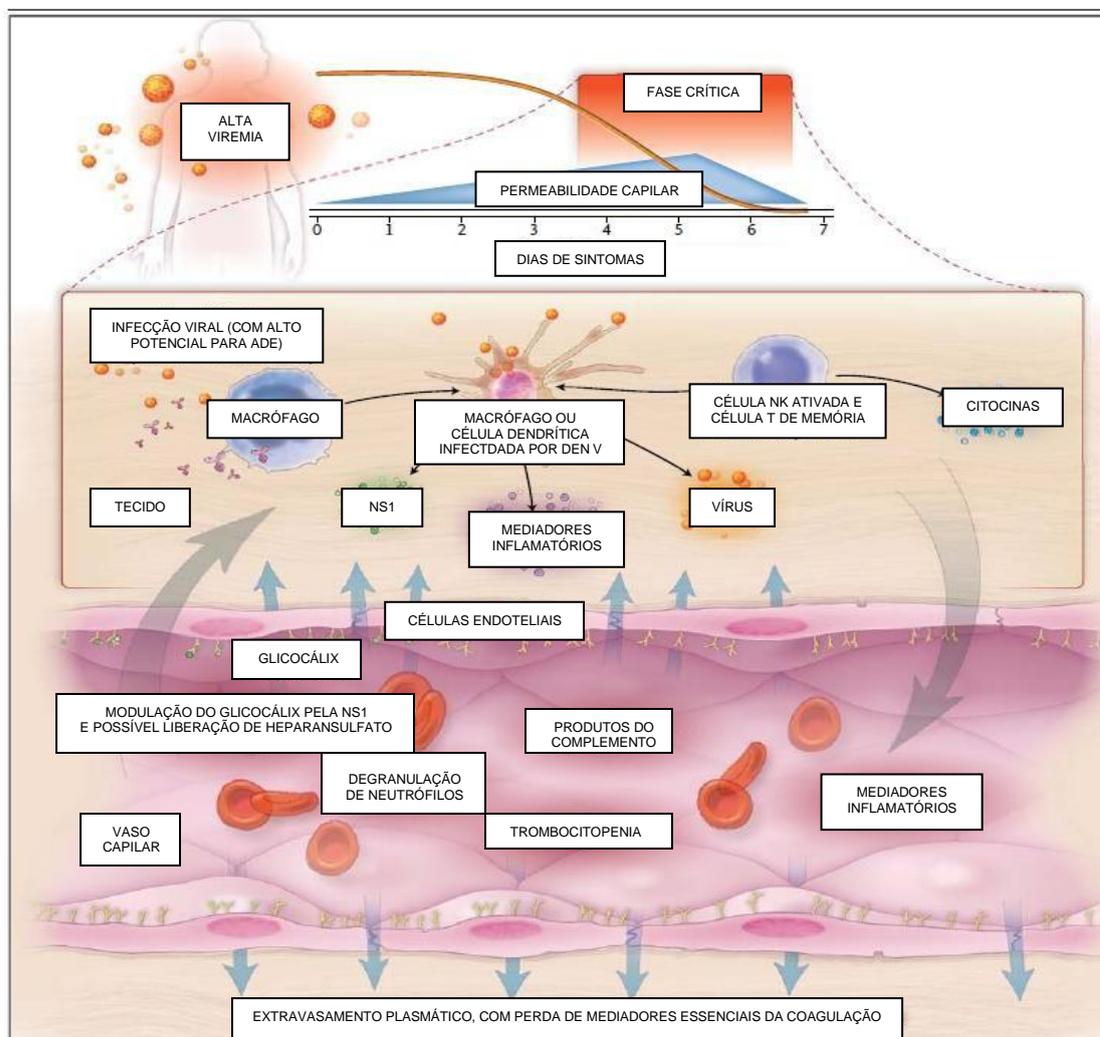
2008). Já o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) relaciona-se com efeitos mais danosos, sendo encontrado em maiores concentrações nos casos mais graves. Entre seus efeitos, observa-se a indução de interleucina 12 (IL-12) (pró-inflamatória), ativação de células T, facilitação do fenômeno ADE e aumento indireto da permeabilidade vascular (LIBRATY et al., 2001; DEWI et al., 2004; OLIVEIRA, 2012).

Outro evento importante é a “cytokine storm” ou tsunami de citocinas, uma liberação massiva de citocinas que caracteriza esta doença viral. No início da infecção parecem ser os monócitos e as células dendríticas as fontes iniciais de produção das citocinas. O ápice da produção de citocinas pró-inflamatórias e vasoativas derivada dessa ativação imune excessiva acarreta um dos sinais mais característicos de agravamento da infecção pelo DENV: o aumento da permeabilidade vascular. Nas formas mais severas encontram-se altas concentrações de IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 10 (IL-10) e baixas concentrações de óxido nítrico (NO), que parece ter um papel regulador importante na resposta (UBOL et al., 2008; OLIVEIRA, 2012). Assim, a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias tem sido associada com alterações hemodinâmicas e de coagulação, que podem levar a um aumento na permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, choque hipovolêmico e morte (GUBLER, KUNO, 1997; CHATURVEDI et al., 2000) (figura 11). Em um modelo *in vitro* de infecção pelo DENV-2 em monócitos, observou-se que o DENV era capaz de induzir a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$ , IL-10 e interleucina 6 (IL-6) nessas células (REIS et al., 2007). A produção de citocinas em células mononucleares de sangue periférico quando infectadas pelo DENV-2 foi investigada por Chaturvedi et al. (1999), que observaram que o TNF- $\alpha$  foi uma das citocinas mais precocemente detectadas, aparecendo já no primeiro dia de infecção e atingindo o pico no segundo dia, enquanto o aparecimento do IFN- $\gamma$  foi mais tardio, sendo detectável a partir do segundo dia com pico no terceiro. A IL-10 mostrou ser uma citocina de aparecimento tardio, já que não foi detectável até o quarto dia, atingindo maiores concentrações apenas no sétimo dia de infecção.

Desse modo, a resposta do sistema imune contra uma infecção causada pelo DENV é muito importante no desenvolvimento dos sintomas, uma vez que o dano causado ao indivíduo não é resultado apenas do dano direto causado pela

replicação viral, mas também do tipo de resposta imune desenvolvida ao longo de todo o curso da infecção (ESPADA-MURAO; MORITA, 2011; OLIVEIRA, 2012).

Figura 11 – Resposta inflamatória ao DENV



Fonte: Adaptado de SIMMONS, C.P.; FARRAR J.J.; NGUYEN van V.C.; WILLS B. Dengue. **N Engl J Med.** v. 366, n. 15, p.1423-1432, 2012.

Descrevem-se, a seguir, citocinas consideradas relevantes nas infecções por DENV, destacando-se as que têm papel importante no sistema imune inato: Interferons (IFN), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucinas 10 (IL-10), 12 (IL-12) e 4 (IL-4), sendo que a última participa da resposta adaptativa. Vale ressaltar que as citocinas IL-12 e IFNs possuem um papel ativador da enzima óxido nítrico sintase (NOS) para a produção de óxido nítrico (NO) e as citocinas IL-4 e IL-10 inibem a atividade da NOS e, conseqüentemente, a produção de NO.

### 1.7.1 Interferon (IFN)

Trata-se de uma classe de glicoproteínas de pequeno peso molecular (15 a 40 kDa) produzidas por uma grande variedade de células definidas por sua atividade inespecífica contra os vírus de modo geral. Existem dois tipos: tipo I, induzido pelos vírus ou RNA de cadeia dupla, que abrange os interferons- $\alpha$  (produzidos por linfócitos) e os interferons- $\beta$  (produzidos por fibroblastos); tipo II, proveniente de linfócitos ativados por um antígeno, representado pelo interferon- $\gamma$ , que possui preponderante atividade antiviral e antitumoral, além de ser importante fator ativador de macrófagos e células *Natural Killer* (NK) (REY, 2008).

Fagundes et al. (2011) observaram que a produção de IFNs depende da ação combinada das citocinas IL-12 e IL-18, sendo os IFNs responsáveis por mediar a resistência do hospedeiro à infecção pelo DENV, de forma dependente da ação do óxido nítrico (NO). Quando a célula é exposta ao IFN- $\gamma$ , ocorre um aumento da produção de óxido nítrico que, quando liberado, pode matar os vírus próximos por ser altamente tóxico.

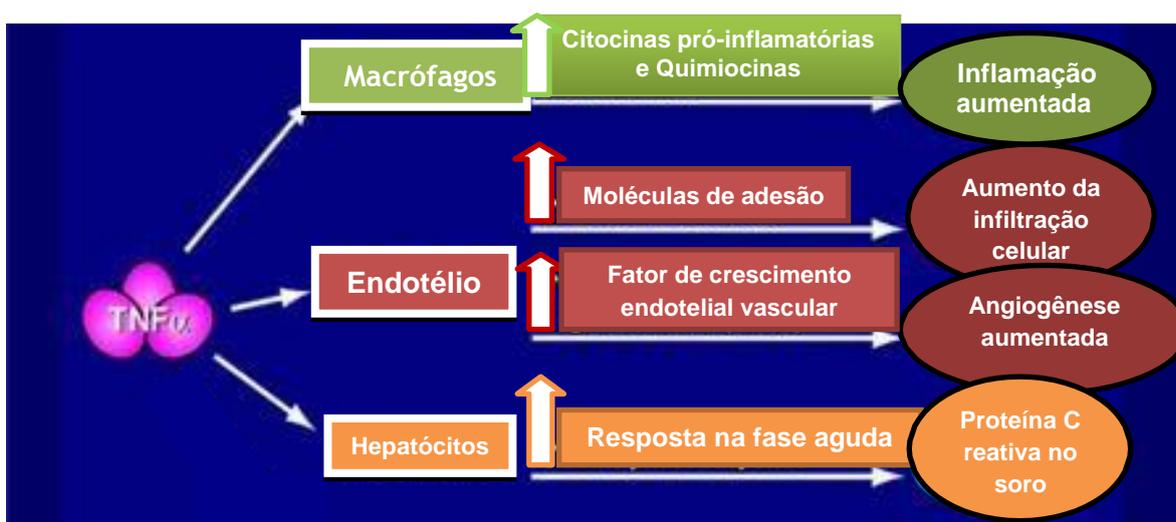
### 1.7.2 Fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Citocina liberada principalmente por macrófagos ativados que está estruturalmente relacionada com a linfotoxina produzida por linfócitos T ativados. É produzida também por células de Kuppfer e outras. É um mediador importante das manifestações gerais da inflamação, e tem esse nome principalmente porque destrói células neoplásicas *in vivo* e *in vitro*, causa necrose de certas neoplasias transplantadas e inibe metástases experimentais, sendo que a lesão tecidual e a necrose são mediadas por efeitos na microcirculação que dão lugar a inflamação intensa, necrose isquêmica e hemorragia. Em pessoas saudáveis, seus níveis plasmáticos são baixos ou nulos, entretanto, quando estimulado por toxinas das bactérias gram-negativas é liberado rapidamente, sendo detectável após 20 minutos. Em níveis baixos produz: anorexia, febre, taquipnéia e taquicardia; em níveis altos, gerados por grandes traumatismos, pode levar a hipotensão, falência cardíaco-respiratória e morte (REY, 2008).

Kurane (2007) ressaltou a importância do TNF, principalmente nos casos mais graves da infecção por dengue, onde há extravasamento de plasma e Gagnon et al. (2002) identificaram que ocorre uma maior expressão de TNF- $\alpha$  e IL-4 em

casos graves de dengue comparada à que ocorre nos casos de dengue clássica ou em outros casos de doenças febris. Uma relação positiva entre altos níveis de receptores TNF solúveis e a severidade da FHD foi registrada em outro estudo (BRAGA et al., 2001) e a presença de polimorfismos TNF- $\alpha$  no alelo TNF-308A parece ser um fator de risco para as manifestações hemorrágicas em pacientes infectados pelo DEN V, de acordo com FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004. Um estudo experimental conduzido com ratos encontrou relação direta entre TNF- $\alpha$  e dengue hemorrágica, uma vez que grandes deficiências de TNF- $\alpha$  diminuam o desenvolvimento de hemorragias (YEN et al., 2008). A figura 12 retrata as principais atribuições do TNF- $\alpha$ .

Figura 12 – Principais atribuições do TNF- $\alpha$



Fontes: Adaptado de Choy, E. H., Panayi, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, v. 344, n.12, p. 907-916, 2001.

### 1.7.3 Interleucina-10 (IL-10)

Citocina derivada principalmente de macrófagos ativados e de linfócitos T auxiliares que inibe a secreção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T, de citocinas (IL-1, IL-12, TNF) e a inflamação por células mononucleares (REY, 2008). Green et al. (1999) ratificaram que a produção exacerbada de IL-10 pode estar relacionada, em fase aguda, com casos graves de dengue.

#### 1.7.4 Interleucina-12 (IL-12)

Citocina derivada de linfócitos T, linfócitos B e principalmente de macrófagos ativadas, induz a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T e células NK, ligando as imunidades inata e adaptativa (LAWRENCE, FLORES, COSTA-CARVALHO, 2006; REY, 2008). A IL-12 é composta por duas subunidades, os componentes **p40** e **p35** que, juntos, formam o **p70**, correspondente a IL-12 ativa. Além de estimular a produção de IFN- $\gamma$ , a IL-12 promove uma resposta com padrão Th1, inibe a síntese de IgE e aumenta a função citolítica celular (LAWRENCE, FLORES, COSTA-CARVALHO, 2006).

Estudo conduzido por Fagundes et al. (2011) indicou que a expressão de IFN- $\gamma$  aumentou após a infecção de roedores pelo vírus da dengue, sendo que sua produção foi precedida pelo aumento dos níveis de IL-12 e IL-18.

#### 1.7.5 Interleucina-4 (IL-4)

Tem uma importante participação no sistema imune adaptativo, sendo conhecida como fator estimulador de linfócitos B (BSF-1), fator de diferenciação de linfócitos B (BCDF- $\gamma$ ) e fator indutor de IgG. A IL-4 é produzida por linfócitos T ativados, mastócitos e basófilos. Induz mudança isotípica de linfócitos B para produzir IgE, sendo que camundongos com depleção gênica seletiva para IL-4 não produzem IgE, indicando a importância dessa interleucina na produção de hipersensibilidade imediata (REY, 2008). Maior expressão de IL-4 foi encontrada em casos graves de dengue quando comparada aos casos clássicos ou a outras doenças febris (GAGNON et al., 2002).

### 1.8 ÓXIDO NÍTRICO E DENGUE

#### 1.8.1 O óxido nítrico

O óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio (NO) permaneceu durante muitas décadas conhecido como um gás poluente nocivo, sendo alvo de interesse de químicos e ambientalistas (FUKUTO, 1995; CARDOSO, 2002). Desde que foi descoberta como molécula gerada de forma endógena por células de mamíferos, o NO tem sido reconhecido como importante mediador biológico por suas implicações na fisiopatologia de diversas doenças e por sua relevância como mensageiro intra e

intercelular liberado durante vários eventos, inclusive imunológicos (PALMER, FERRIAGE, MONCADA, 1987; CARDOSO, 2002).

O NO é um radical livre gasoso de meia-vida relativamente curta, gerado pela família de proteínas de óxido nítrico sintase (NOS) e que atua como molécula sinalizadora, mediando a comunicação célula-célula (MONCADA, 1999). Enzimaticamente, o NO é gerado em mamíferos a partir da oxidação de L-arginina para L-citrulina; também pode ser formado independentemente da NOS pela redução de nitrato e nitrito catalizada por enzimas redutoras, tais como desoxihemoglobina e nitrato redutase (BRENNAN, UMAR et al., 2000; SOUSA, 2012). Pode-se dizer que o NO é um radical livre instável, reagindo com outros radicais livres como ânion superóxido e íons de hidroxila, além de metais como o ferro heme (hemoglobina, mioglobina, citocromos) (CHATURVEDI, NAGAR, 2009).

Três isoformas da NOS foram identificadas, sendo que duas estão presentes constitutivamente nas células – eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e nNOS (óxido nítrico sintase neuronal) – enquanto a outra isoforma é expressa após a produção de certas citocinas ou produtos bacterianos, sendo conhecida como óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (STUEHR & GRIFFITH, 1992). A nNOS e a eNOS são semelhantes, uma vez que geralmente são produzidas constitutivamente e a sua atividade é regulada por concentrações de cálcio intracelulares, diferentemente da indução da expressão de iNOS, que ocorre por estímulos inflamatórios como os gerados pelo TNF- $\alpha$  ou pelo IFN- $\gamma$  (HUANG, MARTASEK et al., 2000; SOUSA, 2012).

O NO é uma das menores moléculas mensageiras biossintetizadas por células de mamíferos biologicamente ativas, com peso molecular de 30 Da. É um gás com número ímpar de elétrons, que reage com átomos e outros radicais livres, com propriedades lipofílicas, sendo praticamente apolar, o que lhe confere especial capacidade de difusão pelas membranas. Por ser instável (vida média de 3-10 segundos), reage rapidamente com o oxigênio formando NO<sub>2</sub> (dióxido de nitrogênio) originando em seguida NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrito) e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato). Além disso, combina-se com a hemoglobina, um consumidor natural de NO, para formar metahemoglobina (CARDOSO, 2002).

Assim, o NO é um importante sinal parácrino e autócrino utilizado por diferentes tipos de células e produzido por uma variedade de células como macrófagos, células vasculares endoteliais, células de Kupffer, supra-renais e

tecidos do cerebelo. O NO tem uma ampla gama de funções no organismo, que vão desde a dilatação dos vasos sanguíneos, agregação de plaquetas, combate a infecções e tumores, mediador de inflamação e atividade citotóxica dos macrófagos até a transmissão de sinais entre células nervosas (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991; CHATURVEDI, NAGAR, 2009).

### **1.8.2 Papel do óxido nítrico no sistema imune**

O NO é conhecido por ter um forte papel imuno-regulatório, estimulando ou inibindo a ativação e proliferação de células imunes, bem como a síntese e sinalização de citocinas (BOGDAN, 2001; CHATURVEDI, NAGAR, 2009).

