



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS
PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM
DENGUE NA PARAÍBA**

CAMILA MARQUES QUEIROZ

RECIFE/PE

2015

CAMILA MARQUES QUEIROZ



**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS
PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM
DENGUE NA PARAÍBA**

Dissertação apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Profº Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Coorientador: Profº Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

RECIFE/PE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca: Mônica Uchôa - CRB4-1010

Q3a Queiroz, Camila Marques.
Avaliação dos níveis séricos de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias
em pacientes diagnosticados com dengue na Paraíba / Camila Marques
Queiroz. – Recife: O autor, 2015.
99 f.: il., 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Inclui referências e apêndices.

1. Dengue. 2. Óxido nítrico. 3. Citokine. 4. Sorotipo viral. I. Santos,
Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-054)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

CAMILA MARQUES QUEIROZ

No dia 24 de fevereiro de 2015, às 14h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP - no Bl. A, Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE -, os Membros Doutores: a **Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel** (Presidente da Banca – Membro Interno), o **Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan** (UFPB – Membro Externo) e o **Prof. Dr. Roberto Afonso da Silva** (LIKA/UFPE – Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda **Camila Marques Queiroz** sobre a sua Dissertação intitulada **“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM DENGUE”**, a qual foi orientada pelo **Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos** (CPqAM/FIOCRUZ) e co-orientada pelo **Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano** (UFPB). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Prof. Dr. Roberto Afonso da Silva

APROVADA
APROVADO
APROVADO

Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Prof. Dr. Roberto Afonso da Silva



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vlăudia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

DEDICATÓRIA

Dedico com carinho ao meu avô, João Marques (in memoriam)!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que toda honra e glória seja dada a Ti, Senhor. Obrigada pelas oportunidades concedidas, pela capacitação que me destes e que tantas vezes achei não ser capaz. Obrigada por ter ouvido minhas preces e tornado realidade mais um sonho. Aqui estou, perseverarei em meio a vários obstáculos. Senhor, muito obrigada por tudo! És a minha Fortaleza.

À minha mãe, minha Mainha, a pessoa mais importante da minha vida, embargam as palavras ao falar de ti e agradecê-la. Obrigada por esse amor incondicional, por ser minha eterna incentivadora, pelo seu esforço para que aqui eu estivesse e permanecesse, por suas orações incessantes, por ser minha luz e o estímulo que me impulsiona a buscar dias melhores. És a presença humana de Deus em minha vida.

Ao meu pai, que com seu exemplo de vida mostrou que o estudo é o crescimento de cada um de nós. Que tudo podemos perder, mas o conhecimento é a única dádiva que nunca nos será tirado. Rogo à Deus que sempre me ajude a alegrar teu coração. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus avós, João Marques (*in memoriam*) e Otelina Marques, minhas pérolas raras, minha base. Obrigada por tanto amor, pela compreensão da minha ausência e pelo incentivo mesmo que de longe. Fui agraciada por ter compartilhado toda minha vida com vocês. São mais que avós, são padrinhos, amigos, pai e mãe para mim. Estarão sempre em meu coração. Meu amor e gratidão eterna!

A Iranilson, muito obrigada pela força, amparo, ajuda e carinho que me dedicastes. Obrigada por estar ao meu lado!

Ao meu orientador, Dr. Fábio André dos Santos Brayner, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, pela acolhida, atenção, confiança, dedicação, amizade e constante incentivo durante todo o trabalho.

Ao meu querido Dr. Luiz Alves, pessoa amável, que sempre está disponível a ajudar no que for preciso. Obrigada pela sua colaboração como amigo, pela motivação, puxões de orelha, contribuição e sugestões no transcorrer do trabalho.

Ao meu coorientador, Lucio Roberto, por viabilizar o trabalho e disponibilizar o material biológico para a pesquisa.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Celular pela acolhida, apoio, conversas, risadas e colaboração. Vocês tornaram meus dias mais suaves!

A minha amiga Silva Ramos, muito obrigada por todas as vezes que me presenteasse com o teu ouvir, aconselhar e se fazer presente nessa minha caminhada. És a irmã que a vida me presenteou com denominação de amiga.

A CAPES pela bolsa de estudo.

E aos demais amigos que fazem parte da minha vida, por estarem comemorando comigo mais esta realização. Os meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O aumento da incidência de casos de dengue constitui um importante problema de saúde pública mundial. A patogênese da Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) ainda não está completamente esclarecida. A invasão do vírus às células do sistema imunológico modifica o estado normal celular, induzindo a produção e a liberação de inúmeros mediadores imunológicos como espécies reativas de oxigênio, incluindo o óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (IFN- α e IFN- β , TNF- α e IL-6). A indefinição acerca do papel desses mediadores imunológico durante a infecção humana pelo dengue vírus (DENV) e possível papel na disfunção endotelial justifica a realização do presente trabalho buscando esclarecer a dinâmica da relação vírus-hospedeiro frente ao agravamento da infecção. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de marcador biológico da dosagem dos níveis séricos de NO e mediadores imunoinflamatórios em pacientes diagnosticados com dengue em sua forma grave. Foram analisadas 307 amostras de soros coletadas entre 2009 a 2011. A dosagem de NO foi realizada por reação de Griess e a dosagem das citocinas pelo método ELISA, seguindo as instruções sugeridas por cada kit, buscando correlacionar os valores séricos encontrados com a gravidade das formas clínicas da doença. Como resultado, não houve diferença nos níveis séricos de NO entre pacientes com Dengue Clássica (DC) ou FHD, infecção primária ou secundária ou mesmo entre os diferentes sorotipos virais. Analisando os resultados em tempos específicos de sintomatologia, observou-se que até os 02 dias iniciais, maiores níveis de NO foram detectados em pacientes com infecção primária em relação à infecção secundária, e principalmente nos pacientes com DC em relação aos pacientes com FHD. Na dosagem do TNF- α não houve diferença entre os grupos de pacientes estudados. Observou-se diferença entre dengue primária e dengue secundária, sendo maior a produção de IFN- α nos pacientes com dengue primária. A dosagem do IFN- β foi realizada, porém não foram detectados níveis séricos mínimos dessa citocina. Observamos a circulação de três sorotipos diferentes na mesma população de estudo, porém sem associação com os níveis de citocinas circulantes. Os dados sugerem que a quantificação sérica do NO e citocinas pró-inflamatórias na população estudada não auxilia como determinação de marcador biológico de dengue para formas graves da doença.

Palavras-chave: Dengue. Óxido Nítrico. Cytokine. Sorotipo Viral.

ABSTRACT

The increased incidence of dengue cases is an important problem of global public health. The pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) is not yet fully elucidated. The invasion of the virus into immune system cells modifies the cell normality, triggering the production and release of several immune mediators. With emphasis in oxygen reactive species, for example, nitric oxide (NO) and proinflammatory cytokines (IFN- α , IFN- β , TNF- α and IL-6). The uncertainty about the role of these immune mediators during the human infection by DENV justifies the need for new research, seeking to clarify the virus-host dynamics relationship in to the aggravation of infection. The aim of this study was to evaluate the prognostic potential of NO serum levels and others proinflammatory cytokines in patients diagnosed with dengue. We analyzed 307 serum samples collected between 2009 to 2011. The NO level was evaluated with the Griess reagent and the dosage of proinflammatory cytokines by ELISA technique following the instructions suggested by each kit seeking to correlate the serum levels with the severity of the clinical forms of the disease. As a result, there was no difference in serum levels of NO in patients with Classical Dengue (DC) or DHF, primary or secondary infection or even between different serotypes. Analyzing the results at specific times of symptomatology, it was observed that up to 02 days initial, high levels of NO were detected in patients with primary infection, compared to secondary infection, especially in patients with DC compared to patients with DHF. There was no difference in TNF- α levels among the groups of patients. It were observed significant differences between primary dengue and secondary dengue, with a higher IFN- α production in patients with primary dengue. The IFN- β dosage was performed, but there were no detected minimum serum levels of this cytokine. We observed the presence of three different serotypes in the same population studied, but no association with cytokine levels. The detection of elevated levels of NO in patients with DC, in the initial days of symptomatology, reinforces the potential role of this molecule in the control of the viral infection, however, was not found difference in later times of symptomatology. The data suggest that the serum quantification of NO and inflammatory cytokines in this population does not help to determine biological marker for severe forms of dengue disease.

Keywords: Dengue. Nitric oxide. Cytokine. Viral serotype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura genômica do vírus dengue.....	20
Figura 2: Transmissão e ciclo evolutivo do dengue.....	21
Figura 3: Desenho esquemático da infecção pelo DENV.....	27
Figura 4: Principais vias metabólicas do aminoácido L-arginina.....	30
Figura 5: Síntese do óxido nítrico (NO) catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS).....	31
Figura 6: Fluxograma de seleção dos pacientes do estudo.....	40
Figura 7: Análise geral dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre os pacientes diagnosticados com dengue.....	47
Figura 8: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre o 1º ao 2º dia de sintomatologia nos pacientes diagnosticados com dengue.....	48
Figura 9: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre o 3º ao 5º dia de sintomatologia nos pacientes diagnosticados com dengue.....	48
Figura 10: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre o 5º ao 7º dia de sintomatologia nos pacientes diagnosticados com dengue.....	49
Figura 11: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre o 7º ao 28º dia de sintomatologia nos pacientes diagnosticados com dengue.....	50
Figura 12: Análise dos níveis séricos de IFN- α entre o 1º ao 2º dia de sintomatologia em pacientes diagnosticados com dengue.....	51
Figura 13: Análise dos níveis séricos de TNF- α entre o 1º ao 2º dia de sintomatologia em pacientes diagnosticados com dengue.....	52
Figura 14: Análise dos níveis séricos de IL-6 entre o 1º ao 2º dia de sintomatologia em pacientes diagnosticados com dengue.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Descrição
ADE	Anticorpos Potencializadores de Infecção
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CD4 ⁺	Grupamento de diferenciação 4 ou cluster of differentiation
CD8 ⁺	Grupamento de diferenciação 8 ou cluster of differentiation
d.C	Depois de Cristo
DC	Dengue Clássica
DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Vírus Dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus Dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus Dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus Dengue sorotipo 4
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ELISA	Reação Imunoenzimática
eNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fc (FcR)	Receptor de membrana para porção constante de anticorpos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
GCs	Enzima Heterodimérica Guanilil Ciclase Solúvel
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INFs	Interferons
INF- $\alpha/\beta/\gamma$	Interferon-alfa/beta/gama
iNOS/NOS3	Enzima Óxido Nítrico Sintase induzível/indutiva
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico

mmHg	Milímetros de Mercúrio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaNO ₃	Nitrato de Sódio
NED	Cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina
NEG	Sorotipo indefinido no estudo
NK	Natural Killer
nNOS/NOS1	Enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂ ⁻	Superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
OONO ⁻	Peroxinitrito
PB	Paraíba
PCR	Reação em cadeia polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Tempo Real - Reação transcrição reversa em cadeia polimerase
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
SES	Secretaria do Estado
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TNF- α	Fator de necrose Tumoral-alfa
TT	Prova do laço
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DO DENGUE.....	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO	20
2.3.1 Agente transmissor	21
2.3.2 Classificação.....	22
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	23
2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	24
2.6 IMUNOPATOGENIA	25
2.7 ÓXIDO NÍTRICO	29
2.7.1 Química do óxido nítrico.....	29
3. OBJETIVO	38
3.1 GERAL.....	38
3.2 ESPECÍFICOS	38
4. METODOLOGIA.....	39
4.1 DESENHO DO ESTUDO	39
4.2 LOCAL DO ESTUDO	39
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	39
4.4 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	40
4.5 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	40
4.6 COLETAS DE DADOS SECUNDÁRIOS	41
4.7 MÉTODO DE COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	42
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5. RESULTADOS	46
5.1 NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	46
5.2 NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	50
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	73