O NO tem vários efeitos na síntese de citocinas. O NO exógeno aumenta a síntese de TNF- $\alpha$  em células mononucleares do sangue periférico humano e em preparações de neutrófilos estimulados por lipopolissacarídeos. Já o NO endógeno é necessário para a produção de interleucina 12 (IL-12), ao passo que o NO exógeno diminui a produção de IL-12 por macrófagos. O NO está envolvido na sinalização de citocinas, uma vez que em ratos com deficiência de iNOS a sinalização de algumas citocinas é perdida. A produção de grandes quantidades de NO por macrófagos leva a inativação de linfócitos e induz a uma imunossupressão persistente em animais infectados por HIV. O NO desempenha um papel chave na patogênese das doenças inflamatórias. Em situações específicas e com concentrações específicas funciona como anti-inflamatório e tem efeito protetor contra várias infecções. Por outro lado, em situações anormais e em altas concentrações, é um mediador pro-inflamatório, induzindo a inflamação e lesões patológicas (CHATURVEDI, NAGAR, 2009).

Assim, com o objetivo de manter a homeostase e responder à invasão de microorganismos, vasos sanguíneos secretam uma variedade de citocinas, e também de NO, que regulam a contração dos tecidos vasculares e células musculares lisas. O NO pode levar a vasodilatação e redução da resistência vascular sistêmica, que pode gerar hipotensão, choque e morte, caso seus níveis não sejam corrigidos (TRAIRATVORAKUL et al., 2005).

A ampla expressão de iNOS que ocorre em inflamações e infecções tem sido bem caracterizada e aceita como um componente vital da resposta adaptativa do hospedeiro aos estímulos nocivos, embora haja evidências de que a indução de iNOS, em algumas condições fisiopatológicas, seja parte de uma ativação imune

descontrolada e deletéria, já que a inibição da NOS pode exercer efeitos protetores nessas condições. O papel da formação aumentada de NO tem sido investigado e discutido na insuficiência circulatória associada ao choque endotóxico e séptico, na artrite reumatóide, osteoartrite e na hipertensão portal. O papel do NO pode variar de acordo com o processo patológico envolvido e o tecido afetado (HIRATA et al., 2001; CARDOSO, 2002).

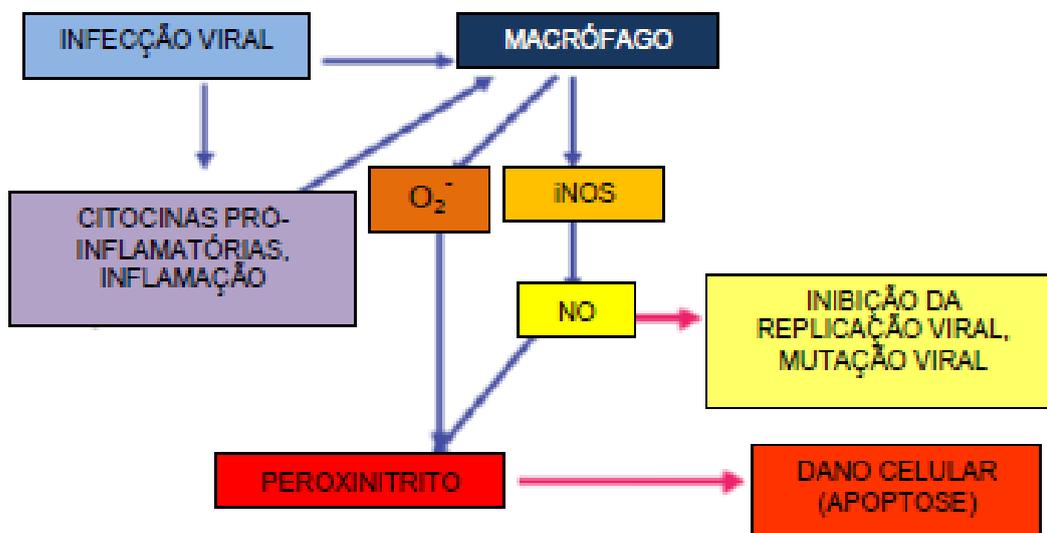
Sob condições patológicas, elevados níveis de NO são produzidos no organismo após a indução da expressão de iNOS. Assim, este mediador pode exercer efeitos benéficos agindo como um agente anti-bacteriano, anti-parasitário, anti-viral e até mesmo anti-tumoral, mas, em contrapartida, os níveis elevados de NO, se não controlados, podem ser prejudiciais, uma vez que pode reagir com o superóxido concomitantemente produzido, gerando compostos altamente tóxicos para a estrutura celular, como, por exemplo, o peroxinitrito (BECKMAN & KOPPENOL, 1996; CHEN, SJOLINDER et al., 2012; AMORIM, RODRIGUES et al., 2012; LIAO, HSU, et al., 2012; SHAKED, HOFSETH et al., 2012; SOUSA, 2012).

### **1.8.3 Papel do óxido nítrico durante uma infecção viral**

O NO tem múltiplos efeitos durante as infecções virais, podendo afetar tanto os vírus quanto o hospedeiro. No vírus, o NO tem a capacidade de inibir a replicação ou de causar mutações e no hospedeiro pode causar dano celular e doença. A indução de iNOS pode ocorrer durante infecções virais por dois mecanismos, direto e indireto (CHATURVEDI, NAGAR, 2009) (figura 13).

A produção de NO por monócitos e células endoteliais pode levar a vasodilatação e redução de resistência vascular sistêmica, que pode levar a hipotensão, choque e óbito, se não corrigida. Níveis de NO estão elevados em muitos casos de doenças infecciosas virais, inclusive na infecção por dengue. Monócitos isolados de vários pacientes tornam-se ativados e expressam iNOS, que leva à produção de NO pelas células. Estudo realizado anteriormente demonstrou que o DENV foi submetido a um tratamento específico de adição de NO, sendo que altas concentrações do vírus foram detectadas em células infectadas após a inibição da iNOS, indicando que o NO pode desempenhar papel importante no controle da infecção por DENV-1 de monócitos *in vitro* e *in vivo* (NEVES-SOUZA et al., 2005).

Figura 13 – Mecanismos de indução de NO durante as infecções virais



Fonte: Adaptado de CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R. Nitricoxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 56 p. 9–24, 2009.

De um modo especial, no caso da dengue, o NO colabora para a inibição da replicação viral. Charnsilpa et al. (2005) investigaram os efeitos do NO sobre a produção do DENV e na replicação do RNA em células de neuroblastoma de ratos. O NO inibiu a replicação viral suprimindo a síntese de RNA, resultando na redução da síntese de NS1, uma das sete proteínas estruturais do genoma do DENV, importante para a replicação do vírus. Assim, o NO pode atuar como um agente de defesa que diminui a carga viral em pacientes.

Estudos registraram que, embora os níveis de NO em pacientes com FHD sejam muitas vezes similares aos de pacientes controles saudáveis, pode-se constatar que elevados níveis de NO são encontrados em pacientes com dengue clássica (VALERO, ESPINA, ANEZ, 2002; TRAIRATVORAKUL et al., 2005). Entretanto, informações mais precisas precisam ser disponibilizadas sobre o assunto.

Costa *et al.* (2012), em um estudo experimental com camundongos infectados com uma cepa adaptada de DENV-3, observaram que essa infecção causou a letalidade dos animais, sendo precedida por várias mudanças hematológicas e bioquímicas acompanhadas do aumento da disseminação viral, características consistentes com manifestação da doença grave em humanos. O aumento da expressão de IFN- $\gamma$  após a infecção com DENV-3 foi precedido pelo aumento da

expressão das citocinas IL-12 e IL-18. A falta de produção de IFN- $\gamma$  esteve associada com a diminuição da expressão de NOS e à maior susceptibilidade à infecção pelo DENV-3. Segundo os autores, os mecanismos de proteção contra a infecção pelo DENV-3 dependem de um controle de replicação viral IFN- $\gamma$ -NOS-NO-dependente e da gravidade da doença.

#### **1.8.4 Papéis do óxido nítrico na definição da infecção como dengue clássica ou grave (FHD, DCC, SCD)**

Muitos papéis do NO na patogênese das infecções por DENV tem sido discutidas em relação à mutação do DENV, respostas inflamatórias não-específicas e reações imunológicas do hospedeiro modulados pelo NO que podem causar FHD. A replicação do DENV sensível ao NO é inibida pela geração de NO, resultando em baixa carga viral e, conseqüentemente, à uma forma clínica mais branda da doença. Já os DENV resistentes ao NO são virulentos, tem uma alta taxa de replicação e uma forte influência na resposta genética do hospedeiro quando comparados com os DENV sensíveis ao NO. Os DENV resistentes ao NO induzem uma maior expressão de genes relacionados à resposta imune, como os genes envolvendo citocinas/quimiocinas, ativação de células T, células B, plaquetas e células inflamatórias. Isto pode resultar na interação entre plaquetas, células vasculares endoteliais e células inflamatórias que induzem o extravasamento vascular (CHATURVEDI, NAGAR, 2009).

Entretanto, os DENV resistentes ao NO aumentam significativamente a regulação de IL-6, IL-7, IL-8, RANTES (CCL5) e MCP-3, que estão correlacionadas com o aumento da FHD. Achados em soros de pacientes com dengue e FHD mostram uma relação inversa entre IL-4 e IL-10 para IFN- $\gamma$  (CHATURVEDI et al., 1999). Altos níveis de IL-6 e IL-8 podem estar envolvidos no extravasamento vascular e hemorragias, sendo encontradas em pacientes FHD/SCD, mas não em pacientes com dengue clássica (CHATURVEDI, NAGAR, 2009). Deste modo, observa-se que o NO exerce um papel importante na infecção por DENV, uma vez que a inibição da replicação de DENV por NO pode resultar em dengue clássica e, quando não ocorre essa inibição, podem ocorrer as formas graves da doença.

Considerando-se a participação do NO bem como das demais moléculas \_TLR4, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p40, NS1\_ na evolução da doença dengue, acredita-se que o presente estudo pode contribuir para um melhor conhecimento dos

mecanismos envolvidos na resposta imune e sua associação com formas graves. Acredita-se que níveis elevados de NS1 viral alteram parâmetros da resposta imune em pacientes infectados pelo DENV, contribuindo para o desenvolvimento de diferentes desfechos clínicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as relações entre níveis séricos da proteína viral NS1 secretada *in vivo* e parâmetros da resposta imune (expressão de TLR4, produção de TNF- $\alpha$ , NO, IL-10 e IL-12p40) em pacientes infectados com dengue apresentando diferentes desfechos clínicos (dengue clássica e dengue com complicação/ febre hemorrágica).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar e quantificar os níveis séricos de NS1 em pacientes infectados com o dengue vírus na fase aguda e defervescência da doença;
- b) Comparar os níveis séricos de NS1 com níveis de NO, IL-10, IL-12p40 e TNF- $\alpha$  em pacientes com diferentes formas clínicas da dengue na fase aguda e na fase de defervescência da doença;
- c) Comparar a produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da infecção (dengue clássica e dengue com complicação/febre hemorrágica) e células de indivíduos saudáveis após estímulo de 18 horas com o agonista de TLR4, LPS;
- d) Comparar a produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares do sangue periférico de grupos de pacientes com dengue apresentando baixos e altos níveis séricos de NS1, após estímulo de 18 horas com o agonista de TLR4, LPS;
- e) Avaliar a expressão de TLR4 de células CD14+ em pacientes com diferentes formas clínicas da infecção (dengue clássica e dengue com complicação/febre hemorrágica) e células de indivíduos saudáveis;
- f) Comparar a expressão de TLR4 em células CD14+ de grupos de pacientes com dengue apresentando baixos e altos níveis séricos de NS1.

### 3 PACIENTES E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue venoso e preenchimento de formulário específico (ANEXO D) de pacientes que apresentaram doença dengue confirmada de fevereiro de 2010 a abril de 2013 no Ambulatório de Dengue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, na Unidade de Pronto Atendimento do bairro Abadia (UPA-Abadia) e no Pronto-Socorro do Hospital São Marcos, situados na cidade de Uberaba, Minas Gerais. As amostras foram obtidas em duas etapas: na fase aguda da doença (entre o 2º e o 5º dia após o início dos sintomas) e na fase de defervescência (entre o 9º e o 12º dia após o início dos sintomas), entretanto, nem todos os pacientes retornaram para a coleta da segunda amostra. A caracterização do grupo de estudo com as informações referentes a gênero idade e classificação dos casos está apresentada na tabela 1 do item Resultados.

As amostras foram ordenadas numericamente, considerando as iniciais do participante e as datas das coletas. Além do instrumento próprio de coleta de dados, trabalhou-se com a ficha de notificação/investigação de caso suspeito de dengue do SINAN-Net, quando preenchida pelo profissional de saúde atendente (ANEXOS E e F).

As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais foram reunidas e organizadas em um banco de dados (planilha Excel), com as seguintes informações de interesse para o estudo:

- 1) Identificação: registro, iniciais, nome, idade, sexo, residência;
- 2) Coleta da(s) amostra(s): início dos sintomas, origem da amostra, coleta de 2-5 dias, coleta de 9-12 dias, material, ano de coleta;
- 3) Dados Laboratoriais: hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, neutrófilos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos, plaquetas, citometria (TLR4), NS1 dengue, IgM e/ou IgG (dengue), níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p40, NO;
- 4) Sinais e sintomas: febre, cefaleia, prova do laço, dor retro orbitária, mialgia, artralgia, diarreia, exantema, prostração, náuseas, vômitos, epistaxe, gengivorragia, hematúria, petéquias, metrorragia, sangramento gastrointestinal, dor abdominal intensa, hepatomegalia dolorosa, tempo de sintomas;

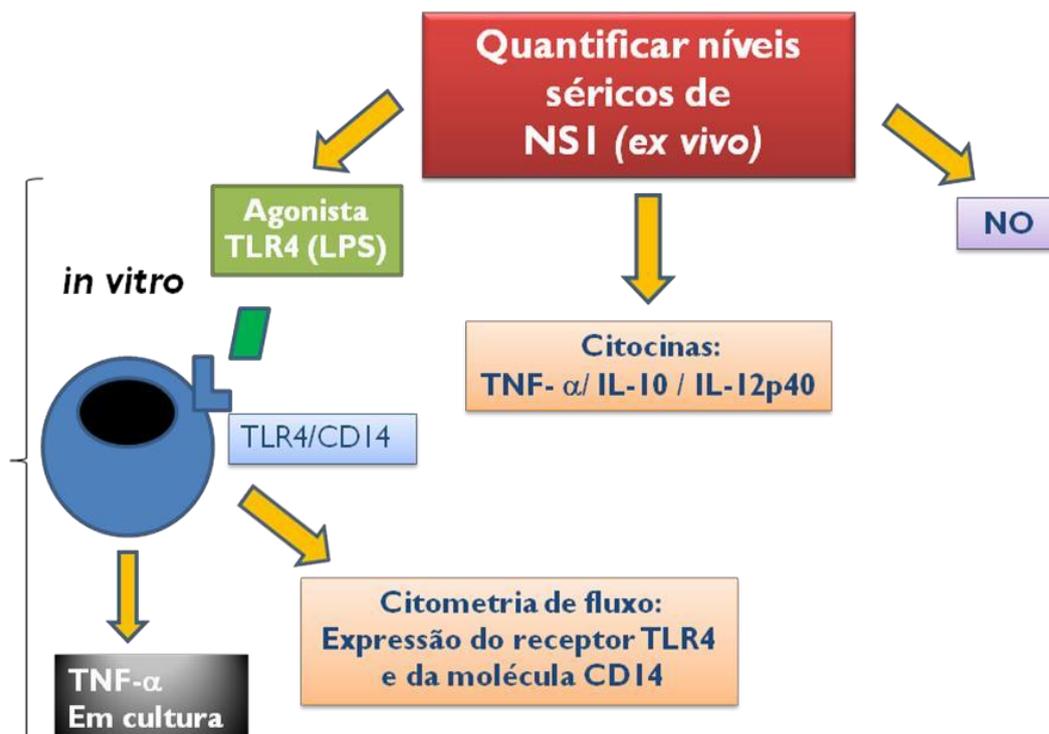
- 5) Evolução: internação, óbito, complicação;
- 6) Encerramento: classificação, critério de classificação, observação.

Após o preenchimento de todos os dados, os casos foram classificados de forma retrospectiva, considerando as orientações da OMS (WHO, 1997).

Especificamente para as comparações referentes às células em cultura e produção de NO, IL-10, IL-12p40, TNF- $\alpha$  e expressão de TLR4, trabalhou-se com um subgrupo de 37 pacientes infectados pelo DENV (a caracterização do grupo de estudo com as informações referentes a gênero idade e classificação dos casos está apresentada na tabela 2 do item resultados) e 20 indivíduos controles (voluntários saudáveis não infectados pelo DENV). Dos 20 controles saudáveis, 10 (50%) eram do gênero masculino e 10 (50%) do gênero feminino com média de idade foi igual a  $37 \pm 14$  anos). Os controles apresentaram resultados negativos para a presença de NS1 e anticorpos IgM/IgG antivírus dengue e não eram vacinados contra febre amarela.

A figura 14 ilustra a metodologia adotada no presente estudo.

Figura 14 – Desenho do estudo



### 3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

As amostras foram obtidas mediante os seguintes critérios de inclusão: os pacientes serem adultos, com idade igual ou superior a 18 anos, apresentando sinais e sintomas descritos anteriormente, caracterizando os casos como dengue clássica, dengue com complicações ou febre hemorrágica da dengue, após esclarecimento dos objetivos do estudo e consentimento formal assinado (ANEXO H). Foram excluídas do presente estudo pessoas com menos de 18 anos de idade, bem como aqueles que não apresentavam sinais e sintomas suspeitos de dengue.

### 3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo está inserido no projeto “Avaliação da resposta imune inata ao vírus da Dengue: expressão de receptores toll, citocinas e quimiocinas”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro sob o Protocolo 851 de 2006 (ANEXO G), sendo que os pacientes foram esclarecidos sobre o presente estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO H).

### 3.3 GRUPO DE ESTUDO E CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS

Os casos confirmados de dengue foram classificados como dengue clássica (DC), dengue com complicações (DCC) e febre hemorrágica da dengue (FHD), de acordo com as orientações propostas pela Organização Mundial de Saúde em 1997 (WHO, 1997), considerando-se que a mesma é, em diversos aspectos, mais adequada para o uso em pesquisas científicas do que a última versão (WHO, 2009), mais indicada para manejo clínico dos pacientes (MACEDO et al., 2014).