1. INTRODUÇÃO

Dengue é a principal arbovirose que vem acometendo o homem na atualidade, constituindo um sério problema de saúde pública a nível mundial, devido a sua rápida disseminação e alta capacidade de causar morbidade e mortalidade. É uma doença reemergente com mais de 2,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão (CARVALHO, 2014). A infecção é causada por um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) identificados (BECQUART et al., 2010; TEOH et al., 2015), resultando em um amplo espectro clínico, dependente da resposta imunológica do hospedeiro, que é comumente documentado por infecção assintomática ou febre indiferenciada, denominada Dengue Clássica (DC), e mais raramente pelas formas graves bem definidas como a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD) (HALSTED, 2007; MANGOLD; REYNOLDS, 2013). Os vírus pertencem à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, sendo prevalentes em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (TSAI et al., 2013). A transmissão desta arbovirose se dá pelo mosquito do gênero *Aedes* em áreas urbanas e semiurbanas, onde o meio ambiente favorece o desenvolvimento e proliferação deste vetor. (WHO, 2014).

No Brasil, o número de casos de dengue registrados em 2014 foi de 587, 8 mil (BRASIL, 2015). Segundo a Secretaria do Estado (SES) da Paraíba, no ano de 2014, foram confirmados 3.442 casos (BRASIL, 2015). O Estado apresenta taxa de incidência para dengue estimada em 13,7 por grupo de 100 mil habitantes, segundo dados do Ministério da Saúde (2013).

A imunopatologia da dengue e os fatores que estimulam a progressão para a doença clínica grave são indefinidos. Quase 50% das infecções são reconhecidas como infecções clinicamente silenciosas e cerca de 5-30% dos casos a doença pode ser grave com sinais e sintomas como sangramento nasal, gengivorragia, sepses, extremidades frias, pulso fino e rápido comumente referidos na FHD/SCD (MARTÍN et al., 2010; HOTTZ, 2011).

O óxido nítrico (NO) é um importante sinalizador utilizado por diferentes tipos celulares e produzido por uma variedade de células do corpo e, ainda hoje, é considerado uma das mais importantes descobertas da medicina sobretudo pelo seu fator relaxante derivado do endotélio. Apesar de os estudos iniciais se concentrarem no papel do NO na regulação do tônus vascular, logo foi percebido que essa molécula tinha uma

vasta importância nas ações patológicas e fisiológicas no ser humano (MALAGRIS, 2012). Sua produção é estimulada por diversas células como macrófagos derivados de monócitos, macrófagos alveolares e monócitos de sangue periférico, neutrófilos, linfócitos, hepatócitos, fibroblastos, células da medula óssea e osteoblastos quando expostas a estímulo antigênico e inflamatório, antiviral, endotoxina e citocinas como a interleucina (IL)-6, interferons (INFs) e fator de necrose tumoral (TNF). As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção, no entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos (SOMMER, et al., 2010). Na literatura ainda não há registros, em um mesmo estudo, que abordem parâmetros virais, clínicos e dias de sintomatologia como contemplado no presente trabalho frente a esses mediadores imunológicos.

Devido à importante função biológica desempenhada pelo NO na neurotransmissão, antiinflamatório, dilatador vascular e na possível participação na patogênese de DC e FHD, e a ação de citocinas pró-inflamatórias nessa patologia, é relevante a mensuração de seus níveis séricos no tecido sanguíneo, a fim de elucidar o envolvimento desses mediadores imunológicos na disfunção endotelial. Portanto, considerá-los como possível marcador biológico é de suma importância a fim de que sejam providos os devidos cuidados clínicos e terapêuticos ao paciente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DO DENGUE

Os primeiros relatos de acometimento de dengue datam de 265-420 d.C. descritos em uma enciclopédia chinesa durante a dinastia Chin. Em 1635 foram relatados surtos no Panamá e nas Antilhas Francesas de uma doença compatível com dengue, porém há divergência quanto à etiologia da mesma sendo os casos da Filadélfia e da ilha de Java, em 1778 e 1779, considerados os mais satisfatoriamente documentados antes do isolamento viral (GLUBER, 1997; BARBOZA, 2013).

A partir do século XVIII e XIX nas Américas, devido à movimentação dos navios negreiros e descobertas territoriais, houve a introdução e disseminação da doença, inclusive no Brasil. Paraná e Rio de Janeiro foram pioneiros a registrar uma doença febril que circulava juntamente com a febre amarela e que acometeu grande parte da população, posteriormente reconhecida como dengue e considerada os primeiros casos no país (QUINTANILHA, 2010).

De 1902 a 1907 os agentes etiológicos da febre amarela e do dengue foram os primeiros micro-organismos a serem denominado vírus. Nesse mesmo período, Oswaldo Cruz e Hemilio Ribas implantaram medidas sanitárias para combater o vetor da febre amarela *Aedes aegypti* responsável por grande número de óbitos no Brasil, consequentemente a incidência de casos e mortalidade pelo dengue também foi reduzido (BRAGA; VALLE, 2007).

Pesquisadores australianos, japoneses e americanos, durante a Segunda Guerra Mundial, iniciaram estudos para melhor compreender o dengue. Dessa forma, em 1943, Kimura e Hotta isolaram pela primeira vez o vírus causador da doença (BARRETO; TEXEIRA, 2008). Em 1952, Sabin identificou dois sorotipos distintos do vírus dengue (DENV-1 e DENV-2) (GLUBER, 1997). Na epidemia de 1953 nas Filipinas, foram detectados e classificados o sorotipo DENV-3 e DENV-4 como causadores de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (GLUBER, 1998). O desequilíbrio ecológico, resultado da segunda guerra mundial, propiciou a transmissão de arboviroses culminando dessa forma em aumento e transmissão destas doenças (GLUBER, 1998).

Na década de 80, a epidemia da Febre Hemorrágica da Dengue e Síndrome de Choque da Dengue (FHD/SCD) mais relevante ocorreu em Cuba, onde foram notificados 344.203 casos com 163.143 hospitalizações (OPAS, 1995).

No Brasil, os primeiros casos epidêmicos de dengue, com evidências laboratoriais e clínicas, ocorreram na cidade de Boa Vista no Estado de Roraima, em 1981-1982, causada pelo DENV-1 e em 2010 DENV-4 foi isolado também no Estado de Roraima. Em 1986 houve epidemia no Rio de Janeiro, Minas Gerais e alguns estados do Nordeste (Alagoas, Ceará, Bahia e Pernambuco) e, desde então, o dengue se disseminou pelo país e proporcionou a entrada dos sorotipos DENV-2 em 1990 e DENV-3 em 2001, o que contribuiu para a maior incidência da doença devido à relevante variabilidade de tipos sorológicos existentes (TEMPORÃO et al., 2011).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009; 2014) citam 50-100 milhões de casos de dengue anualmente, entretanto Bhatt et al. (2013) estimam que a incidência de dengue no mundo alcance o triplo da estimada, totalizando 390 milhões de pessoas infectadas anualmente. Esse mesmo levantamento aponta que a Ásia corresponde a 70% dos casos de dengue no mundo, sendo que a Índia sozinha engloba 34% das infecções. As Américas, principalmente o Brasil e México, somam 14% dos casos.

A incidência da infecção no Brasil tem aumentado desde 1986 devido às sucessivas epidemias (BARRETO et al., 2011). No século XXI, o país foi considerado o território com maior número de casos notificados de dengue (TEIXEIRA et al., 2009). A epidemiologia brasileira em meados de 2008 apontou maior incidência em indivíduos menores de 15 anos mesmo o país sendo característico de casos na população adulta. Essa mudança na faixa etária é demonstrada pela hospitalização de pacientes com FHD em todo o território nacional (TEIXEIRA et al., 2009). Segundo dados da Secretaria de Vigilância Sanitária, houve um aumento de 205% de casos no período de Janeiro - Abril de 2013 comparados ao mesmo período de 2012. O Nordeste apresentou incidência de 149,9 casos/100 mil habitantes e a Paraíba 130,2 casos/100 mil habitantes em 2014 (BRASIL, 2014a).

Apenas com duas estações climáticas no ano, verão e inverno, a região Nordeste se distingue do ponto de vista climático das demais regiões brasileiras (NOBRE et al., 2004). O Estado da Paraíba é endêmico no padrão epidemiológico para o dengue, ocorrendo no verão nas regiões áridas, e no inverno nas áreas mais úmidas (SOUZA et

al., 2007; BARACHO et al., 2014). No ano de 2014, de janeiro a dezembro, foram confirmados 3.442 casos de dengue na população paraibana (BRASIL, 2015).

A dispersão do vetor, *Aedes aegypti*, é beneficiada mediante condições socioambientais e climáticas. Além disso, as condutas empregadas no combate às doenças transmitidas por vetores mostraram-se incapazes de conter o vetor uma vez que não existe integração intersetorial e metas centradas na ação química (DIAS, 2006; CHIARAVALLLOTI et al., 2007).