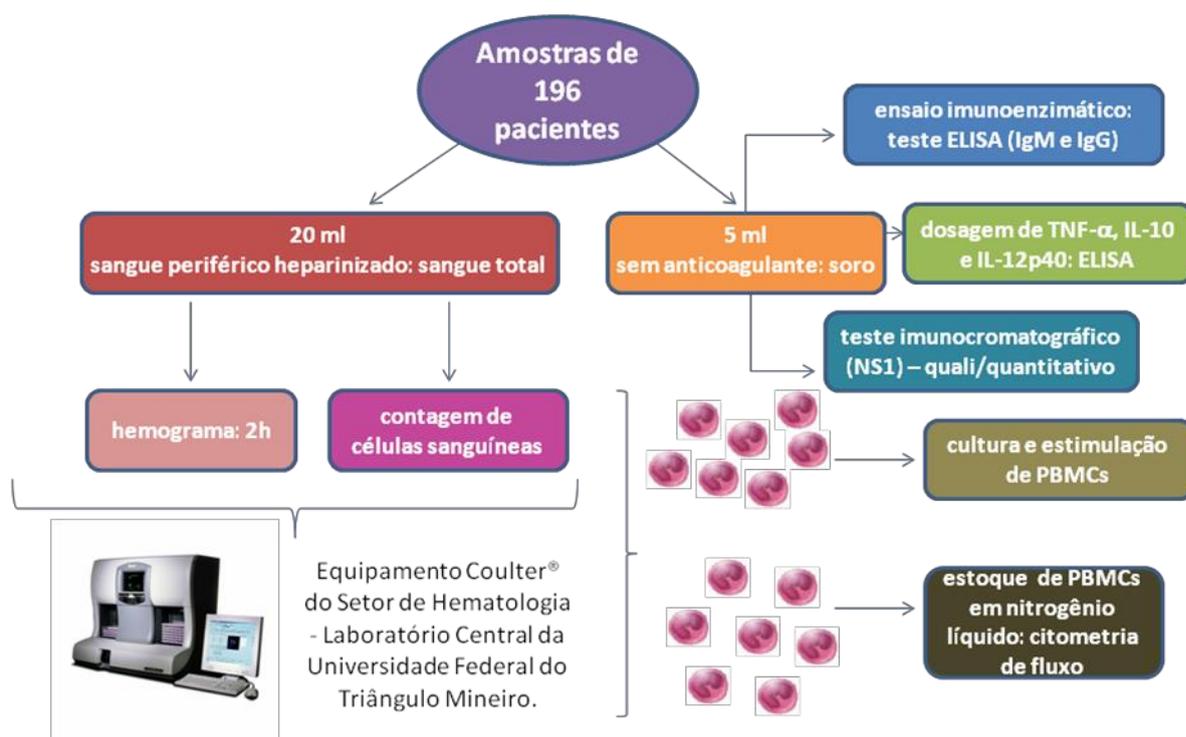
### 3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Amostras de sangue venoso foram coletadas de pacientes infectados pelo DENV, sendo vinte mililitros de sangue periférico heparinizado (PB) e cinco mililitros sem anticoagulante para obtenção de soro. A contagem de células sanguíneas e o hemograma foram realizados no equipamento Coulter<sup>®</sup> do setor de Hematologia do Laboratório Central da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Após a coleta do sangue, o hemograma foi realizado no tempo máximo de 2 horas para que os riscos de resultados falsos fossem minimizados.

O sangue coletado foi separado do soro e foram isoladas as células mononucleares do sangue periférico, sendo uma alíquota utilizada para cultura e estimulação celular e outra alíquota estocada em nitrogênio líquido para uso posterior nos experimentos de citometria de fluxo.

A figura 15 ilustra a sequencia dos procedimentos realizados a partir da coleta das amostras.

Figura 15 – Coleta e processamento das amostras de sangue



40

### 3.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE DENGUE

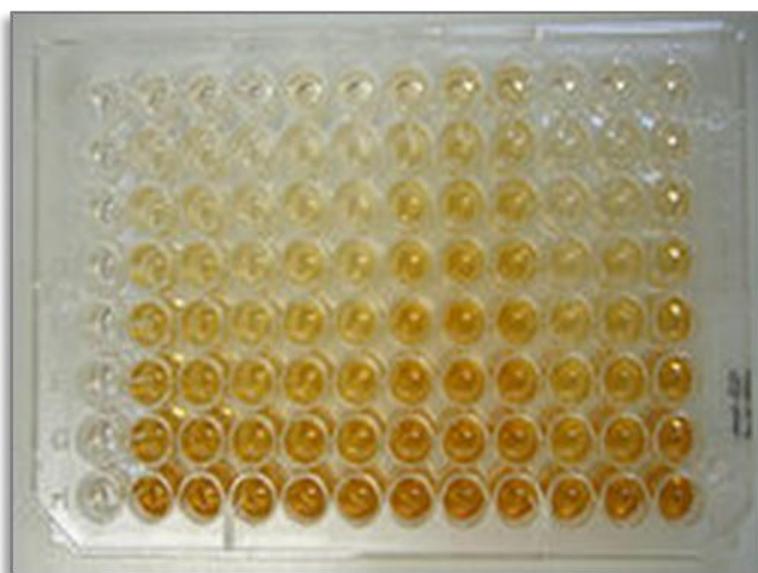
Utilizou-se o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensaio Imunoenzimático) para captura de anticorpos IgM e IgG anti-dengue PANBIO<sup>®</sup> a partir do soro dos pacientes para confirmação da doença e também os kits de ELISA Platellia<sup>®</sup> da Biorad e imunocromatográfico PANBIO<sup>®</sup> para detecção da proteína viral NS1, todos utilizados de acordo com as instruções do fabricante (figuras 16 e 17).

### 3.6 DOSAGEM DE CITOCINAS

As citocinas presentes nas amostras de soro foram dosadas por ELISA utilizando pares de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis (BD-Bioscience, EUA). Foram utilizadas doze placas de 96 poços de fundo chato

recobertas com anticorpos monoclonais específicos para a captura das citocinas a serem dosadas: TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12p40. Os poços correspondentes ao branco da reação não continham anticorpos. Às fileiras 11 e 12 de cada placa foi adicionada solução-padrão da respectiva citocina recombinante, seguindo diluições seriadas 1:2 em PBS-BSA 1% a partir das concentrações iniciais. Às outras fileiras foi adicionado 100 $\mu$ L/poço de soro contendo a citocina a ser dosada. As placas foram incubadas a 4°C *overnight* e, no dia seguinte, lavadas por cinco vezes com solução contendo PBS-Tween 20 0,05%. A seguir, foram adicionados os anticorpos de detecção marcados com estreptavina, diluída em PBS-BSA 1%. As placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente e novamente lavadas por cinco vezes em PBS-T. Então foi adicionado 100 $\mu$ L/poço de uma solução 1:1 de substrato TMB com peróxido de hidrogênio. Os resultados foram obtidos pela diferença entre as absorbâncias medidas a 450 e 630 nm ( $Abs_{450} - Abs_{630}$ ) em um leitor automático de placas de ELISA (Modulus Microplate Reader - Promega). A concentração de citocinas nas amostras de soro foi determinada em pg/mL, pela comparação com as absorbâncias obtidas em uma curva padrão da respectiva citocina recombinante realizada simultaneamente.

Figura 16 – Ensaio Imunoenzimático



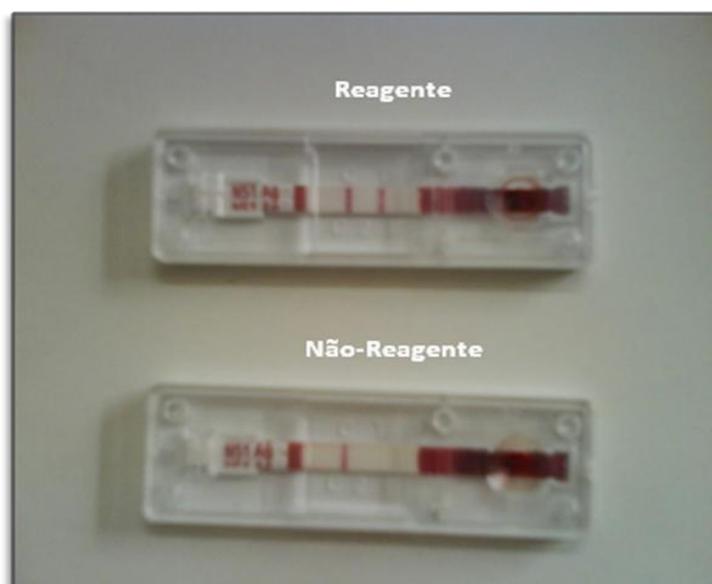
Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

### 3.7 NÍVEIS SÉRICOS DE NS1

A presença de NS1 foi qualitativamente determinada utilizando o ensaio imunoenzimático Platelia™ NS1 Ag (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, França), conforme as instruções do fabricante.

Para as avaliações quantitativas (quantificação dos níveis séricos de NS1), o mesmo kit foi usado, porém com um protocolo modificado fornecido pelo próprio fabricante (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, França), que utiliza NS1 recombinante do vírus de dengue e uma diluição diferente do conjugado (1:5000), com a concentração da amostra resultante sendo expressa em Unidades Biorad por mililitro (BRU / ml).

Figura 17 – Exame Imunocromatográfico



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

### 3.8 ISOLAMENTO E ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs)

Para os ensaios de cultivo celular, PBMCs foram isoladas de amostras de sangue periférico obtidas de 37 pacientes infectados com DENV e 20 controles saudáveis, após centrifugação em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). As PBMC foram cultivadas em  $1 \times 10^6$  células / ml em placas de cultura de 24 poços a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando meio RPMI 1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado

com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 100 U/ml penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich Chemical Co.) e 1% de L-glutamina (Sigma Aldrich Chemical Co.). As PBMCs foram estimuladas durante 24 h com 10 µg/mL de lipopolissacarídeo ultrapuro (LPS), agonista de TLR4 (InvivoGen, USA). Os sobrenadantes de cultura foram colhidos após 24 h e armazenados a -80°C até a análise. Alíquotas de PBMCs foram criopreservadas para estudos posteriores em 1 ml de solução de congelamento [90% soro fetal bovino inativado (FCS; Gibco, Invitrogen) + 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO; Sigma Chemical Co., St Louis, MO)] e armazenados inicialmente a -80°C por 24 horas antes da sua introdução em N<sub>2</sub> líquido.

### 3.9 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das PBMCs em cultura e, após a estimulação com LPS, foi quantificada através da sua capacidade para reduzir o 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-phenyltetrazolium brometo (MTT) a formazan. O MTT foi utilizado em uma concentração final de 5 mg/ml e adicionado a cada poço da placa de cultura 4 h antes do fim da experiência. O formazan precipitado foi dissolvido por incubação com DMSO (Merck, Berlim, Alemanha), e a sua concentração determinada espectrofotometricamente a 560 nm.

### 3.10 QUANTIFICAÇÃO DE TNF- $\alpha$ EM SOBRENADANTES DE CULTURA

Os sobrenadantes de cultura de PBMC foram colhidos após 24 h e a concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) também foi medida por ELISA, de acordo com o protocolo do fabricante (BD-Bioscience, EUA).

### 3.11 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO SÉRICO

A concentração de NO nas amostras de soro foi medida indiretamente pela determinação de nitratos e nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). O NO total no soro foi medido, utilizando um kit de ensaio de óxido nítrico (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Este ensaio determina o óxido nítrico com base na conversão enzimática de nitrato para nitrito pela ação da enzima nitrato-redutase. A reação é seguida por uma detecção colorimétrica de nitrito como um produto corante “azo” da reação de Griess. As amostras foram quantificadas

espectrofotometricamente utilizando um leitor de microplacas a 540 nm (Promega, EUA). Nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) foi utilizado para realização da curva padrão (TRAIRATVORAKUL et al, 2005).

### 3.12 CITOMETRIA DE FLUXO

Foi realizada citometria de fluxo das PBMCs dos 20 controles saudáveis e de 37 pacientes infectados por incubação das amostras ( $5 \times 10^5$  células) com concentrações ótimas de anticorpos monoclonais (MAbs): anti-CD14-FITC e anti-TLR4-PE, durante 30 minutos, em temperatura ambiente, no escuro. As células foram lavadas duas vezes ( $300 \times g$  durante 5 min) e ressuspensas em 500  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato de Dulbecco (D-PBS) contendo 1% de soro fetal bovino (FCS) e azida sódica a 0,1% para a aquisição de dados no citômetro de fluxo FACSCallibur (Becton & Dickinson - EUA).

Antes de cada experimento, o instrumento foi verificado com relação à estabilidade e reprodutibilidade usando esferas Calibrite™ (Becton Dickson, San Jose, CA). Os tubos controle incluíam células incubadas com meio (controle de fluorescência basal) e células incubadas com isotipos controle marcados com os fluorocromos [isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE)] para controle de ligação não específica. Durante a aquisição, cem mil eventos foram contados por amostra.

Como estratégia de análise da citometria, definiu-se a expressão do TLR4 usando regiões (“gates”) delimitados em gráficos. As células CD14+ foram obtidas pelo desenho de um “gate” de fluorescência contra granularidade específica (parâmetro SSC). As células contidas neste “gate”, denominado região 1 (R1), foram ainda analisadas em um canal PE-fluorescência representando a expressão de TLR4. Os dados foram analisados utilizando-se o software Flow Jo, versão 1.4.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises de dados foram realizadas utilizando o software aplicativo GraphPad Prism (Graph Pad, CA), com o auxílio dos programas Microsoft Excel 2010 e Statview. Como as variáveis numéricas tiveram distribuição não paramétrica, foram utilizados os testes Mann Whitney e Kruskal-Wallis para comparar dois ou mais grupos, respectivamente. O nível de significância foi ajustado para  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CASUÍSTICA

Foram incluídos no presente estudo 196 pacientes com dengue, cujos dados foram coletados de 2010 a 2013, considerando os critérios de inclusão, em dois momentos: na fase aguda (entre o 2º e o 5º dia após o início dos sintomas) e na fase de defervescência (entre o 9º e o 12º dia após o início dos sintomas), sendo perdidas, no segundo momento, 44 amostras de pacientes que não retornaram para a coleta de sangue. Trabalhou-se também com um grupo controle formado por 20 indivíduos voluntários não infectados.

Na tabela 1 é apresentada a caracterização do grupo de estudo com as informações referentes a gênero, idade e classificação. Nesse grupo a maioria dos casos foi classificada como dengue clássica (DC) (158), sendo 26 casos considerados como dengue com complicações (DCC) e 12 casos considerados como febre hemorrágica do dengue (FHD).

Para os estudos de cultivo e estimulação celular *in vitro* com avaliação da expressão do TLR4 em células CD14 trabalhou-se com um subgrupo formado por 37 casos, sendo 26 classificados como dengue clássica (DC) e 11 classificados como febre hemorrágica da dengue (FHD), além do grupo controle formado por 20 indivíduos voluntários não infectados. Das 12 amostras de pacientes com FHD descritas na tabela 1, perdeu-se uma amostra, uma vez que não foi possível coletar material suficiente para as análises de cultivo celular e citometria. As informações referentes a gênero, idade e classificação desse subgrupo estão na tabela 2.

Tabela 1 - Informações demográficas e classificação dos casos de dengue utilizados nos estudos *ex vivo*: Quantificação dos níveis séricos de NS1, NO e citocinas.

Dados dos pacientes	Dengue Clássica (DC)	Dengue com complicações (DCC)	Dengue Hemorrágica (FHD)	Controles Não infectados (NI)
Idade (x ± dp)	37 ± 13	42 ± 21	39 ± 22	37 ± 14
Gênero Masculino (N)	82	15	7	10
Gênero Feminino (N)	76	11	5	10
Total	158	26	12	20

Tabela 2 - Informações demográficas e classificação dos casos de dengue utilizados nos estudos *in vitro* de cultivo celular.

Dados dos pacientes	Dengue Clássica (DC)	Dengue Hemorrágica (FHD)	Controles Não infectados (NI)
Idade ( $x \pm dp$ )	31 $\pm$ 11	43 $\pm$ 23	37 $\pm$ 14
Gênero Masculino (N)	14	6	10
Gênero Feminino (N)	12	5	10
Total	26	11	20

## 4.2 ESTUDOS *ex vivo*: NÍVEIS SÉRICOS DE NS1, NO E CITOCINAS

### 4.2.1 Quantificação de NS1 sérico

O antígeno NS1 foi encontrado em circulação na fase aguda (figura 18) e no período de defervescência (figura 19). Seus níveis de circulação variaram bastante entre os pacientes durante o curso da doença, de 2,2 a  $600 \times 10^3$  BRU por mililitro (figura 18). Durante a fase aguda, pacientes com FHD apresentaram níveis séricos de NS1 maiores do que aqueles com DC. Além disso, durante a fase de defervescência, os níveis de NS1 declinam mais acentuadamente em pacientes com DC do que naqueles com FHD (figura 20).

A partir da distribuição dos valores encontrados (distribuição não paramétrica) estabeleceram-se dois grupos de pacientes para a realização de estudos posteriores com base nos valores de mediana ( $10,4 \times 10^3$  BRU de NS1/ml) encontrados: Grupo A com altos níveis séricos de NS1 (pacientes com níveis de NS1 iguais ou acima dos valores da mediana) e Grupo B, com baixos níveis séricos de NS1 (pacientes com níveis de NS1 abaixo do valor encontrado para a mediana).

### 4.2.2 Níveis séricos de NO

#### 4.2.2.1 Níveis séricos de NO e forma clínica

Durante a fase aguda febril da infecção por DENV, observou-se um aumento significativo nos níveis séricos de NO em pacientes com DC e uma diminuição dos níveis nos pacientes com dengue grave (DCC/FHD) em comparação com os indivíduos saudáveis não infectados (figura 21). Não foram detectadas diferenças entre os grupos com diferentes formas clínicas da infecção pelo dengue vírus durante a fase de defervescência (figura 21).

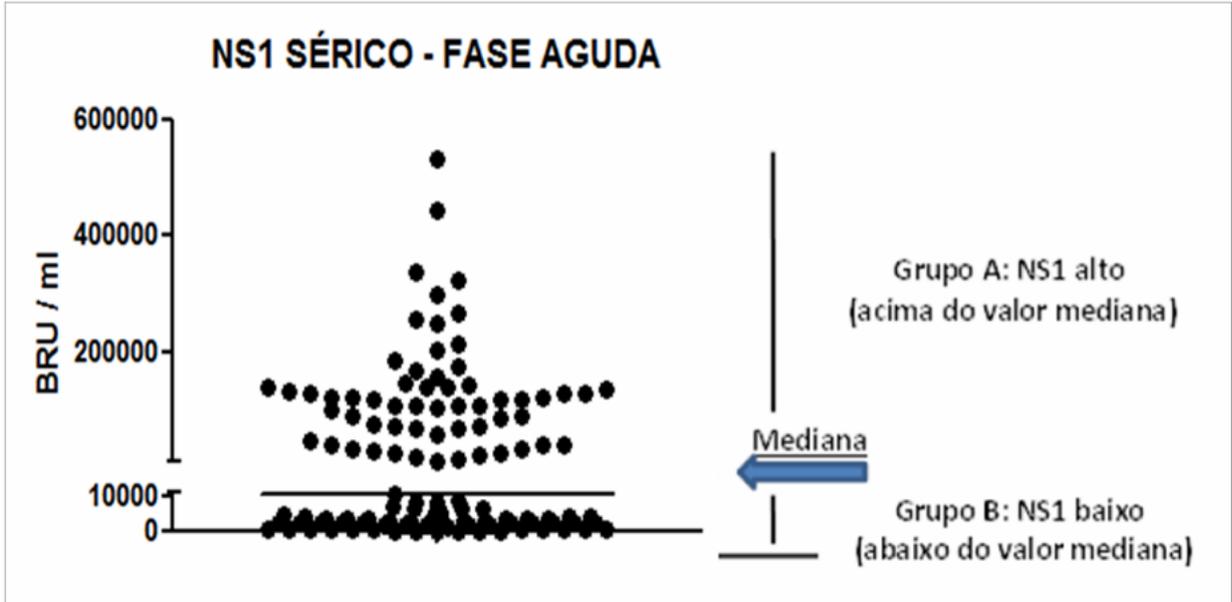


Figura 18 – Distribuição dos níveis séricos de proteína não estrutural 1 (NS1) secretada pelo vírus Dengue durante a fase aguda febril em todos os pacientes infectados envolvidos neste estudo, quantificados pelo Kit ELISA Platellia (Biorad) conforme descrito na seção material e métodos e expresso em unidades Biorad de NS1  $\times 10^3$  por ml de soro (BRU  $\times 10^3$ /ml). A mediana ( $10,4 \times 10^3$  BRU de NS1/ml) dos valores encontrados aparece indicada por uma seta azul. A partir da distribuição encontrada estabeleceram-se dois grupos de pacientes para estudos posteriores: Grupo A com altos níveis séricos de NS1 (valores igual ou acima dos valores da mediana) e Grupo B com baixos níveis séricos de NS1 (valores abaixo do valor encontrado para a mediana)

### NS1 SÉRICO – DEFERVECÊNCIA

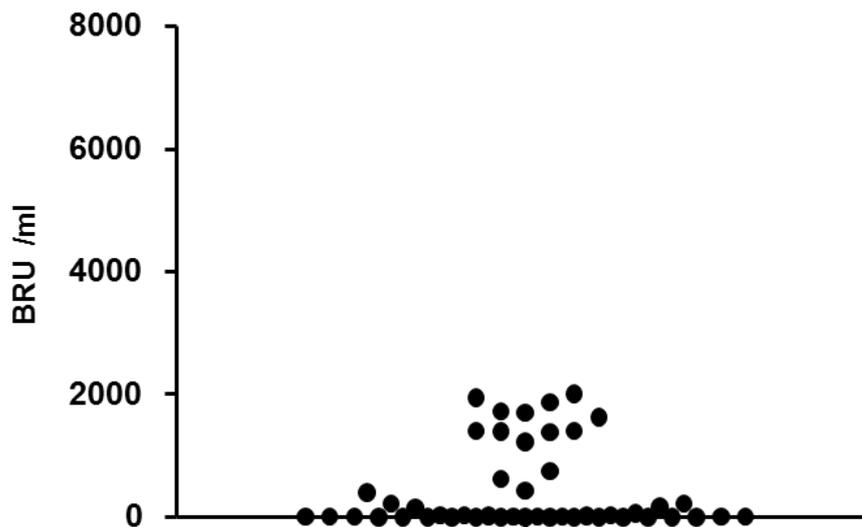


Figura 19 – Distribuição dos níveis de proteína não estrutural 1 (NS1) secretada pelo vírus Dengue durante a fase de defervescência em pacientes infectados, quantificados pelo Kit ELISA Platellia (Biorad) conforme descrito na seção material e métodos e expresso em unidades Biorad de NS1 por ml de soro (BRU /ml).

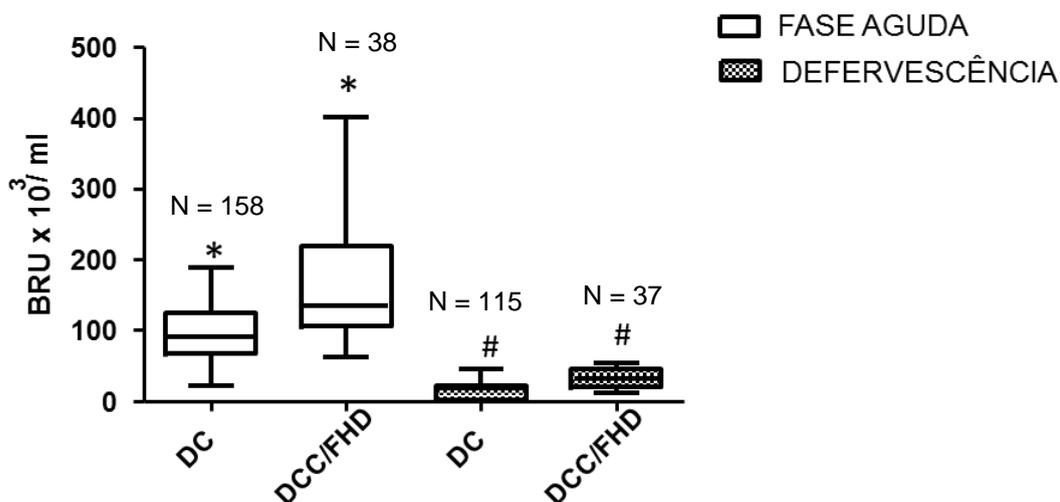


Figura 20 – Níveis séricos de proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus Dengue durante a fase aguda febril e na fase de defervescência em pacientes com dengue clássica (DC) e dengue grave (DCC/FHD) quantificados pelo Kit ELISA Platellia (Biorad) e expressos em unidades Biorad de NS1 x 10<sup>3</sup> por ml de soro (BRU X 10<sup>3</sup>/ml), conforme descrito na seção material e métodos. Símbolos equivalentes (\*, #) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

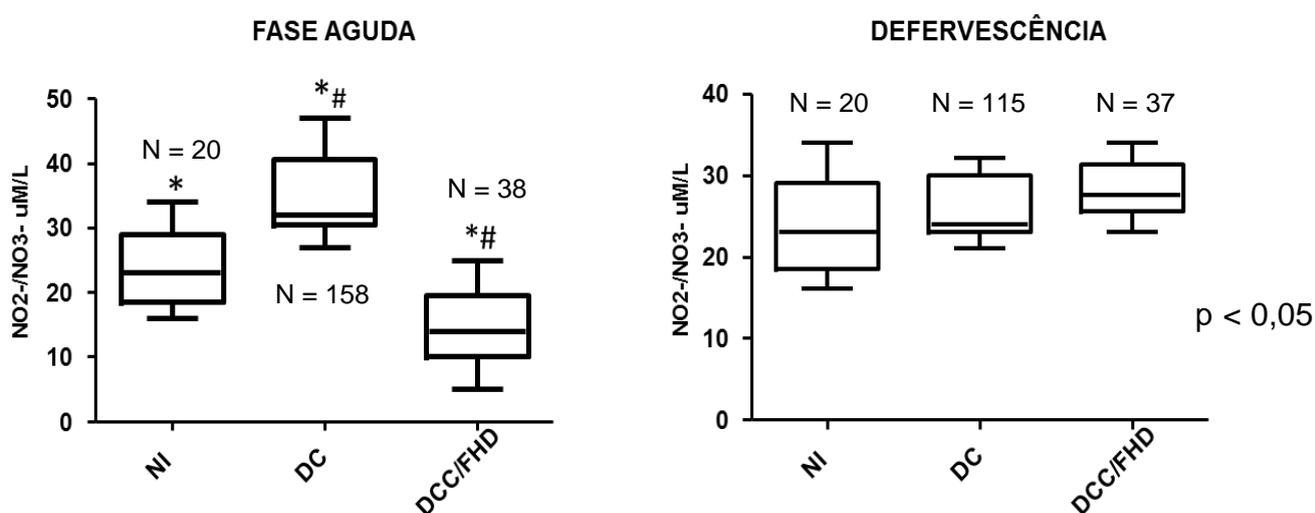


Figura 21 – Níveis de óxido nítrico (NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>-) em amostras de soro de pacientes com dengue clássica (DC), dengue grave (DCC/FHD) e voluntários saudáveis não infectados (NI) avaliados pela reação de Griess, após a redução de amostras de soro com nitrato redutase. Símbolos equivalentes (\*, #) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

#### 4.2.2.2 Níveis séricos de NO e quantificação de NS1

Ao se analisar a distribuição dos níveis séricos de NS1 entre os pacientes infectados pelo DENV observou-se uma clara divisão entre dois grupos de pacientes. Um grupo exibindo baixos níveis de NS1 sérico (abaixo de  $10,4 \times 10^3$  BRU de NS1/ml) e outro com altos níveis de NS1 (igual ou superior a  $10,4 \times 10^3$  BRU de

NS1/ml). Assim, estabeleceu-se um ponto de corte e, além da forma clínica, também foram analisados dados do paciente de acordo com a quantidade de NS1 ( $<10,4 \times 10^3$  BRU de NS1/ml ou  $\geq 10,4 \times 10^3$  BRU de NS1/ml). Pode-se observar que os pacientes com níveis séricos elevados de NS1 apresentaram níveis séricos diminuídos de NO (figura 22).

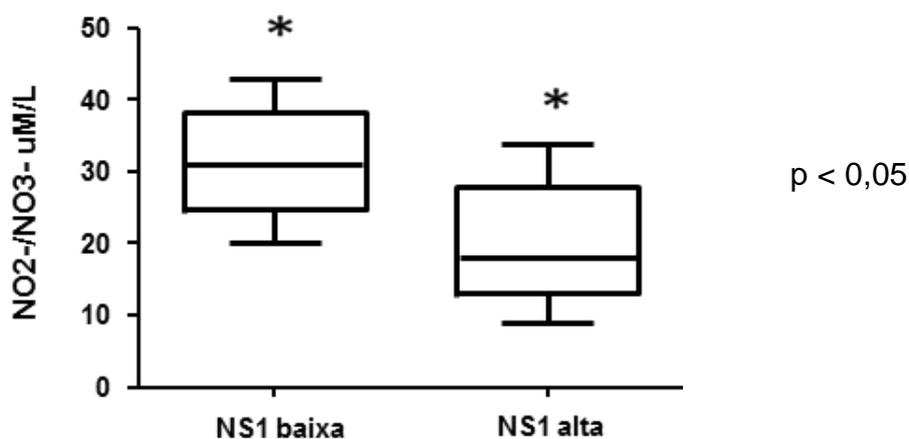


Figura 22 – Níveis séricos de óxido nítrico (NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>-) de amostras de grupos de pacientes infectados com vírus Dengue com baixos (NS1 baixa,  $< 10,4 \times 10^3$  BRU/ml) e altos (NS1 alta,  $\geq 10,4 \times 10^3$  BRU/ml) níveis séricos de NS1 medidos pela reação de Griess, após a redução de amostras de soro com nitrato redutase. Símbolos equivalentes (\*) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

### 4.2.3 Níveis de séricos de citocinas

#### 4.2.3.1 Níveis séricos de citocinas e forma clínica

Durante a fase aguda febril da infecção por DENV, pacientes com FHD apresentaram aumento significativo nos níveis séricos de IL-10 e IL-12p40 e redução nos níveis de TNF- $\alpha$  em relação aos pacientes com DC. Já na fase de defervescência os pacientes com FHD apresentaram aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-10 e redução nos níveis de IL12p40 quando comparados aos pacientes com DC (figuras 23 a 28).

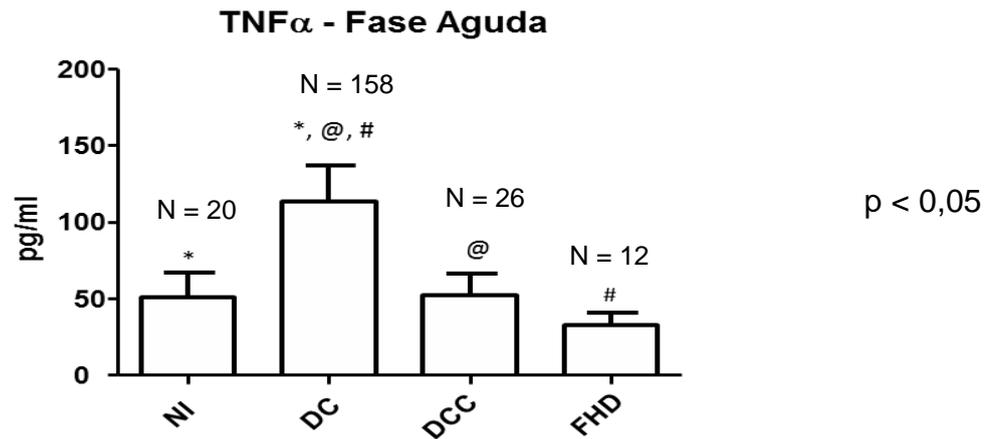


Figura 23 – Níveis séricos de TNF- $\alpha$  em amostras de soro de pacientes na fase aguda da infecção com dengue clássica (DC), dengue com complicações (DCC), febre hemorrágica do dengue (FHD) e voluntários saudáveis não infectados (NI) avaliados por ELISA. Símbolos iguais (\*,@,#) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

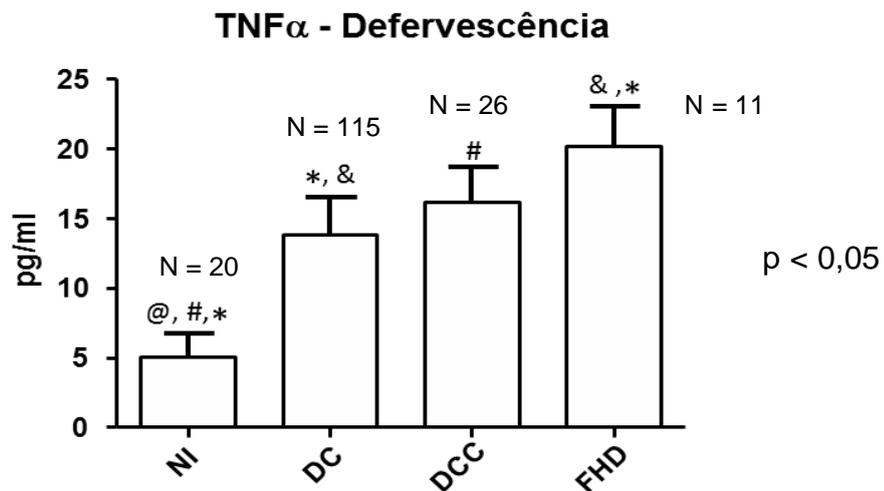


Figura 24 – Níveis séricos de TNF- $\alpha$  em amostras de soro de pacientes na fase de defervescência da infecção com dengue clássica (DC), dengue com complicações (DCC), febre hemorrágica do dengue (FHD) e voluntários saudáveis não infectados (NI) avaliados por ELISA. Símbolos iguais (\*,@,#,&) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

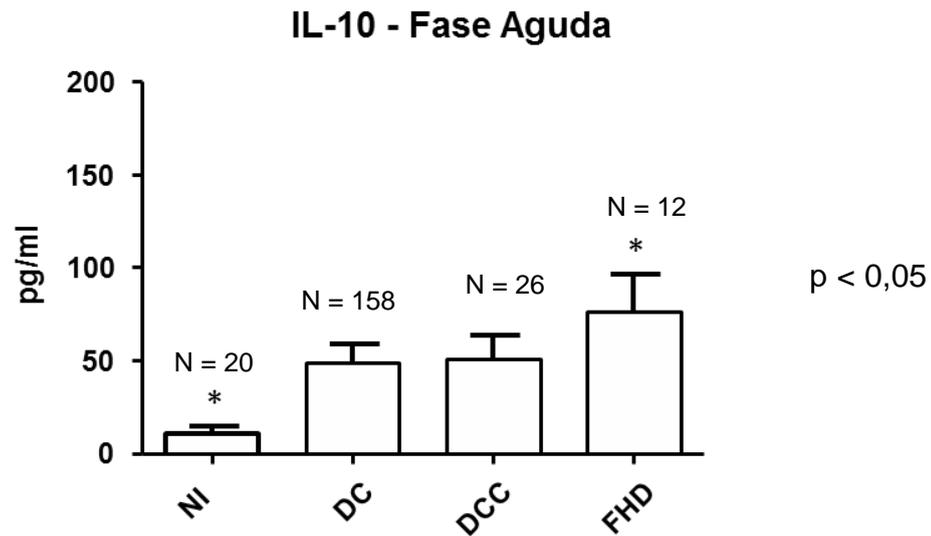


Figura 25 – Níveis séricos de IL-10 em amostras de soro de pacientes na fase aguda da infecção com dengue clássica (DC), dengue com complicações (DCC), febre hemorrágica do dengue (FHD) e voluntários saudáveis não infectados (NI) avaliados por ELISA. (\*) representa diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