O desenvolvimento de campanhas de informação e de mobilização de pessoas atreladas à vigilância epidemiológica e entomológica para ampliar a capacidade de predição e detecção precoce de surtos da doença são algumas das estratégias adotadas pelo Ministério da Saúde. Por ser uma patologia de transmissão vetorial e infecciosa, e até o momento inexistente vacina e drogas antivirais (HALSTEAD, 2012), o fator prevenção situa-se no âmbito de intervir de forma a dificultar ou impossibilitar a disseminação do mosquito. As ações são centradas no combate químico das formas larvárias ou adultas do vetor, e através do manejo ambiental delimitado apenas à destruição de possíveis criadouros domiciliar e peridomiciliar (WHO, 2014).

O aumento do número de casos de dengue preocupa as autoridades de saúde devido à dificuldade em controlar a epidemia e a necessidade de expandir os serviços de saúde para tratar os doentes (TEIXEIRA et al., 2009). Todos os casos de dengue devem ser registrados, devido ao caráter compulsório da doença, no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) que corresponde à principal fonte de dados da rede de saúde (pública e privada) do país (BRASIL, 2014b; 2015).

O Brasil adota, desde 2002, o protocolo de condutas que valoriza a abordagem clínico-evolutiva, baseado no reconhecimento de elementos clínico-laboratoriais e de condições associadas, que podem ser indicativos de gravidade, com sistematização da assistência, que independe da discussão de classificação final de caso, com o objetivo de orientar a conduta terapêutica adequada a cada situação e evitar o óbito (WHO, 2009; BRASIL, 2014b).

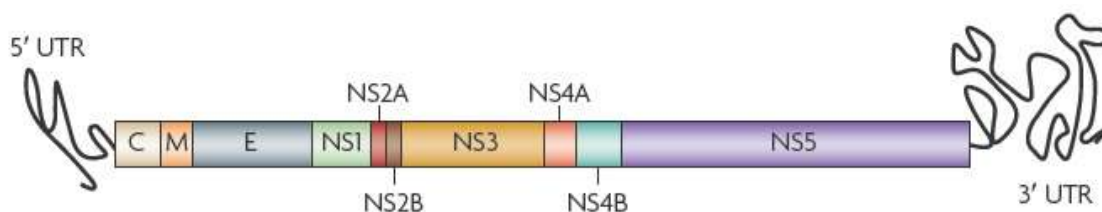
As informações clínicas e laboratoriais disponíveis no início do acompanhamento médico não permitem o reconhecimento precoce de formas graves para as quais é crucial a definição de tratamento imediato, mas contribui para a classificação epidemiológica feita após o diagnóstico dos casos de dengue com a finalidade de permitir a comparação da situação epidemiológica de dengue, entretanto não sendo útil para a conduta clínica.

Diante da capacidade de adaptação do dengue frente às situações urbanas, sociais, características clínicas e epidemiológicas (DONALÍSIO; GLASSER, 2002) despertam o interesse científico em melhor conhecer as diferentes formas de expressão do quadro clínico (individual e coletivo) dessa patologia para aprimoramento da terapia medicamentosa e controle do vetor.

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O vírus dengue apresenta-se como uma partícula esférica medindo 40-50nm de diâmetro, com um envelope lipídico e RNA de fita simples, com polaridade positiva e um genoma que codifica três proteínas estruturais, o capsídeo (C), a membrana (M) e o envelope (E), e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (figura 1) (GUZMAN et al., 2010).

Figura 1: Estrutura genômica do vírus dengue.



Fonte: Adaptado de Guzman et al., 2010.

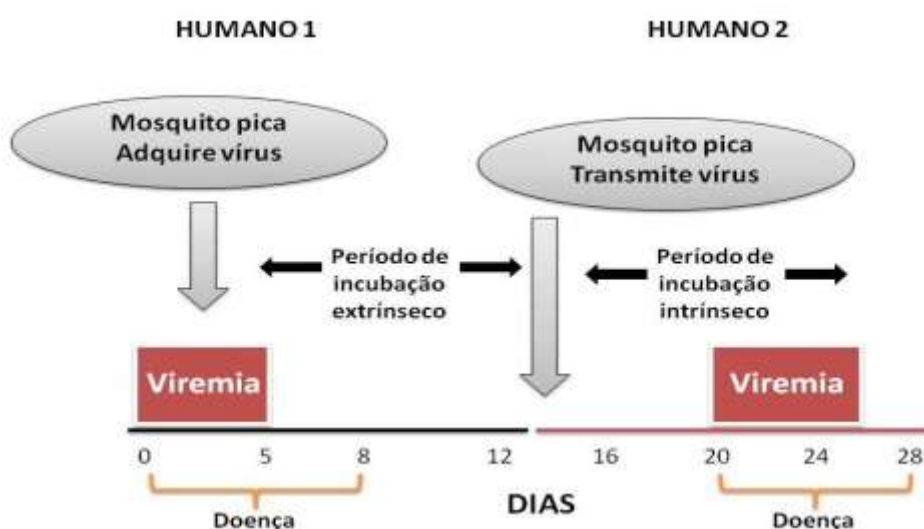
Os quatro sorotipos identificados (DENV-1, DENV-2 , DENV-3, e DENV-4 (BECQUART et al., 2010; BHATT et al., 2013) são geneticamente relacionados, porém antígenicamente distintos, causando manifestações clínicas similares dependentes de fatores virológicos, resposta imune e elementos genéticos do hospedeiro (ROTHMAN, 2004; 2011). Pesquisadores propuseram a descoberta do DENV-5, entretanto, os cientistas ainda estão céticos sobre essa nova descoberta, e indicam que mais dados são necessários para determinar se este vírus "novo" é realmente um sorotipo diferente ou se trata de uma variante de um dos quatro sorotipos DENV já conhecidos (VOORHAM, 2014).

2.3.1 Agente transmissor

O vírus dengue é transmitido por artrópodes, principalmente o mosquito *Aedes aegypti*, membro da família Flaviviridae e do gênero *Flavivirus* (SIMONS et al., 2012). O mosquito vetor, de origem África subsahariana, desenvolveu características adaptativas para o ambiente doméstico estabelecido pelo humano e, dessa maneira, tornando-se antropofílico, abundantes nas cidades e de fácil dispersão para outras áreas. Os três elementos da cadeia biológica e epidemiológica interagem sinergicamente no espaço social estabelecido. Dessa forma, a maioria dos casos de dengue está relacionada com a forma de organização do espaço geográfico atrelado aos fatores sócio cultural e a desigualdade social que é reflexo no ambiente em criar condições para a proliferação do vetor (BARACHO et al., 2014). A fêmea do *Aedes aegypti* é o vetor responsável na transmissibilidade do dengue. Seu marco geográfico é amplamente distribuído em áreas tropicais e subtropicais do mundo, é uma espécie antropofílica, com hábitos urbanos utilizando reservatórios de água parada para a postura de seus ovos (GLUBER, 1998; WHO 2009).

No mosquito ocorre o período de incubação extrínseca no qual os vírus replicam-se no intestino e são liberados na hemocèle para infectar outros tecidos incluindo as glândulas salivares, e ao buscar alimento no sangue de outro indivíduo suscetível, o vírus pode ser transmitido através de novo repasto sanguíneo (figura 2) (FREITAS, 2006).

Figura 2: Transmissão e ciclo evolutivo do dengue.



Fonte: Modificado de Center of Disease Control, 2012.

No local da picada do artrópode ou nos linfonodos regionais, ocorre a replicação inicial do vírus no endotélio vascular, posteriormente alcançando outros tecidos. Após o homem ser infectado, o vírus passa por um período de incubação intrínseca com durabilidade de 4-10 dias quando podem surgir os primeiros sintomas inespecíficos e febre. Na fase virêmica, os vírus circulam no sangue periférico podendo ser transmitido a outro mosquito vetor diante de um novo repasto sanguíneo (GLUBER, 1998; QUINTANILHA, 2010).

2.3.2 Classificação

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997) a infecção dengue sintomática é classificada em Dengue Clássica (DC), que corresponde ao quadro febril ou virêmico por volta do quinto dia. Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD) correspondendo à evolução clínica para a fase de extravasamento de plasma.

Em 2014, o Brasil adotou a nova classificação de casos de Dengue da Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo atualmente classificada como:

- ✓ **Dengue** - indivíduo que viva ou tenha viajado nos últimos dias para áreas com focos epidêmicos, que apresente febre (entre 2-7 dias) e uma ou mais das seguintes manifestações: náuseas; exantemas; mialgias e/ou artralgia; cefaléia e/ou dor retro-orbital; petéquias ou prova do laço positiva; leucopenia.
- ✓ **Dengue com sinais de alarme** - no período de defervescência da febre apresentar um ou mais das seguintes manifestações: dor abdominal intensa e contínua, ou dor na palpação do abdômen; vômitos persistentes; acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdio); sangramento de mucosas; letargia ou irritabilidade; hipotensão postural (lipotímia); hepatomegalia maior que 2 cm; aumento progressivo de hematócrito.
- ✓ **Dengue grave** – todo caso de dengue que apresenta um ou mais dos seguintes resultados:
 - Choque: devido ao extravasamento de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior a três segundos, pulso débil ou indetectável, pressão diferencial

convergente $\leq 20\text{mmHg}$, hipotensão arterial em fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória.

- Sangramento grave: conforme a avaliação médica pode ser encontrado sinais de hematêmese, melena, metrorragia volumosa, sangramento do sistema nervoso central.
- Comprometimento grave dos órgãos: fígado (AST e ALT > 1000), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) entre outros órgãos (BRASIL, 2014).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O homem é o único hospedeiro capaz de desenvolver formas clínicas (QUINTANILHA, 2010). O espectro das manifestações clínicas do dengue varia de uma forma assintomática a sintomática (DC e a forma grave FHD que pode causar a SCD) (WHO, 1997; ENDY et al., 2011; SIMMONS et al., 2012). A identificação precoce dos casos é de suma importância para a tomada de decisão e implementação de medidas no momento oportuno, visando à prevenção da morbidade e até mesmo óbito.