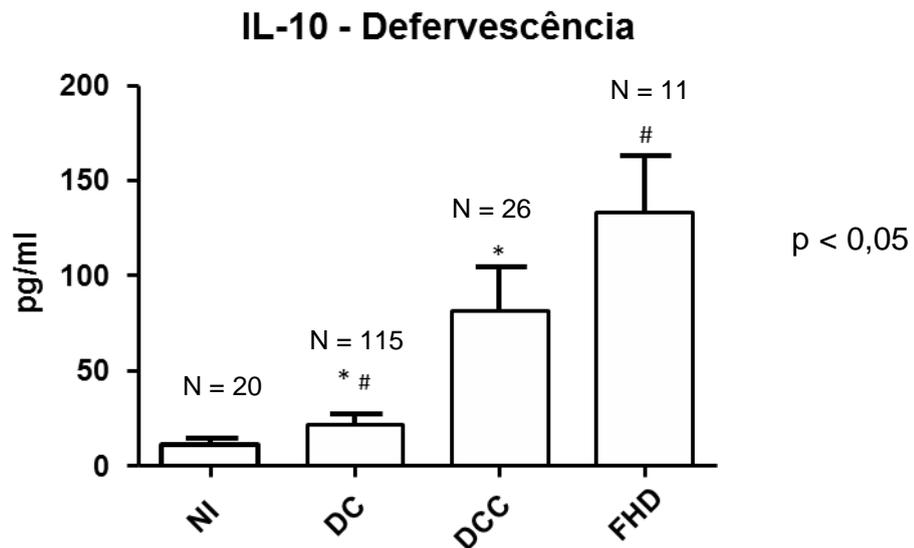


Figura 26 – Níveis séricos de IL-10 em amostras de soro de pacientes na fase de defervescência da infecção com dengue clássica (DC), dengue com complicações (DCC), febre hemorrágica do dengue (FHD) e voluntários saudáveis não infectados (NI) avaliados por ELISA. Símbolos iguais (\*, #) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

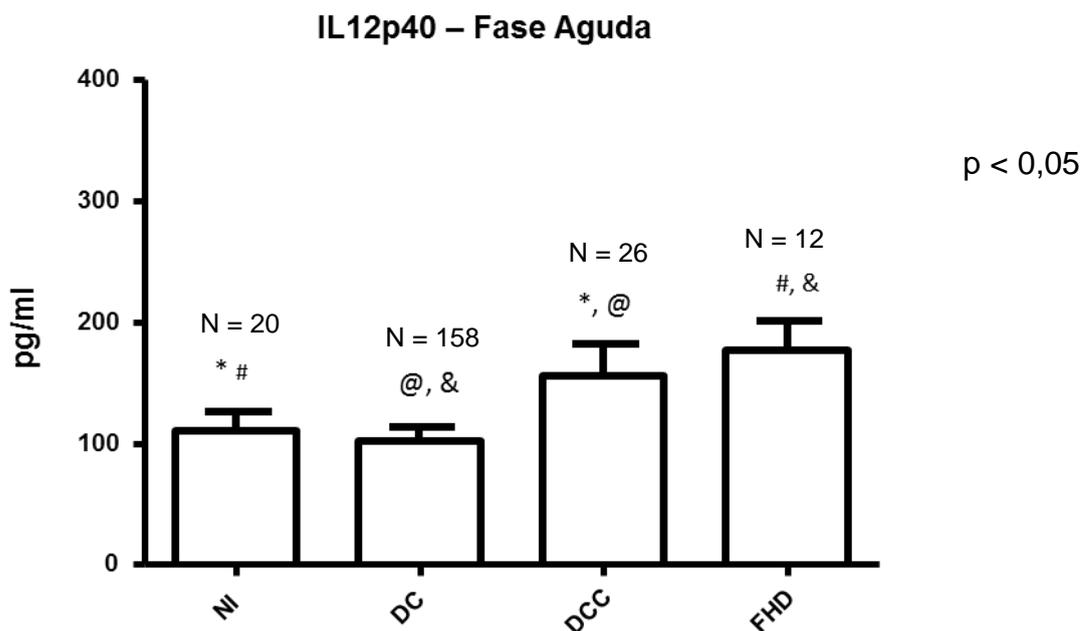


Figura 27 – Níveis séricos de IL-12 em amostras de soro de pacientes na fase aguda da infecção com dengue clássica (DC), dengue com complicações (DCC), febre hemorrágica do dengue (FHD) e voluntários saudáveis não infectados (NI) avaliados por ELISA. Símbolos iguais (\*, #, @, &) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

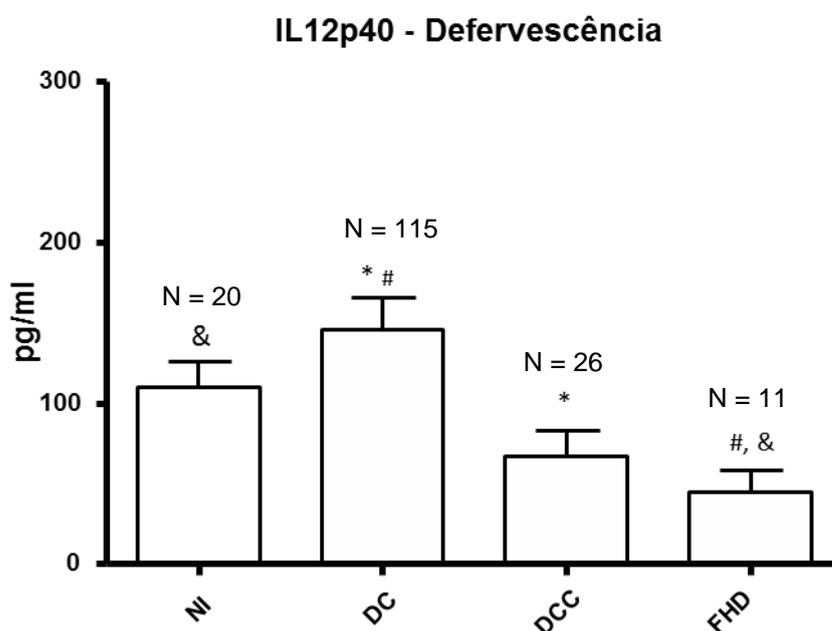


Figura 28 – Níveis séricos de IL-12 em amostras de soro de pacientes na fase de defervescência da infecção com dengue clássica (DC), dengue com complicações (DCC), febre hemorrágica do dengue (FHD) e voluntários saudáveis não infectados (NI) avaliados por ELISA. Símbolos iguais (\*, #, &) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

#### 4.2.3.2 Níveis séricos de citocinas e quantificação de NS1

Foram avaliadas as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12p40 no soro dos pacientes infectados pelo DENV incluídos neste estudo e distribuídas de acordo com

os níveis de NS1 secretados *in vivo* durante a fase aguda da infecção (figuras 29, 30 e 31). Pode-se perceber, na figura 29, que os pacientes do grupo que apresentam altos níveis de NS1 secretada *in vivo* na fase aguda da infecção apresentaram, neste mesmo período, menor quantidade de TNF- $\alpha$  circulante quando comparados aos pacientes com baixos níveis de NS1 solúvel (menor do que  $10,4 \times 10^3$  BRU de NS1/ml). As outras citocinas avaliadas, IL-10 e IL12p40, não apresentaram alterações significativas de acordo com os níveis de NS1 *in vivo* (figuras 30 e 31).

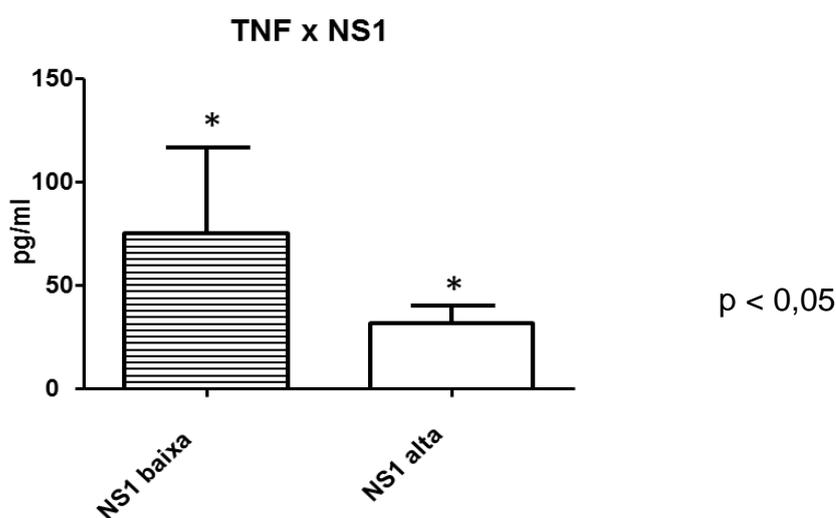


Figura 29 – Níveis séricos de TNF- $\alpha$  em amostras de soro de fase aguda de grupos de pacientes infectados com vírus Dengue apresentando baixos (NS1 baixa,  $< 10,4 \times 10^3$  BRU/ml) e altos (NS1 alta,  $\geq 10,4 \times 10^3$  BRU/ml) níveis séricos de NS1 avaliados por ELISA. Símbolos equivalentes (\*) representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

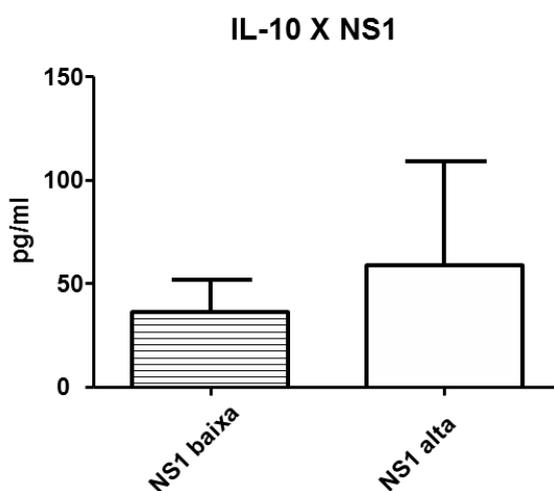


Figura 30 – Níveis séricos de IL-10 em amostras de soro de fase aguda de grupos de pacientes infectados com vírus Dengue apresentando baixos (NS1 baixa,  $< 10,4 \times 10^3$  BRU/ml) e altos (NS1 alta,  $\geq 10,4 \times 10^3$  BRU/ml) níveis séricos de NS1 avaliados por ELISA.

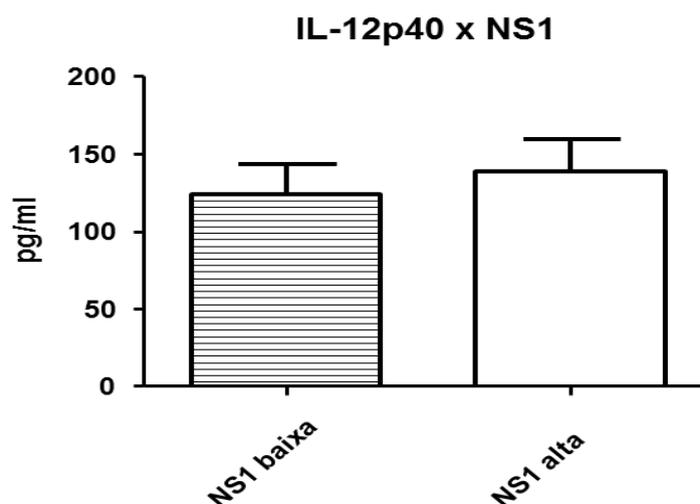


Figura 31 – Níveis séricos de IL12p40 em amostras de soro de fase aguda de grupos de pacientes infectados com vírus Dengue apresentando baixos (NS1 baixa,  $< 10,4 \times 10^3$  BRU/ml) e altos (NS1 alta,  $\geq 10,4 \times 10^3$  BRU/ml) níveis séricos de NS1 avaliados por ELISA.

#### 4.3 ESTUDOS DE CULTIVO CELULAR *in vitro*: EXPRESSÃO DE TLR4 E PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$

##### 4.3.1 Estimulação do TLR4 e produção de TNF- $\alpha$ , níveis séricos de NS1 e forma clínica

A produção de TNF- $\alpha$  por PBMCs em cultura após a estimulação do TLR4 com o agonista LPS também foi investigada em indivíduos com dengue e voluntários saudáveis não infectados. Pacientes com dengue hemorrágica apresentaram uma menor resposta à estimulação TLR4 do que os classificados como dengue clássica durante a fase aguda da infecção (figura 32). A figura 33 mostra que pacientes com dengue e que pertencem ao grupo que possui níveis séricos mais elevados de NS1, apresentaram uma modulação na resposta celular após a estimulação do TLR4 com o seu agonista LPS (com uma reduzida produção de TNF- $\alpha$ ) do que o grupo de pacientes com menor teor de NS1 ( $10,4 \times 10^3$  BRU/ml).

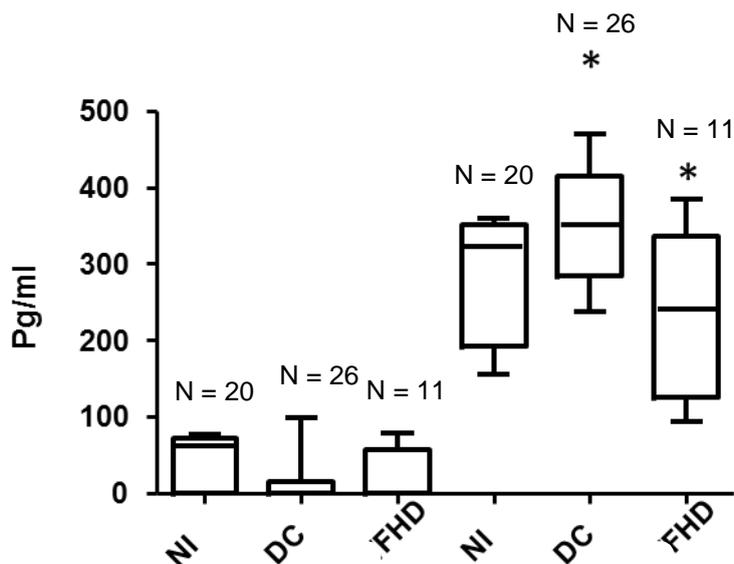


Figura 32 – Produção de TNF- $\alpha$  (pg/ml) por  $1 \times 10^6$  células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com dengue clássica (DC), dengue hemorrágica (FHD) e voluntários saudáveis não infectados (NI) estimuladas por 18 horas com 10  $\mu$ g/mL de lipopolissacarídeo bacteriano ultrapuro (LPS), quantificado por ELISA. Símbolos equivalentes (\*) representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

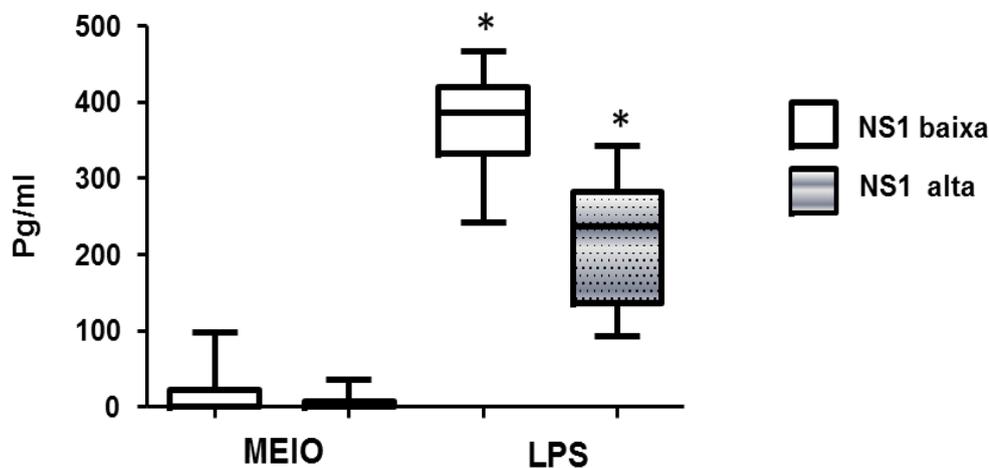


Figura 33 – Produção de TNF- $\alpha$  (pg/ml) por  $1 \times 10^6$  células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de grupos de pacientes infectados pelo vírus Dengue contendo baixos níveis séricos de NS1 (NS1 baixa,  $< 10,4 \times 10^3$  unidades/ml) ou altos (NS1 alta  $\geq 10,4 \times 10^3$  unidades/ml) após estimulação por 18 horas com 10  $\mu$ g/mL de LPS ultrapuro, quantificada por ELISA. Símbolos equivalentes (\*) representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

#### 4.3.2 Expressão de TLR4 por células CD14 +

Diante das alterações detectadas na resposta ao LPS (um agonista de TLR4) em células de pacientes com FHD, procuramos investigar se essa resposta reduzida poderia ser devido a modulações na expressão do TLR4 em monócitos

CD14+. De fato, a expressão de TLR4 encontrava-se diminuída em monócitos de pacientes com FHD, durante a fase aguda da doença, quando comparada com a expressão de células CD14 + obtidas de pacientes com dengue clássica (Figura 34 – Painel B). No grupo com altos níveis séricos de NS1 também foram associados à redução da expressão de TLR4 na membrana dessas células (Figura 34 – Painel C).

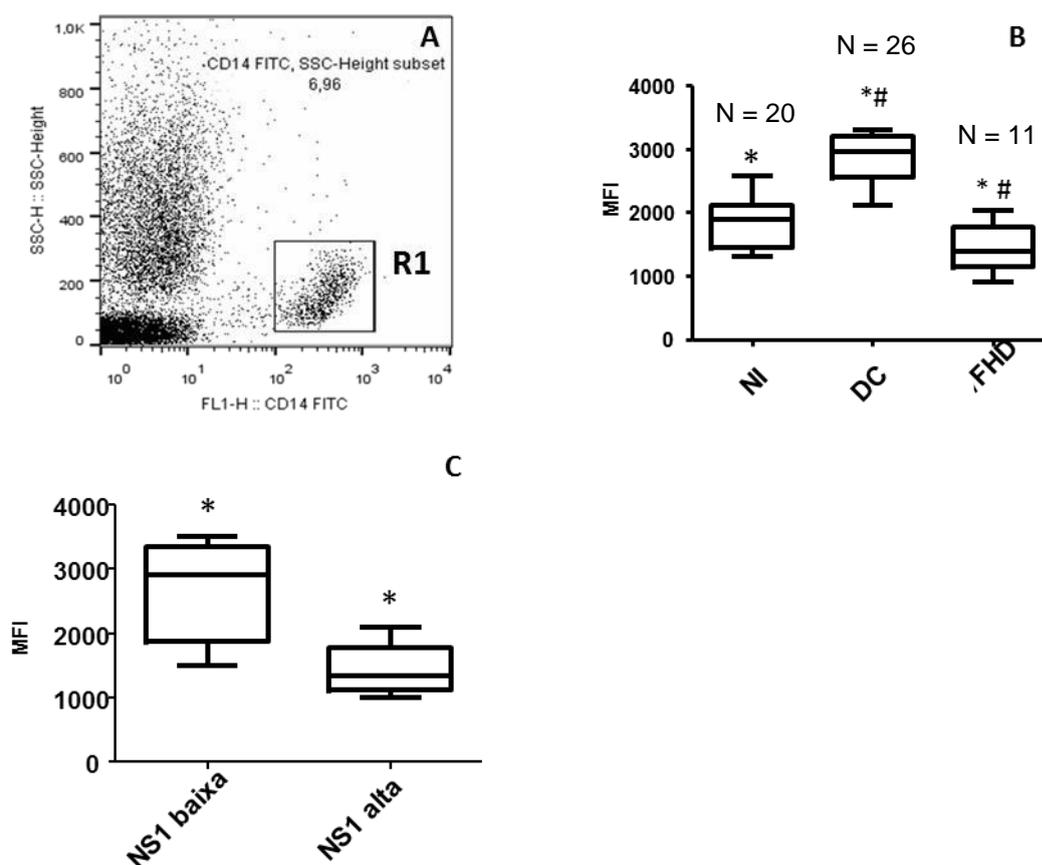


Figura 34 – Expressão de TLR-4 por células CD14+ de pacientes infectados pelo vírus Dengue. Uma região (R1) foi delimitada em SSC (granulosidade celular) x FL1/CD14+ e intensidade média de fluorescência (MFI) do marcador TLR4-PE foram analisados em histogramas (A). (B) representa MFI de TLR-4 obtida a partir de células CD14+ de pacientes com DC, FHD e voluntários saudáveis não infectados (NI). (C) representa MFI de TLR-4 obtida a partir de células CD14 + de grupos de pacientes infectados pelo vírus Dengue contendo baixos níveis séricos de NS1 (NS1 baixa,  $< 10,4 \times 10^3$  unidades/ml) ou altos (NS1 alta  $\geq 10,4 \times 10^3$  unidades/ml). Símbolos equivalentes (\*, #) representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

## 5 DISCUSSÃO

A cada ano, o vírus Dengue (DENV) infecta de 50 a 100 milhões de pessoas em todo o mundo. Além disto, estima-se que 2,5 bilhões de pessoas estejam em alto risco, vivendo em áreas tropicais endêmicas para o vírus (GUZMÁN et al., 2010; BRADY et al., 2010; MURRAY et al., 2013). No Brasil, a doença Dengue tem sido um problema grave de saúde pública desde 1980. Em 2013, dos 2.351.703 casos reportados nas Américas, aproximadamente 61% deles (1.451.432 casos) ocorreram no Brasil (BRADY et al., 2010).

A infecção pelo vírus da dengue pode ter várias apresentações clínicas e, frequentemente, pode apresentar evoluções e desfechos imprevisíveis. As manifestações clínicas podem incluir desde uma simples febre auto limitada durante a dengue clássica até o desenvolvimento de síndromes como a febre hemorrágica do dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD) com manifestações graves como o aumento da permeabilidade vascular, acúmulo de líquidos, hepatomegalia, queda na contagem de plaquetas, hemorragia e extravasamento de plasma associadas ao desenvolvimento de choque hipovolêmico fatal (KURANE & ENNIS, 1992; RIGAU-PEREZ, 1998).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das manifestações clínicas graves são pouco compreendidos e, apesar da realização de vários estudos em todo o mundo, os resultados encontrados têm sido por vezes controversos e até contraditórios (KURANE & ENNIS, 1992). Diversos mecanismos imunopatológicos tem sido propostos para explicar o desenvolvimento de formas graves na Dengue, entre eles o aumento da infecção dependente de anticorpos, também conhecido como “*Antibody-dependent enhancement*” (GUZMAN & VASQUEZ, 2010), a ativação inapropriada de células T (KURANE et al., 1989; ROTHMAN et al., 2011), uma resposta com “tempestade” ou “tsunami” de citocinas (ROTHMAN & ENNIS, 1999; CHATURVEDI et al., 2000) e fatores genéticos intrínsecos ao hospedeiro e ao vírus (YACOUB et al., 2013).

O presente estudo investigou, em pacientes infectados pelo vírus da dengue, as alterações de alguns parâmetros da resposta imune inata (expressão e estimulação do TLR4, produção de óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12p40) e suas associações com os níveis da proteína NS1 secretada *ex vivo* em diferentes fases e desfechos clínicos da doença.

O primeiro aspecto avaliado foi a distribuição dos níveis séricos de NS1 durante o curso da infecção pelo vírus dengue em humanos. Verificamos uma distribuição muito heterogênea dos níveis de NS1 encontrados na fase aguda da infecção (figura 18). Seus níveis de circulação variaram bastante entre os pacientes durante o curso da doença, de 2,2 a  $600 \times 10^3$  BRU por mililitro. Pacientes com DCC/FHD apresentaram níveis séricos de NS1 maiores do que aqueles com DC tanto na fase aguda quanto no período de defervescência. Além disso, durante a fase de defervescência, os níveis de NS1 declinaram mais acentuadamente em pacientes com DC do que naqueles com FHD (figura 20). Embora não tenhamos avaliado diretamente a carga viral no presente estudo, podemos pensar que pacientes com DC estejam desenvolvendo uma resposta mais adequada na fase aguda do que os pacientes com DCC e FHD, resultando numa eliminação mais eficaz dos vírus, com conseqüente redução da antigenemia na fase de defervescência.

Sabe-se que o genoma do DENV codifica 10 produtos gênicos, incluindo proteínas estruturais do capsídeo (C), membrana (prM) e envelope (E), além das proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (SHURTLEFF et al., 2001; HOLMES & TWIDDY, 2003). Dentre as proteínas não estruturais, a NS1 se destaca por apresentar características distintas, uma vez que pode ser detectada em forma solúvel em altas concentrações no soro dos pacientes infectados na fase aguda e durante toda a fase clínica da doença, além de poder ser encontrada também no meio intracelular ou ainda na membrana das células infectadas (MULLER & YOUNG, 2013). A partir de todas estas características intrínsecas da NS1 espera-se uma provável conexão entre seus níveis séricos com alterações nos parâmetros da resposta imune do hospedeiro.

O fato da NS1 circular na corrente sanguínea em níveis muito diferentes em cada paciente durante a fase aguda da infecção também sugere que esta proteína pode contribuir, por si só, com a patofisiologia da doença. A concentração de NS1 circulante parece ser um ponto-chave, uma vez que altos níveis desta proteína viral podem afetar a resposta imune e influenciar o desenvolvimento posterior de diferentes formas clínicas. Estudo anterior mostrou que a quantidade de NS1 circulando no soro humano parece ser significativamente maior em pacientes que desenvolveram FHD do que naqueles apresentando a forma clássica da doença (VASANAWATHANA, BHAKDI, MALASIT, 2006). Embora não esteja claro se isso

seria a causa ou a consequência do extravasamento de plasma, uma conexão entre o aumento da replicação viral e o aumento da permeabilidade vascular que caracterizam a infecção pelo DENV ainda é objeto de conjecturas. Durante a infecção pelo DENV, camundongos e seres humanos desenvolvem anticorpos anti-NS1 que reagem cruzadamente com epítomos em células endoteliais, induzindo um processo de apoptose dependente de óxido nítrico (LIN et al., 2002). Resultados encontrados no presente estudo e em estudos anteriores inferem que a intensidade de replicação do DENV durante os estágios iniciais da infecção pode ser capaz de influenciar o desfecho clínico, mas a patogênese da disfunção endotelial associada ao extravasamento de plasma ainda permanece como um fenômeno complexo e pouco compreendido.

É possível que durante a infecção pelo DENV, a proteção ou a patogênese sejam determinadas na interface entre a imunidade inata e adaptativa. Esta interface é controlada por citocinas e fatores solúveis produzidos em consequência das interações do DENV com seus principais alvos: monócitos humanos e células endoteliais (SCOTT et al., 1980; JESSIE, et al., 2004). Entre os parâmetros imunes que podem ser afetados pelos níveis da NS1 viral, acredita-se que o óxido nítrico (NO) seja uma molécula que merece destaque. O NO é uma molécula gasosa sintetizada por enzimas conhecidas como NO sintases (NOS) (VALLANCE & MONCADA, 1994). Atualmente as NOS são classificadas em três isoformas: NOS endotelial (eNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS neuronal (nNOS).

A principal função fisiológica do NO derivado da eNOS é a vasodilatação e a redução da resistência vascular periférica, que podem levar a hipotensão, choque e morte se não forem corrigidas rapidamente. Por outro lado, a iNOS pode ser encontrada em vários tipos de células, como macrófagos e células endoteliais, e é expressa quando é aplicado estímulo apropriado, como o produzido por lipopolissacárido (LPS) ou pelo IFN- $\gamma$  (SESSA, 1994). O NO produzido por macrófagos e células endoteliais participa e regula inúmeros processos fisiológicos, como a inibição da adesão de leucócitos e da agregação de plaquetas, sendo também capaz de regular a proliferação celular (SESSA, 1994; VALLANCE & MONCADA, 1994).

Níveis de NO encontram-se elevados em muitas doenças infecciosas, incluindo a infecção pelo DENV (VALERO et al., 2002). O NO pode desempenhar importante papel na gravidade das febres virais hemorrágicas (SANCHEZ et al.,

2004), provavelmente quando produzido em altas concentrações, também por afetar o tônus vascular e contribuir para o desenvolvimento de um quadro de choque. Por outro lado, uma vez que o NO é considerado uma molécula com inúmeras ações fisiológicas (MOCELLIN, BRONTE, NITTI, 2007), o aumento dos níveis de NO nos casos de DC também pode vir a desempenhar um relevante papel na diminuição da carga viral e alterar a evolução da doença, prevenindo o aparecimento de formas mais graves. Os pacientes que apresentaram baixos níveis séricos de NS1 durante a fase aguda da doença também apresentaram, no presente estudo, níveis mais elevados de NO (figura 22). Quando o DENV foi co-cultivado com células de Kupffer ou com esplenócitos, detectou-se um aumento na produção de NO (MARIANNEAU et al., 1999). Monócitos isolados de diversos pacientes encontram-se com a iNOS ativada e o DENV mostra-se susceptível a ação de doadores de NO (NEVES-SOUZA, et al., 2005). Além disto, o vírus pode ser detectado em taxas mais altas em células infectadas que foram tratadas previamente com inibidores da iNOS, indicando que o NO deve participar de uma maneira importante, controlando a infecção de monócitos pelo DENV, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (NEVES-SOUZA, et al., 2005).

Em nosso estudo, encontramos níveis reduzidos de NO sérico em pacientes com DCC/DHF (figura 21). A razão para os baixos níveis de NO nos pacientes com DCC e DHF não está totalmente clara para nós, mas danos às células endoteliais durante a fase aguda da infecção pelo DENV com uma conseqüente queda na atividade da NOS endotelial podem estar envolvidos. O padrão encontrado de baixos níveis séricos de NO no grupo DCC/FHD durante a fase aguda febril e níveis mais elevados durante a fase de defervescência também pode ser devido a diferentes modulações sofridas pela eNOS e pela iNOS em cada fase, hipótese que merece ser testada.

O NO também parece estar envolvido na progressão da infecção por dengue, independente do sorotipo do DENV. Estudo conduzido por LEVY et al. (2010) apontou que diferentes sorotipos do vírus dengue não induzem diferenças estatisticamente significativas nos níveis de NO. Analisados em conjunto, dados preliminares encontrados demonstram que o NO pode não apenas contribuir para a proteção, mas também para a gravidade da infecção por DENV, dependendo da quantidade e da fase da doença em que é produzido.

Além do NO, durante a infecção pelo DENV, monócitos e/ou macrófagos ativados também produzem TNF- $\alpha$ . O fator de necrose tumoral alfa parece exercer um papel importante no desenvolvimento das formas graves da dengue, pois uma correlação entre a concentração elevada do receptor solúvel de TNF- $\alpha$  no sangue e a gravidade da FHD foi descrita por BRAGA et al. (2001). Um estudo sobre polimorfismos identificou que o alelo TNF-308A parece ser um fator de risco para manifestações hemorrágicas em pacientes infectados pelo DENV (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004 ; CHUANSUMRIT et. al., 2013). Uma relação causal direta entre TNF- $\alpha$  e FHD foi descrita em um modelo experimental utilizando camundongos, no qual a deficiência de TNF- $\alpha$  reduziu o risco de desenvolvimento de hemorragias (YEN et al., 2008).

Em nosso estudo verificamos que o TNF- $\alpha$ , nas formas graves da dengue (DCC/FHD), se elevou mais tardiamente no soro quando comparado aos pacientes com dengue clássica (figuras 23 e 24). Além disto, uma alta concentração de NS1 na fase aguda parece afetar os níveis séricos *in vivo* (figura 29) e também a produção *in vitro* do fator de necrose tumoral alfa por células mononucleares do sistema imune (figura 33). O efeito da elevação da NS1 sérica parece ser específico para a produção de TNF- $\alpha$ , uma vez que as outras citocinas (IL-10 e IL12p40) não foram significativamente afetadas (figuras 30 e 31). A análise destes dados em conjunto sugere que tanto o TNF- $\alpha$  quanto o NO na fase aguda podem estar exercendo um papel protetor associado à redução da carga viral, evitando o aparecimento de sintomas mais graves presentes na FHD e SCD. Por outro lado, estas duas moléculas (NO e TNF- $\alpha$ ), também são conhecidas como “facas de dois gumes” (MOCELLIN, BRONTE, NITTI, 2007) por exercerem ações antagônicas dependendo da dose e da fase da doença em que são produzidas. Neste sentido, no período de defervescência já observamos um perfil distinto do observado na fase aguda, com aumento de TNF- $\alpha$ , IL-10 e NO aliado a uma redução da IL12p40 (figuras 21, 24, 26 e 28) nos pacientes com DCC e FHD. O TNF- $\alpha$  e o NO são moléculas vasoativas e a IL-10 está presente no desenvolvimento de respostas do tipo Th2; estas características estão associadas a um pior prognóstico na Dengue (CHATUVERDI et al., 1999b; PEELING et al., 2004).

TNF- $\alpha$  e NO são produzidos por monócitos ativados em resposta à estimulação do receptor toll like 4 (TLR4). Dentro deste contexto, a modulação da

capacidade de resposta e expressão do TLR4 são questões importantes para se investigar durante a infecção humana pelo DENV, e foi objeto do presente estudo. Os receptores toll (TLRs) são importantes no reconhecimento microbiano (BOWIE & HAGA, 2005) e também estão envolvidos na indução de moléculas antivirais e citocinas pró-inflamatórias que podem também ter ações imunopatológicas (BOWIE & HAGA, 2005).

O papel dos TLRs em infecções virais tem sido investigado (ZHANG, et al., 2007), mas este conhecimento é ainda muito limitado na infecção pelo DENV. Dados encontrados na literatura apontam que a entrada do DENV na célula é facilitada por meio de anticorpos, ocorrendo, deste modo, ativação de reguladores negativos da expressão de TLRs. A modulação do TLR4 e de genes associados com sua sinalização foram observados em experimentos que utilizaram a linhagem de monócitos THP-1 (TEO, MACARY, TAN, 2014). Os resultados deste estudo apontam que diversos mecanismos imune supressivos são ativados quando os vírus utilizam anticorpos como facilitadores de sua entrada nos monócitos. A modulação da produção de citocinas pode proporcionar uma vantagem para o DENV se propagar nos macrófagos e em células dendríticas do hospedeiro, facilitando o desenvolvimento de formas graves da doença.

O TLR4 é também conhecido por ser o receptor para lipopolissacarídeo (LPS), um produto da membrana de bactérias gram negativas, e a estimulação com agonistas do TLR4 induz a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos ativados (TAKEUCHI & AKIRA, 2004; ESSAKALLI et al., 2009). Portanto, a capacidade de resposta à estimulação da via do TLR4 assim como a modulação da expressão deste receptor na membrana celular constituem-se em aspectos importantes a serem investigados durante a infecção pelo DENV em humanos. Os resultados obtidos em nosso estudo indicam que há uma diferença na regulação da expressão (figura 34 – painel B), na capacidade de resposta (figura 32) e nos perfis de expressão das TLRs durante a fase aguda da DC e da FHD que também podem ser afetados pelos níveis séricos da NS1 (figura 33 e figura 34 – painel C).

Um estudo anterior demonstrou que existe uma interação entre o DENV, CD14 e TLR4 na membrana de monócitos e macrófagos, sendo o LPS, um ligante do complexo CD14-TLR4, foi capaz de bloquear a entrada do DENV e regular a produção de citocinas induzidas pelo vírus nestas células (CHEN et al., 1999). Portanto, parece existir um papel regulador para o receptor de LPS (TLR4) sobre a

produção de citocinas durante a fase aguda da infecção pelo DENV. A modulação do TLR4 demonstrada em nosso estudo pode, hipoteticamente, ocorrer por ação de proteínas virais como a NS1, conforme indicam os resultados obtidos nas figuras 29, 33 e 34. Até o momento, a função da NS1 é pouco compreendida, e estudos preliminares demonstram a relevância desta molécula nos processos de replicação do RNA viral (MULLER & YOUNG, 2013); entretanto, uma ligação entre os níveis de NS1 circulantes no hospedeiro e a perturbação da resposta imune e de citocinas vasoativas associada com o aumento da permeabilidade que caracteriza a dengue grave encontra-se ainda em estágios iniciais de investigação.