A DC manifesta-se com febre súbita e elevada ($39^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$), mialgias intensas, cefaléias frontais e retro-orbitária. A sintomatologia tem duração de 5-7 dias, seguindo um período de defervescência, o qual pode acompanhar-se por sensação de ardor e descamação palmo-platar (CLYDE et al., 2006; BECQUART et al., 2010). Nessa fase, pode surgir prostração, petéquias, hemorragias, epistaxes e posteriormente, a fase de convalescência será marcada por astenia (SRIKIATKHACCHORN, 2009; FAHEEM et al., 2010).

A FHD tem início agudo, a evolução do quadro após a defervescência é mais grave, caracterizada pela presença de alguns sintomas como hemorragia, sepses, trombocitopenia, evidência clínica de vazamento de plasma resultante do aumento da permeabilidade vascular, dor abdominal intensa, vômitos persistentes, hipotensão postural, hipotensão arterial (pressão diferencial $< 20\text{ mmHg}$), hepatomegalia dolorosa, extremidades frias, cianose, pulso rápido e fino, diminuição da diurese, diminuição repentina da temperatura corpórea, aumento repentino do hematócrito (GUZMAN; KOURI, 2002; YEN et al., 2008). Essa forma pode evoluir para SCD com mortalidade significativa (GUZMAN et al., 2010).

A gravidade da FHD conforme os critérios adotados pela WHO (1997) é classificada em quatro grupos. Somando as características da DC o Grau I (FHD I) apresenta febre e hemorragia induzida (prova do laço); Grau II (FHD II): sangramentos espontâneos; Grau III (FHD III): insuficiência circulatória/hipotensão; Grau IV (FHD IV/SCD): profundo choque com pulso imperceptível (WHO, 1997; 2009).

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Diante de um caso suspeito de dengue, deve ser solicitada a sorologia após o sexto dia da sintomatologia. A confirmação laboratorial da infecção é de suma importância uma vez que muitos dos sintomas são inespecíficos e comuns a outras viroses. Várias metodologias podem ser utilizadas para o diagnóstico, como o isolamento do vírus em cultura de células, a detecção molecular do RNA viral pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR), a detecção da proteína NS1 (antígeno viral) no sangue e em tecidos (óbitos), além da detecção de anticorpos específicos no soro (GUZMAN et al., 2010).

O isolamento do vírus (Teste de Riman) é o padrão ouro para confirmação da infecção pelo DENV. Pode ser realizado pela inoculação da amostra de sangue e/ou soro em culturas de células, principalmente as originadas de mosquito. O diagnóstico molecular realizado pela PCR tem papel fundamental por ser capaz de identificar de forma rápida a presença do vírus durante a fase aguda da doença (YAP et al., 2011). No entanto, ambas metodologias não são utilizadas como procedimento de rotina de diagnóstico em virtude da necessidade de laboratório e equipe especializada, custos elevados e, no caso do isolamento viral, requer números de dias consideráveis para se obter o resultado (DATTA; WATTAL, 2010).

A metodologia de detecção do antígeno NS1 encontrado no soro ou plasma durante a fase aguda da infecção tem viabilizado um novo caminho para o diagnóstico precoce e rápido ainda na fase aguda da doença, podendo ser realizado pelos laboratórios públicos e privado, mas tendo como maior impecílio seu alto custo em relação à testes para detecção de anticorpos (TRICOU et al., 2010).

O diagnóstico sorológico mais utilizado é o Ensaio Imunoenzimático - ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para a captura de IgM (MAC-Elisa) devido ao seu alto grau de especificidade e sensibilidade, 98% e 90% respectivamente, em

amostras coletadas após o quinto dia de febre (MODIS et al., 2003). É um método rápido, preciso, de baixo custo em relação aos demais, indicado para ser utilizado em larga escala e também para fins comparativos (SWAMINATHAN; KHANNA, 2009).

Existem dois padrões de respostas sorológicas que podem ser observadas no indivíduo infectado pelo DENV dependendo do estado imunológico que corresponde à resposta de anticorpo primário e secundário (SHU; HUANG, 2004). Na infecção primária, o ELISA busca a detecção de anticorpos IgM, que surgem nos primeiros dez dias de doença, podendo ser encontrado desde o segundo dia em alguns pacientes, e persistem aproximadamente durante dois meses. A confirmação de anticorpos IgG, produzidos a partir do quarto dia após o início dos sintomas, necessita da comparação entre o soro na fase aguda e do soro da fase de convalescença. A partir da segunda semana de infecção os níveis de IgG mantêm-se detectáveis e permanecem por toda a vida do indivíduo que apresentará imunidade contra o tipo infectante (FIGUEIREDO, 1999; GUZMA; KOURI, 2002). Na reinfecção, a resposta imune é do tipo anamnésico, com produção de IgM mais baixa e transitória, e de IgG alta e precoce (PAULA; FONSECA, 2004).

Os profissionais da saúde utilizam a prova do laço (TT), indicado pela OMS em 2011, como um dos meios de diagnóstico para dengue. No Brasil, a TT é obrigatória em todos os casos suspeitos de dengue e pode ser usado como uma possibilidade para diagnosticar FHD, embora nunca como o único critério para tal classificação. A positividade para o TT indica a fragilidade capilar e propensão de eventos hemorrágicos no paciente (SUKUPOLVI-PETTY et al., 2007; ANTUNES et al., 2013).

2.6 IMUNOPATOGENIA

Dengue é uma doença imunomediada em que a resposta do hospedeiro pode agravar a infecção e causar danos ao próprio. Possui alta morbidade podendo apresentar-se na forma oligossintomática, clássica e forma hemorrágica (grave). A imunopatogênese da DC e FHD/SCD ainda não é totalmente conhecida. Há hipóteses de ser caracterizada por uma superprodução de citocinas, anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, que levam ao desenvolvimento de uma grande variedade de manifestações clínicas e laboratoriais ocorrendo mudança do perfil Th1 para Th2, e replicação do vírus dengue relacionada ao fenômeno Antibody Dependent Enhancement

- ADE (CHEN et al., 2007; WANG et al., 2007; MAMMEN JR et al., 2008; WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

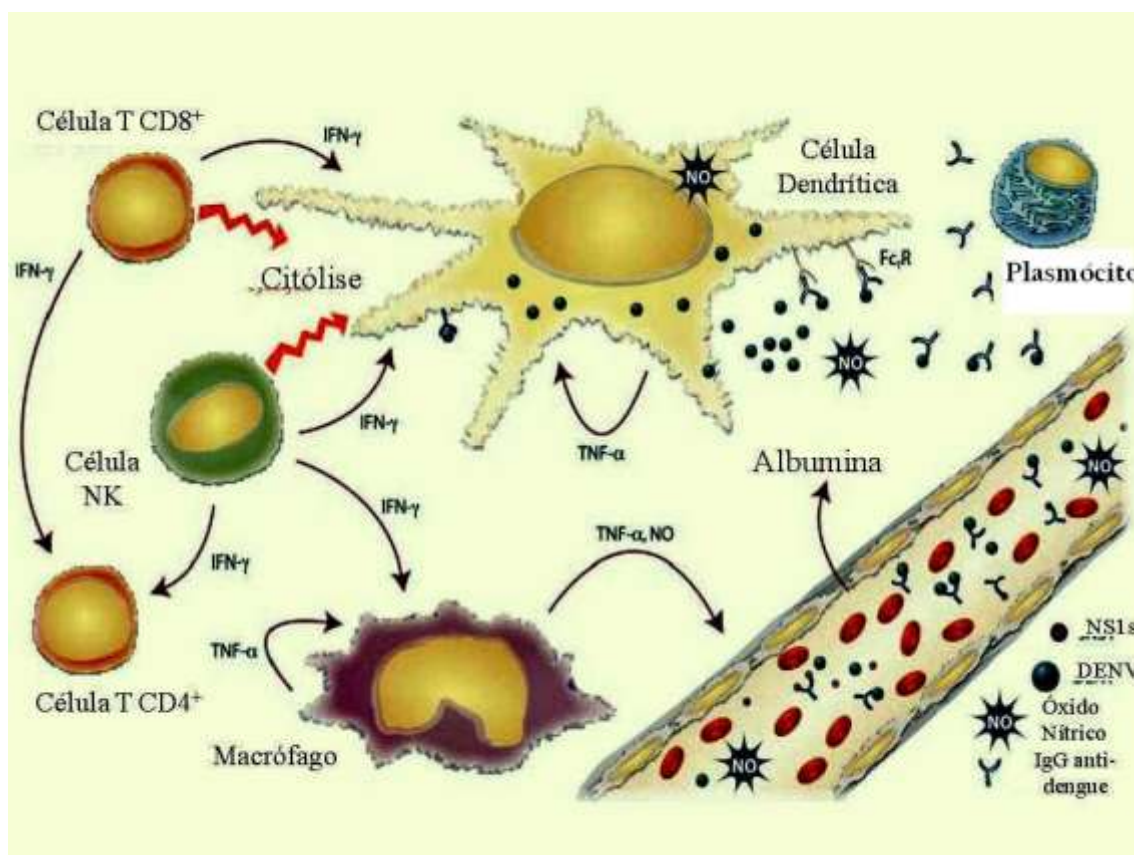
A produção de anticorpos neutralizantes específicos, que tem como alvo as proteínas do envelope viral, ocorre com a ativação da resposta imune humoral seis dias após a inoculação do vírus no indivíduo. O período de incubação do vírus, no homem, em sua forma clássica normalmente é até 7 dias. Os principais sintomas consistem em febre alta, que pode durar de 2 a 7 dias, cefaléia, mialgia, artralgia, prostração, náuseas, vômitos, dor abdominal, exantema maculo-papular, prurido e dor retro-orbital (PEELING et al., 2010).

Os alvos primários do vírus dengue são as células da linhagem fagocíticas mononucleares (monócitos, macrófagos e células dendríticas), onde se acoplam através dos receptores de membrana Fc (FcR) tornando-os mais permissíveis ao vírus que penetram e replicam no interior destas células e, posteriormente, são liberados aos tecidos subjacentes pelo complexo de golgi (TORRES, 2005). Por volta do quinto dia de sintomatologia a evolução clínica do paciente pode regredir e ocorrer a cura ou avançar para a fase de extravasamento de plasma, levando à FHD/SCD.