No presente trabalho foram investigadas as relações entre os níveis de NS1 *in vivo* e parâmetros da resposta imune, como a expressão de TLR4 e a produção de TNF- $\alpha$ /IL-10/IL-12p40/NO em pacientes infectados pelo DENV. Os resultados obtidos apontam que pacientes com DCC e FHD apresentaram alterações na resposta imune com baixa expressão e resposta de TLR4 e reduzida produção de TNF- $\alpha$  e NO durante a fase aguda da doença. Estes dados indicam que uma alteração na capacidade de resposta e expressão de TLR4 em células CD14 de pacientes com DCC e DHF durante os períodos iniciais da infecção pode contribuir para o aparecimento de sintomas mais graves e desfechos clínicos distintos. Entretanto, estudos adicionais são necessários para se identificar precisamente o papel destes mediadores e as vias no desenvolvimento de formas mais graves da infecção pelo DENV em humanos.

## 6 CONCLUSÃO

A quantificação dos níveis séricos da proteína NS1 pode vir a ser, no futuro, um marcador de prognóstico para os casos de dengue, entretanto, novos estudos devem ser realizados para a confirmação dessa hipótese. Acreditamos que níveis elevados de NS1 viral alteram parâmetros da resposta imune em pacientes infectados pelo DENV e contribuem para o desenvolvimento de diferentes desfechos clínicos.

Os resultados encontrados no presente estudo apontam que pacientes com dengue grave, classificados como dengue com complicações (DCC) e dengue hemorrágica (FHD), apresentam alterações em parâmetros da resposta imune, com baixa expressão e capacidade de resposta de TLR4, assim como alterações na produção de IL-10, TNF- $\alpha$  e NO, associadas às diferentes fases da infecção e também aos diferentes níveis de NS1 secretados *in vivo*. Tomados em conjunto, os dados indicam que o reconhecimento e subsequente ativação do TLR4 é um fator contribuinte para a evolução da doença dengue para formas mais graves em humanos.

## REFERÊNCIAS

- ACIOLI-SANTOS, B.; SEGAT, L.; DHALIA, R.; BRITO, C. A. A.; BRAGA-NETO, U. M.; MARQUES, E. T. A.; CROVELLA, S. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Human Immunology**, v. 69, p. 122-128, 2008.
- AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K.; BARBOSA, T. P.; NÉRIS, P. L.; CALDAS, J. P.; SOUSA, S. C.; LEITE, J. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; VASCONCELLOS, M. L.; OLIVEIRA, M. R. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v. n. p. 1-10, 2012.
- AZEREDO, E. L.; KUBELKA, C. F.; ALBUQUERQUE, L. M.; BARBOSA, L. S.; DAMASCO, P.V.; AVILA, C. A.; MOTTA-CASTRO, A.R.; CUNHA, R. V.; MONTEIRO, R. Q. Tissue factor expression on monocytes from patients with severe dengue fever. Letter to the Editor. **Blood cells, molecules, and diseases**, v. 45, p. 334-335, 2010.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p.C1424-1437, 1996.
- BIO-RAD DENGUE NS1 Ag STRIP 70700. 25 testes rápidos para a detecção qualitativa do antígeno NS1 do vírus da dengue no soro e plasma humano. **Testing Procedure**. 881097-2012/10.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, p. 907–916, 2001.
- BOWIE, A. G.; HAGA, I. R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. **Mol Immunol**. v. 42, p. 859–67, 2005.
- BRADY, O. J.; GETHING, P.W.; BHATT, S.; MESSINA, J. P.; BROWNSTEIN, J. S. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS Negl Trop Dis**.; v. 6, p. e1760, 2012.
- BRAGA, E. L.; MOURA, P.; PINTO, L. M.; IGNACIO, S. R.; OLIVEIRA, M. J.; CORDEIRO, M. T.; KUBELKA, C. F. Detection of circulating tumor necrosis factor- $\alpha$ , soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 229-232, 2001.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Documentos com informações sobre a situação da dengue no Brasil (dados, estatísticas, história e muito mais).**

Família Brasil. 06 ago. 2008. Disponível em:

<http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.combateadengue.com.br/wp-content/uploads/2008/06/casos-dengue1990a2007.gif&imgrefurl=http://www.combateadengue.com.br/%3Fcat%3D12&usq=KpNKwluq0XPmyvxad6t24bKPUKq=&h=380&w=470&sz=7&hl=pt-BR&start=132&tbid=PTVaUTQIHWFPDM:&tbnh=104&tbnw=129&prev=/images%3Fq%3Ddengue%26start%3D120%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26hl%3Dpt-BR%26sa%3DN>>. Acesso em: out. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue.** Brasília-DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica de 11/08/2010: isolamento do sorotipo DENV-4 em Roraima/Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 80 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. A dengue no Brasil. 02 Abril 2013. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha\\_dengue.html](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html). Acesso em abril de 2013.

BRENNAN, P. A.; UMAR, T.; BOWDEN, J.; HOBKIRK, A.; SPEDDING, A.V.; CONROY, B.; ZAKI, G.; MACPHERSON, D.W. Nitric oxide synthase expression is downregulated in basal cell carcinoma of the head and neck. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 6, p. 633-636, 2000.

CARDOSO, C. O. **Esquistossomose humana: avaliação da resposta imunológica em pacientes com diferentes graus de fibrose hepática.** Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia da FMTM para obtenção do grau de Mestre. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 2002, 173 p.

CHAPLIN, C. S. **O Caminho da Vida.** Filme: O Grande Ditador, 1940.

CHARNSILPA, W.; TAKHAMPUNYA, R.; ENDY, T. P.; MAMMEN JR, M. P.; C. M.; NGUYEN, V. C.; RIZZO, N.; VÁZQUEZ S.; YOKSAN, S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 30-38, 2010.

CHATURVEDI, U. C.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI, E. A.; MUSTAFA, A. S. Cytokine cascade en dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 28, p. 183-188, 2000.

CHATURVEDI, U. C.; ELBISHBISHI, E. A.; AGARWAL, R.; RAGHUPATHY, R.; NAGAR, R.; TANDON, R.; PACSA, A. S.; YOUNIS, O. I.; AZIZIEH, F. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **Journal of Medical Virology**, v. 59, n. 3, p. 335-340, 1999a.

CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R. Nitricoxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 56 p. 9–24, 2009.

CHATURVEDI, U. C.; RAGHUPATHY, R.; PACSA, A. S. Shift from a Th1-type response to Th2-type in dengue haemorrhagic fever. **Curr Sci**, v. 76, p. 63–69, 1999b.

CHEN, Y.; SJOLINDER, M.; WANG, X.; ALTENBACHER, G.; HAGNER, M.; BERGLUND, P.; GAO, Y.; LU, T.; JONSSON, A-B.; SJÖLINDER, H. Thyroid hormone enhances nitric oxide-mediated bacterial clearance and promotes survival after meningococcal infection. **PLoS One**, v. 7, n. 7, e41445, 2012.

CHEN Y. C.; WANG, S. Y.; KING, C. C. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. **J. Virol.** V. 73, p. 2650–2657, 1999.

CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n.12, p. 907-916, 2001.

CHUANSUMRIT, A.; ANANTASIT, N.; SASANAKUL, W.; CHAIYARATANA, W.; TANGNARARATCHAKIT, K.; BUTTSEP, P.; CHUNHAKAN, S.; YOKSAN, S. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. **Paediatr Int Child Health**. v. 3, p. 97-101, 2013.

COL-ARAZ, N.; PEHLIVAN, S.; BASPINAR, O.; OGUZKAN-BALCI, S.; SEVER, T.; BALAT, A. Role of cytokine gene (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-6, and IL-10) polymorphisms in pathogenesis of acute rheumatic fever in Turkish children. **Eur J Pediatr**. v. 171, n. 7, p. 1103-8, 2012.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228 p.

COSTA, V. V. **Papel do IFN- e da iNOS na patogênese do dengue experimental**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Mestre. Belo Horizonte, 2009.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; VALADÃO, D. F.; CISALPINO, D.; DIAS, A. C. F.; SILVEIRA, K. D.; KANGUSSU, L. M.; ÁVILA, T. V.; BONFIM, M. R. Q.; BONAVENTURA, D.; SILVA, T. A.; SOUSA, L. P.; RACHID, M. A.; VIEIRA, L. Q.; MENEZES, G. B.; PAULA, A. M.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- $\gamma$  in host resistance to infection. **PLoS One**, v. 6, n. 5, e1663, 2012.

de KRUIF M. D.; SETIATI, T. E.; MAIRUHU, A. T.; KORAKA, P.; ABERSON, H. A.; SPEK, C. A.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; REITSMA, P. H.; BRANDJES, D. P. M.; SOEMANTRI, A.; van GORP, E. C. M. Differential gene expression changes in children with severe dengue virus infections. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 2, n. 4, e215, p. 1-9, April 2008.

DEWI, B. E.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 121, p. 171-180, 2004.

ESPADA-MURAO, L. A.; MORITA, K. Dengue and soluble mediators of the innate immune system. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 53-62, 2011.

ESSAKALLI, M.; ATOUF, O.; BENNANI, N.; BENSEFFAJ, N.; OUADGHIRI, S.; BRICK, C. Toll-like receptors. **Pathol Biol (Paris)**, v. 57, p. 430–438, 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, e1449, p. 1-12, 2011.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M. T.; GENDZEKHADZE, K.; RIVAS-VETENCOURT, P.; LAYRISSE, Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v. 64, p. 469, 2004.

FUKUTO, J. M. Chemistry of nitric oxide: biologically relevant aspects. In: **Advances in Pharmacology**, v. 34, chapter 1, p. 1-15, Ed. Ignarro 1.; Murad F. Acad. Press, 1995.

GAGNON, S. J.; MORI, M.; KURANE, I.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; KALAYANAROOJ, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A.L. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. **J Med Virol.**, v. 67, n. 1, p. 41-46, 2002.

GLUBER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n.3, p. 480-496, 1998.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, p. 131-128, 1982.

GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **Journal of medical virology**, v. 59, p. 329-334, 1999.

GRISHINA, G. V.; GERBUT, K. A.; REMIZOVA, M. I.; SELIVANOV, E. A. Use of nitric oxide producer L-arginine during infusion therapy of experimental hemorrhagic shock. **Bull Exp Biol Med**, v. 154, n. 3, p. 312-315, 2013.

GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and hemorrhagic fever**. CAB International, London, 1997.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **Viruses**. v. 12, p. 2649–2662, 2010.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J. GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews – Microbiology**, December, p. S7-S16, 2010.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2003.

HIRATA, M.; KAGE, M.; HARA, T.; YONEDA, Y.; ZHANG, M.; FUKUMA, T. *Schistosoma japonicum* egg granuloma formation in the interleukin-4 or interferon- $\gamma$  deficient host. **Parasite Immunology**, v. 23, p.271-280, 2001.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2003.

HUANG, H.; MARTASEK, P.; ROMAN, L. J.; SILVERMAN, R. B. Synthesis and evaluation of peptidomimetics as selective inhibitors and active site probes of nitric oxide synthases. **J Med Chem**, v. 43, n. 15, p. 2938-2945, 2000.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 4, p. 272-279, 2010.

JESSIE, K.; FONG, M. Y.; DEVI, S.; LAM, S. K.; WONG, K. T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1411-1418, 2004.

KOCHETYGOV, N. I.; GERBUT, K. A.; REMIZOVA, M. I.; GRISHINA, G. V. Use of regulators of the nitric oxide synthesis in experimental hemorrhagic shock and its infusion therapy. **Patol Fiziol Eksp Ter**, Jul-Sep, n. 3, p. 35-39, 2011.

KOURI, G.; GUZMAN, M. G.; VALDES, L.; CARBONEL, I.; DEL ROSARIO, D.; VAZQUEZ, S.; LAFERTE, J.; DELGADO, J.; CABRERA, M. V. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. **Emerg Infect Dis.**, v. 4, p. 89–92, 1998.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 30, p. 329-340, 2007.

KURANE, I.; ENNIS, F. E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Semin Immunol.**, v. 2, p. 121-127, 1992.

KURANE, I.; INNIS, B. L.; NISALAK, A.; HOKE, C.; NIMMANNITYA, S.; MEAGER, A.; ENNIS, F. A. Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. **J Clin Invest.** v. 83, p. 506-513, 1989.

LEVY, A.; VALERO, N.; ESPINA, L. M.; AÑEZ, 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, p. 16-23, 2010.

LIAO, P. H.; HSU, Y. H.; YANG, H. H.; WANG, M. H.; CHEN, L. K. Involvement of extraneural tissues and upregulation of inducible nitric oxide synthase alter experimental infection with rabies virus in BALB/c mice and LEW/SsN rats. **Pathol Int**, v. 62, n. 9, p. 619-627, 2012.

LIBRATY, D. H.; PICHYANGKUL, S.; AJARIYAKHAJORN, C.; ENDY, T. P.; ENNIS, F. A. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3501-3508, 2001.

LIBRATY, D. H.; UBOL, S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. **J Med Virol**, v. 77, p. 89-95, 2005.

LIN, C. F.; LEI, H. Y.; SHIAU, A. L.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, C. C.; CHIU, S. C.; LIN, Y. S. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. **J Immunol.**, v. 169, p. 657-664, 2002.

LOKE, H.; BETHELL, D. B.; PHUONG, C. X.; DUNG, M.; SCHNEIDER, J.; WHITE, N. J.; et al. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: A double-edged sword? **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 1369, 2001.

MACEDO, G. A.; GONIN, M. L.; PONE, S. M.; CRUZ, O. G.; NOBRE, F. F.; BRASIL, P. Sensitivity and specificity of the world health organization dengue classification schemes for severe dengue assessment in children in Rio de Janeiro. **PLoS One**, v. 9, e96314, 2014.

MARIANNEAU, P.; STEFFAN, A. M.; ROYER, C.; DROUET, M. T.; JAECK, D.; KIRN, A.; DEUBEL, V. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. **J Virol.** v. 73, p. 5201-5206, 1999.

MARSON, J. M. **Caracterização genética e avaliação funcional do papel do polimorfismo da posição -1208 do gene do Fator Tissular no prognóstico da dengue.** Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para obtenção do título de Doutor. Uberaba, 2013, 122 p.

- MOCELLIN, S.; BRONTE, V.; NITTI, D. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. **Med Res Rev.**, v. 27, p. 317-352, 2007.
- MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **J R Soc Med**, v. 92, n. 4, p. 164-169, 1999.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109–142, 1991.
- MORRISON, J.; AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Innate immunity evasion by Dengue virus. **Viruses**, v. 4, n. 3, p. 397-413, 2012.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUNH, R.J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.
- MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Res.**, v. 98, p. 192-198, 2013.
- MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 587-619, 2011.
- MURRAY, N. E.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clin Epidemiol.** v. 5, p. 299–309; 2013.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K.S. **Microbiologia Médica**. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 980 p.
- 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. 18, p. 5-64, 2005.
- NOGUEIRA, R. M.; ARAUJO, J.M.; SHATZMAYER, H.G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 22, n. 5, p. 358-363, 2007.
- NOISAKRAN, S.; PERNG, G. C. Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, p. 401-408, 2008.
- OLIVEIRA, A. C. S. **Análise da imunorreatividade sorológica e bioatividade celular de peptídeos miméticos ao vírus dengue isolados por Phage Display**. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, Área de concentração Imunologia e Parasitologia Aplicadas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para a obtenção do título de Doutor. Uberaba, 2012, 100 p.

OLIVEIRA, A. C. S.; TERRA, A. P. S.; SILVA-TEIXEIRA, D. N.; DULGHEROFF, A. C. B.; FERREIRA, D. A.; ABREU, M. T. C. L.; MARTINS, P. R. J. Alterações do hemograma no diagnóstico de dengue: um estudo de 1.269 casos na cidade de Uberaba, Minas Gerais. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, p. 401-408, 2012.

OLIVEIRA-PINTO, L. M.; GANDINI, M.; FREITAS, L. P.; SIQUEIRA, M. M.; MARINHO, C. F.; SETÚBAL, S.; KUBELKA, C. F.; CRUZ, O. G.; OLIVEIRA, S. A. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1 $\beta$  and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1, p. 48-56, 2012.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Dengue – Guia de Atención para Enfermos em la Region de las Américas**. La Paz, Bolívia, 2010.

OPLÄNDER, C.; RÖMER, A.; PAUNEL-GÖRGÜLÜ, A.; FRITSCH, T.; VAN FAASSEN, E. E.; MÜRTZ, M.; BOZKURT, A.; GRIEB, G.; FUCHS, P.; PALLUA, N.; SUSCHEK, C. V. Dermal application of nitric oxide in vivo: kinetics, biological responses, and therapeutic potential in humans. **Clin Pharmacol Ther**, v. 91, n. 6, p. 1074-1082, 2012.

PALMER, R. M. J.; FERRIAGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

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, PÉREZ, A. B.; GARCÍA, G.; SIERRA, B.; ALVAREZ, M.; VÁZQUEZ, S.; CABRERA, M. V.; RODRÍGUEZ, R.; ROSARIO, D.; MARTÍNEZ, E.; DENNY, T.; GUZMÁN, M. G. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. **J Med Virol.**, v. 73, n. 2, p. 230-234, 2004.

PICCOLI, J.; MANFREDINI, V.; FAORO, D.; FARIAS, F.; BODANESE, L.; BOGO, M. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (-786T>C) and interleukin-6 in acute coronary syndrome. **Hum Exp Toxicol**, Aug. 5, 2013.

POLONI, T. R. S. **Estudo das características clínicas e laboratoriais da infecção pelo vírus da dengue em crianças atendidas em uma unidade de saúde no município de Ribeirão Preto, São Paulo**. 2013. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-24102013-084830/>>. Acesso em: 2014-04-24.

REIS, S. R.; SAMPAIO, A. L.; HENRIQUES, M.; GANDINI, M.; AZEREDO, E. L.; KUBELKA, C. F. An *in vitro* model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 983-990, 2007.

REY, L. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, n. 2, p. 479-493, 1990.

RIGAU-PEREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P.; SANDERS, E. J.; VORNDAM, A. V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 352, p. 971–977, 1998.