Nesta etapa de transição clínica mensura-se que são sintetizados mediadores químicos em maior número e variedade como, por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que contribui para a trombocitopenia; interferons (IFNs) que indicam uma resposta inadequada das células Natural Killer (NK), muito frequente nas infecções agudas da DC; interleucina (IL)-6 que estimula a liberação de histamina por basófilos, aumentando a permeabilidade vascular; entre outros (AZEREDO et al., 2006). Os macrófagos ativados pelas células citotóxicas liberam tromboplastina que inicia fenômenos de coagulação, proteases ativadas do complemento e produz NO, que em grande quantidade causa danos às células endoteliais (CLYDE et al., 2006).

O vírus dengue infecta uma célula dendrítica da linhagem de macrófagos/monócitos através de endocitose por receptor e viabiliza a captação de complexos vírus-anticorpo anexados aos receptores Fc (FcR). São sintetizados TNF- α e NO pelos monócitos e macrófagos infectados que ativam células endoteliais, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular. Os IFNs são sintetizados também por células CD8⁺ e CD4⁺ que ativam macrófagos. Elevado nível de DENV e NS1 circulam na corrente sanguínea. Ambos têm se mostrado complexos imunes (figura 3).

Figura 3: Desenho esquemático da infecção pelo DENV



Fonte: Adaptado de Clyde et al., 2006.

Whitehorn e Simmons (2011) encontraram em seu estudo maior possibilidade de FHD em infecções secundárias. Esse fenômeno denomina-se Antibody Dependent Enhancement – ADE ou, comumente conhecido, como anticorpos potencializadores de infecção. A explicação dessa teoria, que inicialmente foi referida por Halstead em 1970, seria a presença de anticorpos heterólogos não neutralizantes para outros sorotipos sintetizados durante a primo-infecção e que ampliam a replicação viral pela adição do receptor Fc (FcR), no processo de adsorção, aumentando a infecção das células alvos, podendo desencadear reações hemorrágicas (FIGUEIREDO, 1999). Esta teoria também está relacionada ao risco de crianças menores de um ano de idade têm em desenvolver FHD pela aquisição de imunoglobulinas G (IgG) pela via transplacentária (HALSTEAD, 1970; 1977; LEI et al., 2008).

Os anticorpos e linfócitos T de memória, induzidos pela infecção primária, normalmente encontram antígenos do DENV que diferem na sequência do seu antígeno alvo original. Essa diferença dos locais de ligação aos anticorpos afeta a qualidade da resposta efetora e modifica a imunológica, ou seja, reduz a avidez das interações entre

os anticorpos pré-existent e o novo sorotipo de DENV. Essas interações menos ávidas tem um efeito significativo sobre a capacidade dos anticorpos em neutralizar a infectividade do vírus (ROTHMAN, 2004; 2011). Peptídeos variantes, ou peptídeos ligantes alterados, induzem diferentes sinais de ativação de linfócitos T específicos para o antígeno e, dessa forma, modulam as funções efectoras específicas das células $CD4^+$ e $CD8^+$ (SLOAN-LANCASTER; ALLEN, 1996). Uma vez que os anticorpos heterólogos não são neutralizados, as partículas virais replicam dentro dos macrófagos, principalmente, viabilizando o aumento do número de células infectadas que leva a uma grande carga viral, usualmente no início da infecção, agravando a patologia (FIGUEIREDO, 1999; TEO et al., 2009). Essa teoria sequencial é a hipótese mais divulgada hoje em dia. Contudo, existem fatores que contribuem para explicar que a teoria do ADE sozinha não é a única causa de FHD/SCD.

Foram observados casos de FHD na infecção primária sugerindo que outros fatores como as características virais, variabilidade genética do hospedeiro e resposta imunológica (GUZMAN; KOURI, 2002; NIELSEN, 2009) podem influenciar na severidade da doença e que por isso nem todas as infecções secundárias resultam em FHD. Segundo Rosen (1977), as passagens sucessivas do vírus em hospedeiro humano e em mosquitos culminam no aparecimento de cepas mais virulentas causando maior inflamação e acometimento de células infectadas, além de evadir o sistema imune.

O vírus dengue provoca intensa ativação imunológica. Pode infectar as células dendríticas imaturas, monócitos e células B. Os monócitos são o alvo importante para a infecção mas sofrem apoptose para evitar a propagação do vírus sendo fagocitados pelos macrófagos (LEI et al., 2008). A superprodução de citocinas e geração de autoanticorpos contra as plaquetas e células endoteliais ocorrem depois do contato com proteínas NS1 ou prM do vírus e explica a reação cruzada de anticorpo anti-NS1 ou anti-prM às células hospedeiras, participando no ataque de plaquetas e células endoteliais durante o desenvolvimento da doença. Logo, os macrófagos ativados contribuem para o desenvolvimento de trombocitopenia em FHD/SCD (LIN et al., 2002).

O efeito sinérgico de citocinas no endotélio contribui para o desenvolvimento do extravasamento de plasma (WHITEHORN; SIMMONS, 2011) que é explicado pela consequência da ativação de células T resultando na cascata de citocinas, especialmente pró-inflamatórias (MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000). Alguns estudos (FIGUEIREDO, 1999; CLYDE et al., 2006) demonstraram que as citocinas de etiologia

macrofágica e linfocitária encontram-se em níveis elevados no caso da FHD. A exemplo do $\text{TNF-}\alpha$ que estimula as células do endotélio vascular e monócitos a liberar fator ativador plaquetário e óxido nítrico (NO) que dessa forma aumenta a permeabilidade vascular e extravasamento de plasma, aumentando seus níveis à medida que aumenta a gravidade da infecção. Outras citocinas e mediadores químicos elevam a permeabilidade vascular, induz a trombocitopenia e a ocorrência de hemorragia o que contribui para o desfecho de FHD/SCD (MARTINA et al., 2009).

2.7 ÓXIDO NÍTRICO

2.7.1 Química do óxido nítrico

O óxido nítrico (NO), que é produzido por meio da catalisação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e tem como precursor o aminoácido L-arginina, é um gás inorgânico de meia vida de menos de 30 segundos em sistemas biológicos, que pode se difundir livremente entre as membranas de suas células alvo. É produzido por diferentes tipos celulares podendo atuar em importantes processos fisiológicos: vasodilatação, atividade citotóxica imune, neurotransmissão, adesão e agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea, entre outros (MONCADA; HIGGS, 2006; ABBAS et al., 2011).

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial no homem e um dos produtos da detoxificação da amônia, participa do ciclo da uréia, é precursor de proteínas (figura 4), participa da síntese de várias enzimas e, atua também, na liberação de hormônios como catecolaminas, glucagon, insulina, corticosteróides, hormônio do crescimento, somatostatina e prolactina (CYLWIK et al., 2005). Em humanos a principal síntese da L-arginina ocorre no fígado e rim a partir da L-citrulina como produto do metabolismo nitrogenado da glutamina pelo intestino. No ciclo da uréia, o fígado utiliza grande parte da L-arginina que produziu, o rim, somado à ingestão dietética diária (1-3g/dia), mantém os níveis plasmáticos de L-arginina constantes (MORRIS, 2004).

A liberação da L-arginina no meio extracelular, em alguns tipos celulares e doenças, parece ser fundamental para a produção de NO ainda que a concentração intracelular da mesma seja suficiente para a produção de NO, fenômeno denominado como “o paradoxo da L-arginina” (VERREY et al., 2004). Quando no interior da célula, a L-arginina é convertida em NO e L-citrulina pela enzima NOS.

Figura 4: Principais vias metabólicas do aminoácido L-arginina



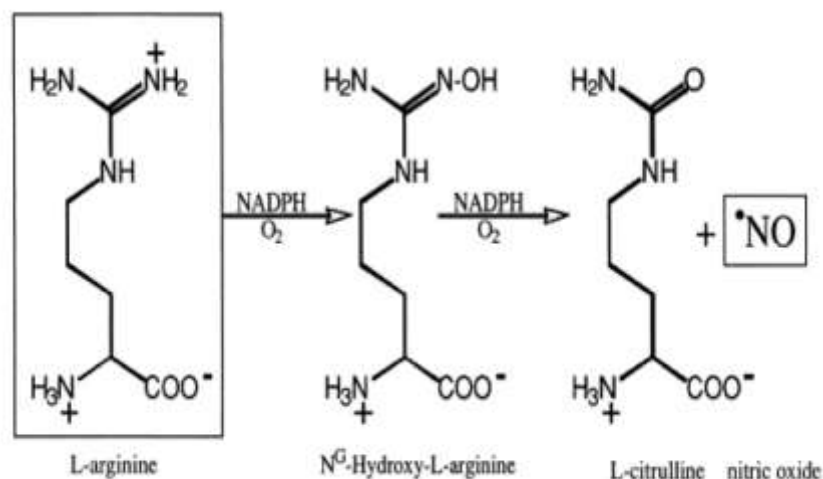
Fonte: Adaptado de Morris, 2004.

Várias teorias foram propostas com finalidade de explicar esse paradoxo. Uma delas seria a possibilidade de a síntese de NO através da NOS não estar ligada à concentração da L-arginina e sim, ao transporte deste. As células endoteliais e macrofágicas possuem um depósito de L-arginina com capacidade de troca com meio extracelular, e um segundo depósito incapacitado para esta atividade. Conforme o grupo de estudo de Closs (2004), o transporte de L-arginina para a produção de NO no segundo depósito é de suma importância visto que não há acesso à NOS em macrófagos. Como a L-arginina é utilizada e compartilhada por diferentes vias metabólicas como substrato, em especial a hidrólise de arginina em L-ornitina e uréia por ação da arginase, reflete a sumarização da L-arginina intracelular para a NOS reduzindo a produção do NO (CHICOINE et al., 2004). Apesar das teorias propostas, não há consenso quanto ao real mecanismo do paradoxo da L-arginina (MOSS, 2010).

Por ser um radical livre, gasoso, incolor, inorgânico e sua molécula possuir um elétron não pareado, o NO reage facilmente com o oxigênio, ferro, cobalto, manganês, cobre ou superóxido. Sua biossíntese no organismo ocorre via oxidação de L-arginina, sendo catalisada pela NOS. Nesta reação é necessária a presença da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como um doador de elétron, ocorrendo uma hidroxilação inicial de L-arginina formando N-hidroxi-L-arginina através da utilização de uma molécula de oxigênio e duas de NADPH. Uma posterior reação obtém como produto o NO e L-citrulina (GROSS et al., 1997; TATSCH, 2012)

por meio de um elétron proveniente do NADPH e outro da molécula de oxigênio (figura 5). É pertinente enfatizar que a síntese de NO está atrelada a L-arginina extracelular.

Figura 5: Síntese do óxido nítrico (NO) catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS).



Fonte: Tatsch, 2012.

Allen et al. (2009) afirmam que o NO participa de várias reações redox em virtude da sua característica de radical livre, entretanto também pode ser um radical oxidante, dependendo do meio em que se encontra, é lipofílico e se difunde rapidamente pela membrana plasmática conforme o gradiente de concentração (MATSUURA et al., 2012). Algumas dessas reações são responsáveis pelos efeitos biológicos e outras inibem suas atividades. Reações com molécula reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio promove a inativação do NO (KELM et al., 1999). Reações de NO, em presença de oxigênio, diferem entre *in vitro* e *in vivo* (presença da hemoglobina) sendo o principal produto de degradação o NO_2 (nitrito) e NO_3 (nitrato), respectivamente. O significado químico e biológico da oxidação do NO pela molécula de oxigênio ainda é indefinido, porém essas reações são fundamentais para sua fisiologia e toxicidade.

A NOS é classificada em três formas: neuronal (nNOS ou NOS1), indutível/induzida (iNOS ou NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3). A atividade da nNOS e eNOS é dependente dos níveis de cálcio enquanto que a iNOS é independente do cálcio (TATSCH, 2012). As enzimas constitutivas nNOS e eNOS induzem baixas concentrações de NO, que modulam a atividade de proteínas contendo heme

(SHARMA et al., 2007; MATSUURA et al., 2012). O estímulo por citotoxinas e macrófagos à síntese da iNOS gera maiores concentrações de NO, o que pode resultar em resíduos de cisteína nitrosilada ou nitração de tirosina em diferentes proteínas bem como desaminação de DNA (TRIPATHI et al., 2007) e ativação imune/inflamatória. A eNOS, encontrada no endotélio, induz níveis baixos de NO viabilizando a diminuição da pressão sanguínea e inibição da adesão e agregação plaquetária (NAPOLI; IGNARRO, 2009).

A enzima iNOS é considerada a primeira linha de defesa, mediando a citotoxicidade não-específica de macrófagos contra patógenos, também regulando respostas específicas mediadas por células, suprimindo a proliferação alogênica e mitogênica de linfócitos T. Ela é responsável direta pela atividade antimicrobiana e antiparasitária dos macrófagos (MALAGRIS, 2012). Estudos indicam que a baixa produção de NO direta ou transitória, exerce função homeostática/regulatória e anti-inflamatória (KENDALL et al., 2001). No entanto, condições fisiológicas alteradas, como as que ocorrem durante a inflamação, podem resultar no aumento da iNOS e na produção de NO, e em reações pró-inflamatórias indiretas (REHER, 2005).

A duplicidade das propriedades do NO, ora benéfica ora deletéria, pode ter efeito contraditório ao esperado, principalmente, em ações inflamatórias e de defesa do hospedeiro sendo uma molécula fundamental nesses processos (LIEW et al., 1991). Liew e Cox em 1991 demonstraram que a expressão aumentada de iNOS que ocorre em infecção e inflamação é reflexo natural da resposta adaptativa do hospedeiro aos estímulos nocivos e aos patógenos. No entanto, existem controvérsias de que a indução de iNOS, em algumas condições fisiopatológicas, seja parte de uma ativação imune descontrolada e deletéria, já que a inibição de NOS pode exercer efeitos protetores nessas condições (REHER, 2005).

2.7.2 Fisiologia do óxido nítrico na infecção dengue

O corpo humano sofre ação constante de radicais livres, cujo elétron desemparelhado localiza-se nos átomos de nitrogênio e oxigênio gerados pelos tecidos dos organismo, denominados de espécies reativas de nitrogênios (ERNs) e oxigênios (EROs), por processos inflamatórios, disfunção biológica (danos no DNA, proteínas e lipídios), ou ainda oriundos da alimentação (FINKEL; HOLBROOK, 2000). O NO é uma molécula mensageira presente em vários processos fisiológicos. Conforme sua

concentração, pode desempenhar função benéfica ou potencialmente tóxica (YAMAGUCHI et al., 2006). Em processos metabólicos as ERNs são envolvidas na regulação da pressão arterial, sistema imune, coagulação e neurotransmissão (PACHER et al., 2007). A reação do NO com o superóxido (O_2^-) para formar o peroxinitrito ($OONO^-$) pode resultar em diversas ERNs que em conjunto com as EROs possibilitam estresse oxidativo e danos às estruturas celulares ou até mesmo a morte celular (MARTÍNEZ; ADRIANTSITOHAINA, 2009).

Chaturvedi et al. (1996) foram os primeiros a sugerirem a participação do NO e peroxinitrito na dengue, mas as implicações maiores da infecção só foram distinguidas há quase uma década tal como as características da doença, os anticorpos (primário ou secundário), respostas de citocinas do perfil Th1 e Th2 e a cascata de citocinas resultando em extravasamento de plasma (CHATURVEDI et al., 2000; UBOL et al., 2010).

Responsável por manter o tônus vascular, regular a pressão sanguínea, prevenir a agregação plaquetária, inibir a adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular e ter efeito antiproliferativo das células da camada vascular (PACHER et al., 2007), alteração na biodisponibilidade do NO acarretará alteração no relaxamento vascular (ZHANG, 2008). Os efeitos biológicos do NO são iniciados principalmente através da ativação da enzima heterodimérica guanilil ciclase solúvel (GCs) pela produção de guanosina monofosfático cíclico (GMPc), um segundo mensageiro que também promove mudanças no organismo humano e medeia a ação do NO sobre as plaquetas onde este radical reage com o ferro do grupamento heme. A GMP inibe a entrada de cálcio nas células e diminui o nível de cálcio no meio intracelular (CHATURVEDE; NAGAR, 2009). Estes episódios bioquímicos estimulam a sinalização do NO para a modulação do tônus vascular e fluxo sanguíneo (COGGINS; BLOCH, 2007). Assim, mediante influência exercida sobre as plaquetas, o NO atua inibindo os três componentes de sua função: adesão, ativação e agregação, bem como o recrutamento plaquetário (BREDT; SNYDER, 1994; MONCADA; HIGGS, 2006). É importante ressaltar que há um equilíbrio delicado entre a ativação de plaquetas e a inibição da fluidez do sangue para impedir a formação patológica de trombos. Um dos principais mecanismos de inibição envolve tanto as plaquetas quanto o NO do endotélio (MATSUURA et al., 2012).

A FHD é uma síndrome que pode ameaçar a vida do paciente em sua forma mais grave, principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular e choque (RANJIT;

KISSOON, 2011). O NO também parece ter função paradoxal na FHD (CHATURVEDI; NAGAR, 2009) por exercer efeitos antivirais através de diversos mecanismos, tais como a inativação da cisteína protease viral pela NOS (SAURA et al., 1999). Tal como afirmado acima, as plaquetas e o NO produzido pelo endotélio são essenciais para a manutenção da hemostase. Assim, quando produzido em excesso por estas células, o NO pode prejudicar a formação de coágulo sanguíneo e contribuir para a tendência hemorrágica observada em FHD (MATSUURA et al., 2012).

O estudo de Matsuura et al. (2012) demonstrou que a produção de NO nas plaquetas, de pacientes acometidos pela FHD, foram aumentadas. Reconhecendo que o NO tem funções importantes no controle da replicação do vírus em monócitos, macrófagos e células dendríticas, mas o seu excesso em outros tipos de células pode ser deletéria e contribuir para o extravasamento de plasma e sangramento.

Os monócitos e macrófagos representam alvos importantes durante a infecção do dengue por viabilizar a disseminação viral, o DENV é capaz de induzir o estresse oxidativo em humanos sugerindo que a interação com monócitos e macrófagos pode desempenhar um papel na patogênese da dengue (GLUBER, 1998; ROJAS et al., 2007; SEET et al., 2009). Também foi relatado que alterações imunológicas podem influenciar o metabolismo oxidativo e vice-versa (KOBAYASHI, 2010).

No trabalho desenvolvido por Sukathida et al. (2008), foram isoladas cinco amostras de pacientes com DC e cinco com FHD, as amostras de DC mostraram-se sensível à ação do NO enquanto os demais isolados apresentaram-se resistentes. Esse relatório sugeriu que o NO pode exercer seu efeito inibitório através da supressão da atividade do gene NS5 resultando na supressão da síntese de RNA viral (TAKHUMPANYA et al., 2006). Temos assim a hipótese de que os aminoácidos do genoma do vírus, particularmente no sítio ativo de NS5, podem determinar a resistência ou suscetibilidade ao NO. Em um trabalho anterior (CHARNSILPA et al., 2005), foi demonstrado que o NO inibe a replicação do DENV e reduz o número de proteínas virais nas células infectadas.

O NO tem efeitos variáveis sobre a síntese de citocinas (CHATURVEDI; NAGAR, 2009). Considerando que a dengue é uma doença aguda, mediadores como o IFN- α , IFN- β , NO e TNF- α provavelmente alteram a replicação do DENV, embora reações inflamatórias também possam ocorrer (AZEREDO et al., 2010).

Os mecanismos desencadeados pelo DENV para escape da resposta antiviral da via interferons (IFNs) ainda são poucos conhecidos. Entretanto, algumas proteínas

virais (NS2A, NS4A, NS4B e NS5 na baixa expressão das STAT1 e STAT2 impedem a produção dos IFNs) parecem estar envolvidas no processo (JONES et al., 2006).

Para muitos vírus o passo inicial para o estabelecimento de infecção é a evasão da resposta antiviral inata fornecida, inicialmente, pelo IFN. O IFN- α e β são secretados por células infectadas e exibem múltiplas propriedades biológicas, incluindo efeito antiviral, antiproliferativo e imunomodulador (STARK et al., 1998).