ROMANOVA, E. N.; GOVORIN, A. V. [TNF- $\alpha$ , IL-10, and eNOS gene polymorphisms in patients with influenza A/H1N1 complicated by pneumonia]. **Ter Arkh.**, v. 85, n. 3, p. 58-62, 2013.

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.

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

SAKUNTABHAI, A.; TURBPAIBOON, C.; CASADEMONT, I.; CHUANSUMRIT, A.; LOWHNOO, T.; KAJASTE-RUDNITSKI, A.; et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nat. Genet.**, v. 37, p. 507, 2005.

SANCHEZ, A.; LUKWIYA, M.; BAUSCH, D.; MAHANTY, S.; SANCHEZ, A. J.; WAGONER, K. D.; ROLLIN, P. E. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. **J Virol.**, v. 78, p. 10370-10377, 2004.

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.

SERUFO, J. C.; NOBRE, V.; RAYES, A.; MARCIAL, T. M.; LAMBERTUCCI, J. R. Dengue: a new approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 465-476, 2000.

SESMG. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. **Situação atual da dengue em Minas Gerais. Resumo informativo – 27/01/2012**. Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 2012a.

SESMG. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. **Deliberação CIB-SUS/MG N° 1.359**, de 17 de dezembro de 2012b.

SESMG. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. **Situação atual da dengue em Minas Gerais. Resumo informativo – 27/03/2014**. Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 2014.

SESSA, W. C. The nitric oxide synthase family of proteins. **J Vasc Res.**, v. 31, p. 131-143, 1994.

SHAKED, H.; HOFSETH, L. J.; CHUMANEVICH, A.; CHUMANEVICH, A. A.; WANG, J.; WANG, Y.; TANIGUCHI, K.; GUMA, M.; SHENOUDA, S.; CLEVERS, H.; HARRIS, C. C.; KARIN, M. Chronic epithelial NF-kappaB activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 35, p. 14007-14012, 2012.

SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.

SHURTLEFF, A. C.; BEASLEY, D. W.; CHEN, J. J.; NI, H.; SUDERMAN, M.T.; WANG, H.; XU, R.; WANG, E.; WEAVER, S. C.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K. L.; BARRETT, A. D. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. **Virology.**, v. 281, p. 75–87, 2001.

SIMMONS, C. P.; FARRAR J. J.; NGUYEN van V. C.; WILLS, B. Dengue. **N Engl J Med.**, v. 366, n. 15, p.1423-1432, 2012.

SIQUEIRA JR., J. B.; MARTELLI, C.M.T.; COELHO, G. E.; SIMPLÍCIO, A. C. R.; HATCH, D. L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48-53, 2005.

SOUSA, B. C. **Papel do óxido nítrico no transplante alogênico de células mesenquimais estromais na Doença Inflamatória Intestinal.** Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, Área de concentração Imunologia e Parasitologia Aplicadas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para obtenção do título de Mestre. Uberaba, 2012, 103 p.

SRIKIATKHACHORN, A.; ROTHMAN, A.L.; GIBBONS, R. V.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P.; ENNIS, F. A.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANAROOJ, S. Dengue – How best to classify it. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 6, p. 563-567, 2011.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Innate immunity to virus infection. **Immunol Rev.**, v. 227, p. 75–86, 2009.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C.; BARRETO, F.; BARRETO, M. L. Dengue: twenty five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, Sup. 1, p. S7-S18, 2009 (suplemento).

TEO, J. D.; MACARY, P. A.; TAN, K. S. Pleiotropic effects of *Blastocystis* spp. Subtypes 4 and 7 on ligand-specific toll-like receptor signaling and NF-κB activation in a human monocyte cell line. **PLoS One.**, v. 9, n. 2, e89036, p. 1-8, 2014.

TORRES, S.; HERNÁNDEZ, J. J.; GIRALDO, D.; ARBOLEDA, M.; ROJAS, M.; SMIT, J. M.; URCUQUI-INCHIMA, S. Differential Expression of Toll-like Receptors in Dendritic Cells of Patients with Dengue during Early and Late Acute Phases of the Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 2, e2060, p. 1-11, 2013.

TRAIRATVORAKUL, P.; CHONGSRISAWAT, V.; NGAMVASINONT, D.; ASAWARACHUN, D.; NANTASOOK, J.; POOVORAWAN, Y. Serum Nitric Oxide in Children with Dengue Infection. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 23, p. 115-119, 2005.

UBOL, S.; MASRINOUL, P.; CHAIJARUWANICH, J.; KALAYANAROOJ, S.; CHAROENSIRISUTHIKUL, T.; KASISITH, J. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 10, p. 1459-1467, 2008.

VALERO, N.; ESPINA, L. M.; ANEZ, G.; TORRES, E.; MOSQUERA, J. A. Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 66, p. 762-764, 2002.

VALLANCE, P.; MONCADA, S. Nitric oxide - from mediator to medicines. **J R Coll Physicians Lond.**, v. 28, p. 209-219, 1994.

VASANAWATHANA, S.; BHAKDI, S.; MALASIT, P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis.**, v. 193, p. 1078-1088, 2006.

VIARO, F.; NOBRE, F.; EVORA, P. R. B. Expressão das Óxido Nítrico Sintetases na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares. **Arq Bras Cardiol.**, v. 74, n. 4, p. 365-379, 2000.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; MONDINI, A.; BOSCH, I.; SCHIMITT, D.; CALZAVARA-SILVA, C. E. ZANOTTO, P. M. A.; NOGUEIRA, M. L. Dengue Virus Type 3 Adaptive Changes during Epidemics in São Jose de Rio Preto, Brazil, 2006–2007. **PLoS One**, v. 8, n. 5, e63496, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2<sup>nd</sup> edition. Geneva, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** [Internet]. New edition. Geneva: WHO: 2009. [cited 2011 Mar 1]. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Handbook for clinical management of dengue** [Internet]. Geneva: WHO: 2012. [cited 2012 July]. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)

YACOUB, S.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The pathogenesis of dengue. **Curr Opin Infect Dis.** v. 3, p. 284-9, 2013.

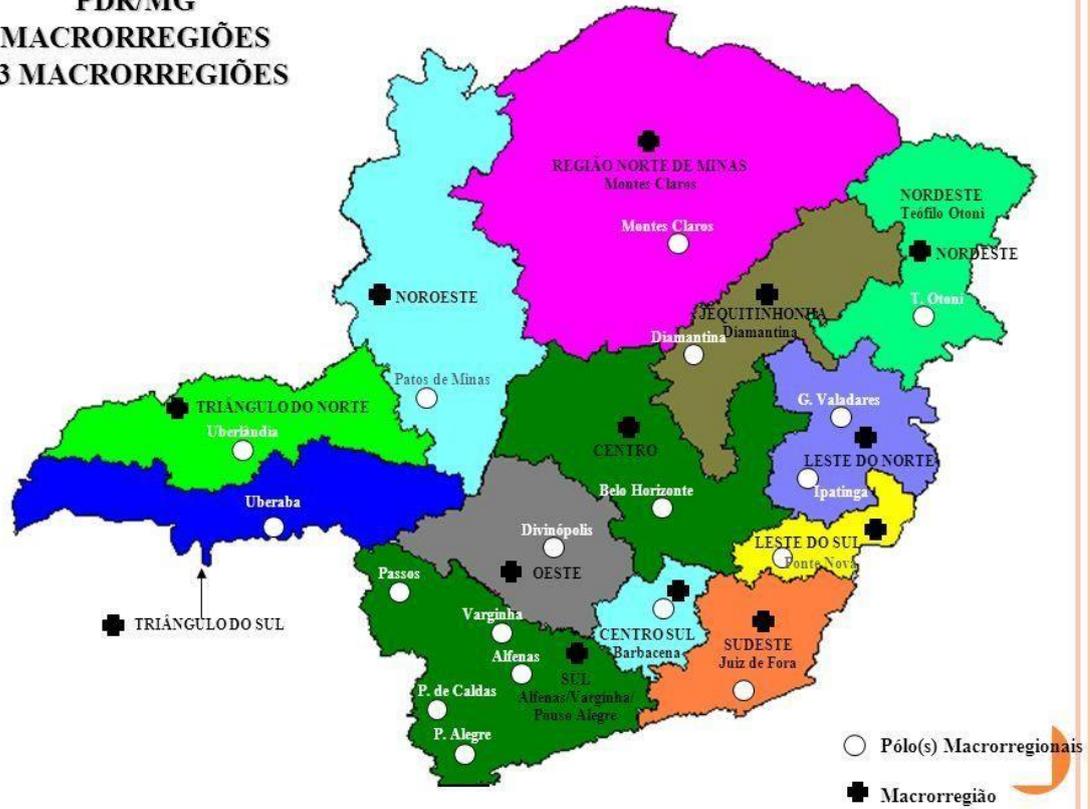
YEN, Y. T.; CHEN, H. C.; LIN, Y. D.; SHIEH, C. C.; HSIEH, B. A. W. Enhancement by Tumor Necrosis Factor Alpha of Dengue Virus-Induced Endothelial Cell Production of Reactive Nitrogen and Oxygen Species Is Key to Hemorrhage Development. **J. Virol.**, v. 82, p. 12312-24, 2008.

ZHANG, S. Y.; JOUANGUY, E.; SANCHO-SHIMIZU, V. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. **Immunol Rev.** v. 220, p. 225-36, 2007.

**ANEXOS**

### ANEXO A – MACRORREGIÕES DO ESTADO DE MINAS GERAIS

**PDR/MG  
MACRORREGIÕES  
13 MACRORREGIÕES**

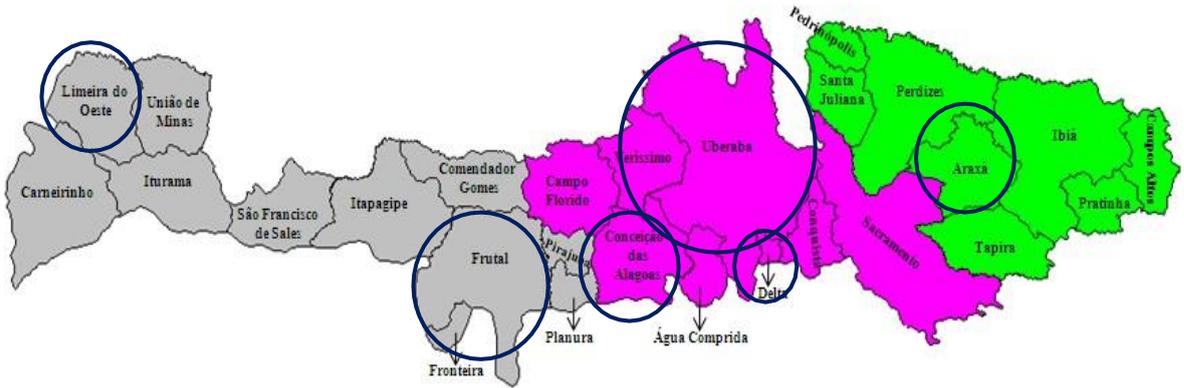


Fonte: DVA/SEVAST/SubVPS/SES-MG

## ANEXO B – MUNICÍPIOS PRIORITÁRIOS PARA O CONTROLE DA DENGUE NA MACRORREGIÃO TRIÂNGULO DO SUL

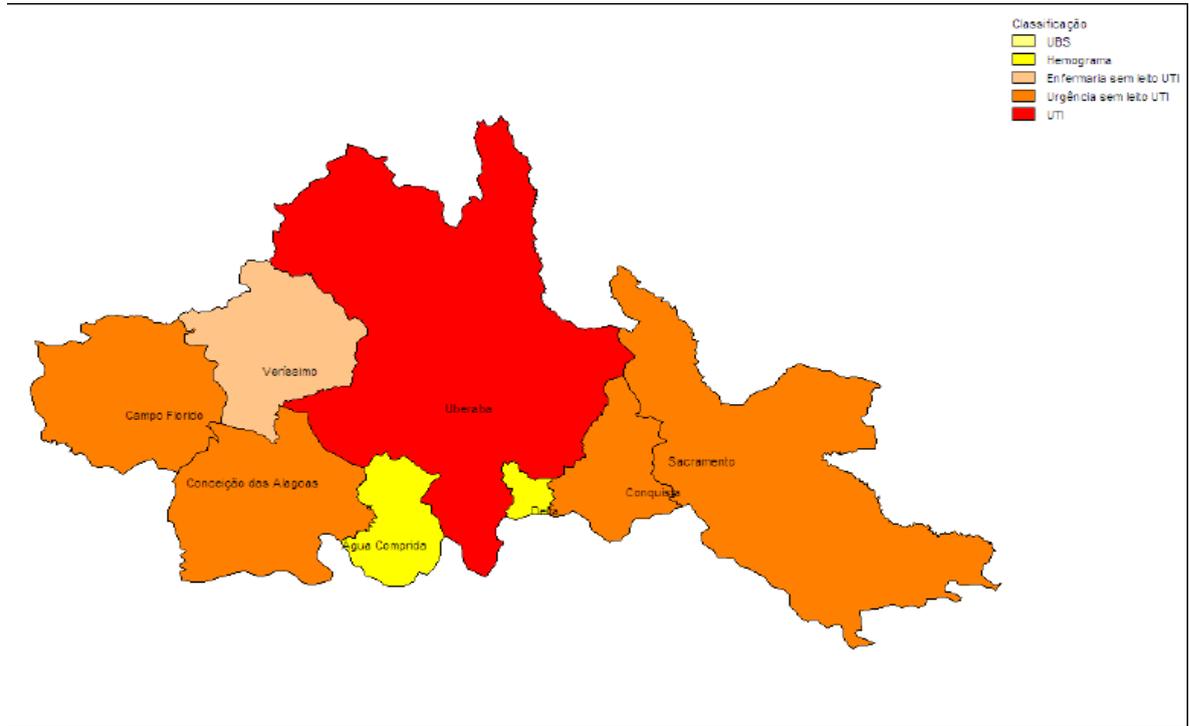
### Microrregiões

- Araxá
- Frutal/Iturama
- Uberaba



Fonte: DVA/SEVAST/SubVPS/SES-MG

### ANEXO C – REDE ASSISTENCIAL DA MICRORREGIÃO DE UBERABA



Fonte: DVA/SEVAST/SubVPS/SES-MG

## ANEXO D – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

### Ficha de coleta de dados - DENGUE - UFTM

---

Nome: \_\_\_\_\_ Número de registro: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Origem da Amostra: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_\_

NS1: \_\_\_\_\_ ELISA: \_\_\_\_\_

#### DADOS CLÍNICOS DO VOLUNTÁRIO:

Dias decorridos do início dos sintomas: \_\_\_\_\_

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Febre               | <input type="checkbox"/> Epistaxe      |
| <input type="checkbox"/> Cefaléia            | <input type="checkbox"/> Gengivorragia |
| <input type="checkbox"/> Exantema            | <input type="checkbox"/> Petéquias     |
| <input type="checkbox"/> Dor retro-orbitária | <input type="checkbox"/> Hematúria     |
| <input type="checkbox"/> Prostração          | <input type="checkbox"/> Metrorragia   |
| <input type="checkbox"/> Mialgia             | <input type="checkbox"/> Hematêmese    |
| <input type="checkbox"/> Náuseas e/vômitos   | <input type="checkbox"/> Artralgia     |

Outros: \_\_\_\_\_

---

#### CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA:

- DENGUE CLÁSSICA
- FEBRE HEMORRÁGICA DENGUE
- DENGUE COM COMPLICAÇÕES
- SÍNDROME DO CHOQUE POR DENGUE





## ANEXO G - PROTOCOLO APROVADO CEP/UFTM: 851 de 2006



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba (MG)  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP

Parecer Consultado  
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

## IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: **AValiação DA RESPOSTA IMUNE INATA AO VÍRUS DA DENGUE: EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL, CITOCINAS, E QUIMIOCINAS.**  
PESQUISADORA(ES) RESPONSÁVEL(ES): Ana Paula Pereira Reis  
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM  
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 20/12/2006  
PROTOCOLO CEP/UFTM: 851

- 13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE ORTÉ-LO**  
Pesquisador ou membro qualificado da equipe obterá o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis em formato correspondente aos padrões da resolução 196
- 14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO** – O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.
- 15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES**  
Projeto importante do ponto de vista científico em especial para a nossa região

PARECER DO CEP

*Aprovado*

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO

22/12/2006

João Batista Ribeiro  
Relator

João Batista Ribeiro  
Coordenador

## ANEXO H – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG

Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador Responsável: Dra. Ana Paula Sarreta Terra / Contato: (34) 3318-5542

Pesquisadores colaboradores: Denise Maciel Carvalho / Contato: (34) 9972-8863

Dr. David Nascimento Silva Teixeira / Contato: (34) 3318-5814

- **Esclarecimento:**

Fui informado sobre este estudo e, de que será necessária a coleta do meu sangue, o qual será levado para laboratório para ser analisado. Este estudo tem como objetivo analisar os mecanismos de resposta e resistência do meu organismo ao vírus da DENGUE. Estou ciente do risco e do incômodo que eventualmente quaisquer procedimentos possam trazer, ou seja, pequena dor e hematoma no braço durante a punção de coleta de sangue. Fui também esclarecido dos benefícios que os resultados poderão trazer para a comunidade. Fica a mim garantido que os resultados destes testes de laboratoriais não serão divulgados de maneira a comprometer-me individualmente e de que o meu sangue será utilizado apenas para fins de análise. Sei que poderei abandonar este estudo sem prejuízo a qualquer atendimento posterior no Hospital Escola da UFTM.

- **Caso concorde em assinar este consentimento você terá:**

1. A garantia de receber respostas a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de receber meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo;
3. A segurança de que não serei identificado e que mantido será o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;

- **Consentimento:**

Eu, \_\_\_\_\_  
residente em \_\_\_\_\_  
telefone para contato nº \_\_\_\_\_, compreendi as informações sobre a pesquisa: “Avaliação da resposta imune inata ao vírus da dengue: expressão de receptores Toll, citocinas e quimiocinas” e autorizo a coleta de meu sangue e a minha participação neste estudo. Estou de acordo e autorizo perante testemunha. Tenho ciência do exposto acima e concordo em participar do estudo.

Uberaba \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do entrevistado

Autorização: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_