Ademais, estão sendo utilizadas células dendríticas derivadas do progenitor mielóide para categorizar propriedades virais peculiares que acarretariam o desenvolvimento de formas graves de dengue na fase aguda mesmo frente à infecção viral primária. Com isso, algumas cepas virais, associadas às formas graves, seriam capazes de induzir alta viremia e alta produção de IFN. Estes são denominados fatores contributivos para a gravidade da doença apesar de o DENV ser capaz de desenvolver mecanismos de evasão na via de sinalização dos IFNs (JONES et al., 2006). Essas variáveis apenas seriam observadas na FHD e na SCD, pois na DC os baixos títulos pouco induziriam a ativação dos IFNs devido ao bloqueio de sinalização pelas suas próprias proteínas estruturais (PAGNI; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

Alguns autores têm sugerido que as citocinas secretadas por células infectadas pelo DENV desempenham papel fundamental na fisiopatologia da FHD (CHATUVERDI et al., 2000), embora não haja consenso sobre as citocinas predominantes produzidas durante a infecção. A função desempenhada pelo TNF- α tem sido relevante na dengue. Bethell et al. (1998) observaram relação entre níveis elevados de receptores de TNF- α e a gravidade da FHD, sendo confirmada também no estudo de Chen et al. (2007) no qual a deficiência de TNF- α diminuiu o desenvolvimento hemorrágico (YEN et al, 2008).

Alterações na indução de fatores de transcrição dependente da via do TNF- α foram observadas durante o curso da infecção pelo DENV-2 em células da linhagem monócito/macrófago (WATI et al., 2011). Estas células estão entre as principais fontes dos elevados níveis de TNF- α detectados em infecções experimentais por DENV (CHEN; WANG, 2002; ESPINA et al., 2003). Nestas células, após a interação de IFN- α e β com o receptor específico, ocorre a ativação das enzimas Janus kinases, JAK1 e Tyk2, pela fosforilação dos resíduos de tirosina. Essas quinases fosforilam transdutores de sinais e ativadores de transcrição 1 e 2 (Signal Transducers and Activators of Transcription – STAT1 e STAT2) que formam dímeros, os quais se ligam ao IRF9 formando o complexo de gene do fator 3 estimulado por IFN (ISGF3). Esse complexo

transloca para o núcleo e inicia a transcrição de genes estimulados por IFN (ISG) ao ligarem a elementos de resposta estimulados por IFN (ISRE). Os ISGs são responsáveis por várias funções biológicas tais como expressão de quimiocinas como CXCL9, CXCL10, CXCL11, moléculas de adesão endotelial (ICAM1), indução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , que contribuem para o aumento de permeabilidade vascular, migração de fagócitos e ativação de linfócitos T (BORDEN, SEN et al., 2007). A partir da liberação de citocina pró-inflamatória TNF- α , ocorre ligação desta molécula ao receptor específico TNFR, induzindo a produção de mediadores inflamatórios tais como espécies reativas de oxigênio e NO. Em geral, os resultados apontam para a detecção de elevados níveis de TNF- α em formas mais graves da infecção (CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006; GREEN; ROTHMAN, 2006) com potencial envolvimento de polimorfismos genéticos funcionais em alelos desta citocina (PEREZ et al., 2010). Porém observa-se que em algumas populações esta correlação entre TNF- α e formas hemorrágicas de dengue não se aplica (PURWATI et al., 2011). Maiores definições acerca desta associação entre produção de TNF- α e formas clínicas de dengue são necessárias em populações de pacientes constantemente sob o risco de exposição às novas infecções.

A IL-6 é secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos e hepatócitos sendo o TNF- α um potente indutor. É uma citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, macrófagos, diferenciação/manutenção de linfócitos T citotóxicos e células NK. Esta interleucina é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos como infecção (OLIVEIRA et al., 2011). Na dengue, a IL-6 pode ser secretada por monócitos induzidos por outras citocinas tais como IL-1 e TNF- α . Suas principais atividades biológicas incluem a indução de proteínas na fase aguda, promoção da diferenciação da células B e ativação das células T (JUFFRIE et al., 2001), podendo também participar como mensageira endógena e afetar a permeabilidade do endotélio (MALAVIGE et al., 2004). Foi demonstrado que os níveis de TNF- α , IFN- α e IL-6, somados à outra variedade de citocinas, foram elevados em pacientes com FHD quando comparados aos pacientes com DC (CHEN et al., 2006). Em contraste, um estudo realizado por Priyadarshani et al. (2010) mostrou que não havia diferença de TNF- α , em pacientes com FHD, quando comparado com aqueles com DC (PRIYADARSHANI et al., 2010).

Sabe-se que o NO é reconhecido como um importante mensageiro o qual tem sido associado à patogênese de DC e FHD por mediar os danos das células endoteliais e possível envolvimento na gênese do extravasamento do plasma (LIN et al., 2002), assim como não se sabe ao certo quais as reais ações das citocinas frente a gravidade da doença. Portanto, avaliar a capacidade das células sanguíneas de produzir NO e citocinas, e se há diferença entre as formas clínicas DC e FHD (I, II, e III), tipo de infecção primária e secundárias e sorotipos virais circulantes, e considerá-los como possível marcador biológico é de suma importância a fim de que sejam providos os devidos cuidados clínicos e terapêuticos ao paciente.

3. OBJETIVO

3.1 GERAL

Avaliar os níveis séricos de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (INF- α , INF- β , TNF- α e IL-6) em pacientes diagnosticados com dengue na Paraíba no período de 2009 a 2011.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a variação dos níveis séricos de NO nos pacientes diagnosticados com Dengue Clássica (DC) ou Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) ao longo dos dias de internação hospitalar após início de sintomas específicos.
- Comparar os níveis séricos de INF- α , INF- β , TNF- α e IL-6 entre grupos de pacientes diagnosticados com Dengue Clássica (DC) ou Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) entre o primeiro e segundo dia de sintomas específicos.
- Avaliar como potencial marcador biológico a dosagem dos níveis séricos de NO e INF- α , INF- β , TNF- α e IL-6 nos pacientes diagnosticados com dengue.

4. METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo que busca comparar os níveis séricos de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (INF- α , INF- β , TNF- α e IL-6) em pacientes infectados pelo dengue, como potencial marcador biológico.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

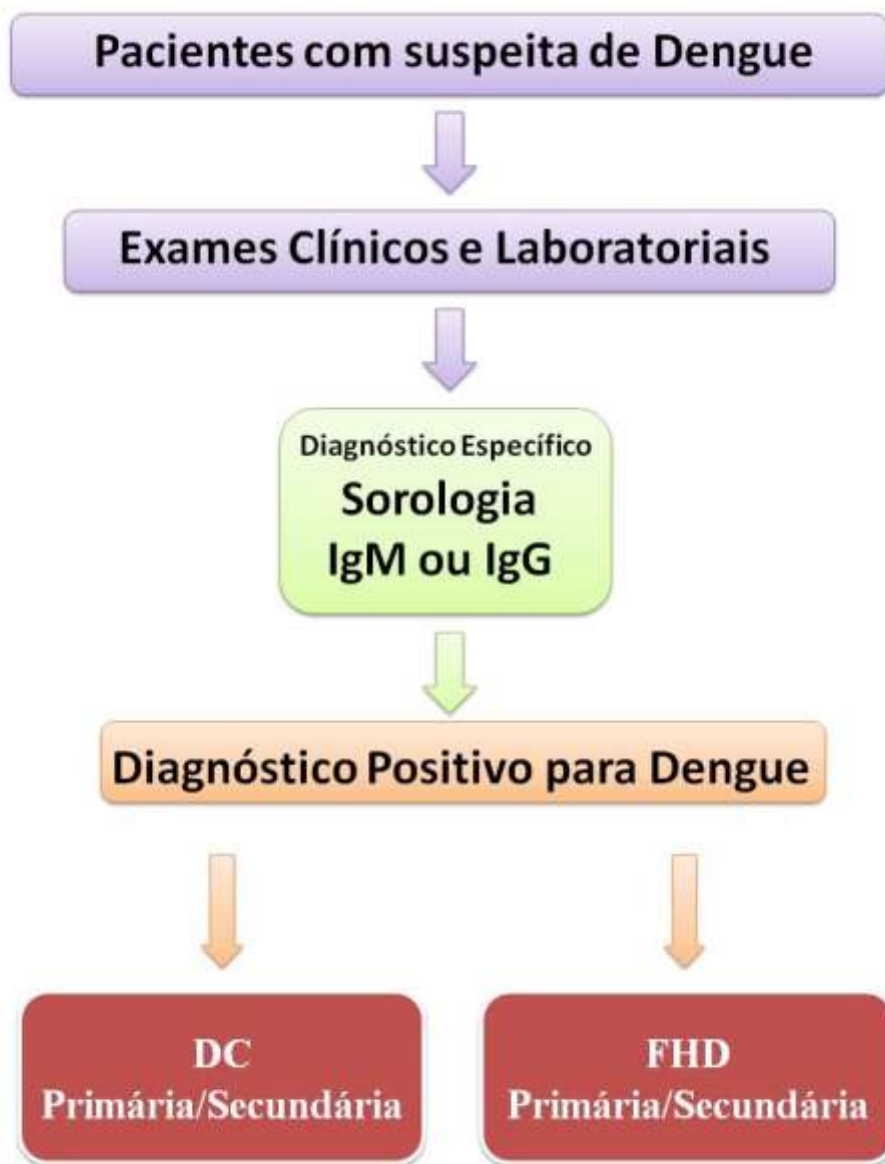
A caracterização do sorotipo viral foi realizada no Laboratório Aggeu Magalhães – LAVITE/ FIOCRUZ, em colaboração com a Professora Dra. Marli Tenório. A quantificação do NO e das citocinas pró-inflamatórias foi realizada no Laboratório de Cultivo e Análise Celular da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba (LACEC/ETS/UFPB), situada na cidade João Pessoa/PB, com a seleção dos soros de pacientes diagnosticados com dengue provenientes do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW/UFPB). Os exames de diagnósticos foram realizados segundo rotina do Hospital.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Esta pesquisa utilizou dados secundários obtidos por meio de revisão de prontuários de pacientes diagnosticados com dengue, atendidos no Setor de Doenças Infecto-Contagiosas do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (DIC/HULW/UFPB), obtidos a partir de material previamente coletado, entre os anos 2009 a 2011, para fins diagnósticos segundo os critérios indicados pela Organização Mundial da Saúde/WHO (1997) e adotados pelo protocolo hospitalar.

A figura 6 apresenta o fluxograma de seleção dos pacientes que participaram do estudo.

Figura 6: Fluxograma de seleção dos pacientes do estudo.



4.4 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

Variáveis dependentes

Foi considerada variável dependente a quantificação sérica de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (INF- α , INF- β , TNF- α e IL-6) entre os grupos de pacientes com dengue.

4.5 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

As amostras de soros foram obtidas por demanda espontânea após os pacientes ou seus representantes legais serem esclarecidos no momento da consulta médica sobre o objetivo da pesquisa, em contribuir para a identificação de fatores de risco no desenvolvimento da forma grave da dengue, e aceitarem participar do estudo foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Um total de 307 amostras de pacientes foi selecionado para o estudo.

Critério de inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos com:

- DC
- FHD
- infecção primária (DC e FHD)
- infecção secundária (DC e FHD)
- infecção pelo sorotipo DENV-1
- infecção pelo sorotipo DENV-2
- infecção pelo sorotipo DENV-3
- infecção pelo sorotipo indefinido (NEG)

O nosso estudo se ateve a antiga classificação uma vez que os casos ocorreram entre os anos de 2009 a 2011.

Critério de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes que apresentaram sorologia negativa para o dengue.

4.6 COLETAS DE DADOS SECUNDÁRIOS

Foi coletado nos prontuários dados quanto:

- Identificação no prontuário relacionado ou não à internação
- Manifestações clínicas clássicas presentes durante a internação
- Manifestações clínicas hemorrágicas e complicações presentes durante a internação

- Resultados de exames laboratoriais (sangue)

Foi elaborado um banco de dados com as informações de cada paciente e processado em planilha Microsoft Excel, versão 2007, mediante classificação da forma clínica, Dengue Clássica (DC) ou Febre Hemorrágica da Dengue (FHD I, II e III), tipo de infecção primária ou secundária, seguindo o proposto pela OMS 1997, sorotipo circulante (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e NEG) e em relação aos dias de sintomatologia característica do dengue.

4.7 MÉTODO DE COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS

Espécimes biológicos para o diagnóstico laboratorial: Foram utilizadas quatro amostras de sangue dos 307 pacientes, os testes foram realizados no Laboratório Aggeu Magalhães – LAVITE. Resultados obtidos em colaboração com a Professora Dra. Marli Tenório (LAVITE/CPqAM/FIOCRUZ - Recife/PE). Após a coleta houve a separação do soro através de centrifugação 720 x g durante 30 minutos e armazenamento a -80°C.

Caracterização do sorotipo viral: A detecção do RNA viral foi determinada por reação de amplificação pela polimerase, precedida de RT-PCR, seguida de *semi-nested* PCR, utilizando iniciadores (*primers*) universais do vírus dengue baseados na região 5' não codificada discriminante dos quatro sorotipos. Os produtos da RT-PCR (RNA) foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de etídio. Ao concordar em participar da pesquisa foram coletadas amostras de 4ml do sangue periférico do indivíduo, em tubo sem anticoagulante e contendo gel separador ativador de coagulação, sendo a primeira amostra coletada no dia do atendimento médico e as demais durante o período de internação do mesmo, no setor de Doenças Infecto-Contagiosas do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (DIC/HULW/UFPB).

Determinação da produção de óxido nítrico (NO): utilizou-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Brevemente, foram separados 50µL das amostras e incubadas com 50µL da solução de redução de nitrato (5mg/mL NADPH, 0,5M KH₂PO₄, 1U/100µL enzima nitrato redutase) (SIGMA) durante 18 horas a 4°C. Após a incubação, 100µL da solução reagente de Griess (kit Griess Reagent System, Promega) foi adicionada às amostras em solução de redução de nitrato, e a concentração de nitrito obtida comparando-se os níveis detectados em filtro 540nm em leitor de microplacas (GloMaxi Multi Reader, Promega) com os obtidos em curva padrão de concentrações

conhecidas de nitrato de sódio (NaNO_3) fornecidos no kit. Na metodologia Griess, o nitrito (NO_2) em meio ácido reage com a sulfanilamida para produzir um íon diazônico. Os nitrogênios (diazó composto) reagem com o NED (cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina), formando um cromóforo de coloração rósea que apresenta pico de absorbância em 540 nm (BRYAN; GRISHAM, 2007). Esta reação colorimétrica é considerada uma técnica padrão devido à sua simplicidade e rapidez para a determinação dos níveis de NO_2 inorgânico (DUSSE et al., 2005).

Quantificação das citocinas pró-inflamatórias: utilizou-se a técnica de ELISA. Os kits utilizados foram BD Pharmingen™ Set Human IL-6 e BD OptEIA™ Set Human TNF. Cada placa de ELISA foi sensibilizada overnight, a 4°C, com 100µL de anticorpo monoclonal humano diluído em solução de carbonato bicarbonato 1N. A placa foi lavada com tampão PBS-Tween 0,05% e, em seguida bloqueada overnight, a 8°C, com solução de PBS-BSA 2%. Após o bloqueio a placa foi lavada duas vezes, e as amostras de soro foram adicionadas aos poços assim como o padrão recombinante. O anticorpo monoclonal humano, para cada mediador, conjugado a HRP (50µL) foi, então, adicionado a cada poço e a placa incubada a temperatura ambiente por 2 horas. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes, sendo, em seguida, adicionados 100µL da solução substrato em cada poço e incubando, posteriormente, a placa à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos sob a proteção da luz. Trinta minutos depois, 100µL de ácido fosfórico 1M foram adicionados a cada poço e, em seguida, realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 490nm.

Os níveis de IFN- α foram quantificados através do Human α Interferon (α IFN) Elisa kit (BioSource), de acordo com instruções do fabricante. Foram adicionados a cada poço da placa sensibilizada 50µL do soro de cada paciente, o padrão IFN- α humano, o branco (PBS 1x) e 100µL do anticorpo conjugado a enzima, em seguida a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após a incubação a placa foi lavada cinco vezes com o tampão de lavagem, foram adicionados 50µL da solução substrato A e 50µL da solução substrato B a cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 15 minutos sob a proteção da luz. Quinze minutos depois foram adicionados 50µL de solução parada a cada poço e foi realizada a leitura da absorbância (densidade ótica de 450nm) das amostras através do espectrofotômetro.

Os níveis de IFN- β foram quantificados através do VeriKine-HS™ Human IFN- β Serum ELISA kit (pbl interferon source), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram adicionados à placa sensibilizada 50µL do tampão da amostra,

50µL da solução do anticorpo diluído, 50µL do soro de cada paciente ou 50µL da diluição seriada do padrão IFN-β humano ou 50µL do branco (diluyente padrão), em seguida a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Após a incubação a placa foi lavada três vezes com o tampão de lavagem, foram adicionados 100µL da solução HRP diluída a cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Trinta minutos depois a placa foi lavada quatro vezes, foram adicionados 100µL da solução substrato TMB a cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 60 minutos sob a proteção da luz. Após os 60 minutos de incubação foram adicionados 100µL da solução parada a cada poço e foi realizada a leitura da absorbância (densidade ótica 450nm) das amostras através do espectrofotômetro.

Os valores da absorbância das amostras foram analisados com o software GraphPad Prism versão 5.0. As dosagens do NO foram executadas no Laboratório de Cultivo e Análise Celular da Escola Técnica de Saúde (LACEC/ETS/UFPB), situado na cidade de João Pessoa/PB. As amostras dos soros foram obtidas do mesmo sangue periférico solicitado pelo médico assistente e utilizado para exames.

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Mediante aos aspectos legais da bioética, âmbito científico, propriedade intelectual e outras determinações legais, as seguintes considerações foram pertinentes:

- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley (CEP/HULW) da Universidade Federal da Paraíba (nº032/09 CEP/HULW), com parecer favorável.
- Neste protocolo de pesquisa foram respeitados todos os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde, na Resolução Nº 196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012.
- Os pacientes, ou seus responsáveis, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos B e C).
- Foi assegurado o direito à confidencialidade dos dados e ao cuidado na utilização das informações nos trabalhos escritos, de modo a não ser possível a identificação das participantes.
- As informações obtidas foram destinadas exclusivamente para fins científicos.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram digitalizados em planilhas do software Excel – 2007 onde foi construído um banco de dados. Estes foram deslocados para o programa estatístico Graph Pad Prism, versão 5.0. Das informações obtidas da quantificação dos mediadores imunológicos, foram demonstradas as medianas entre os grupos e mensurada sua significância para cada análise.

Inicialmente, efetuaram-se os cálculos e análises estatísticas dos valores obtidos entre os grupos quanto aos níveis de NO, INF- α , INF- β , TNF- α e IL-6. Foram utilizados os testes Mann-Whitney (02 grupos) ou Kruskal-Wallis seguido do test de Dunn (03 grupos ou mais) para os dados não paramétricos. O p-valor < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

Um total de 307 indivíduos diagnosticados com dengue foi selecionado para o estudo. Os soros dos pacientes foram distribuídos em grupos conforme perfil clínico e laboratorial. Dessas amostras, 131 apresentou sintomatologia e exames laboratoriais confirmatórios para Dengue Clássica (DC) e 176 Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). Em DC, 55 pacientes com infecção primária e 76 secundária. Em FHD, 77 pacientes com infecção primária, 99 com secundária, 18 FHD I, 16 FHD II e 09 FHD III. Em seguida, foram alocadas em grupos de acordo com o sorotipo viral, 90 DENV-1, 101 DENV-2, 66 DENV-3 e 50 classificação indefinida (NEG) quando não detectado o sorotipo.

5.1 NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Na análise geral quando comparamos os pacientes diagnosticados com dengue levando em consideração o tipo da infecção em primária e secundária, não houve diferença estatística entre os níveis séricos de NO (figura 7A). Em relação às análises realizadas com os grupos de formas clínicas DC, FHD I, II e III não houve diferença estatística entre os níveis séricos de NO (figura 7B). Comparamos os grupos de formas clínicas distintas levando em consideração o tipo de infecção primária e secundária, também não houve diferença estatística entre os níveis séricos de NO (figura 7C). Quando comparamos os grupos em relação aos sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e sorotipo indefinido (NEG) não foi observada diferença estatística entre os níveis séricos de NO (figura 7D).

Na análise da quantificação de NO entre o 1º e 2º dia de sintomatologia em dengue primária e secundária foi observado maiores níveis de NO em pacientes com infecção primária (figura 8A) e, principalmente, quando a análise foi realizada comparando os grupos DC com FHD houve diferença estatística significativa, com $p=0,0048$ (figura 8B).

Do 3º ao 5º dia de sintomatologia a análise da quantificação de NO nos grupos de tipo de infecção primária e secundária não foi observada diferença estatística nos níveis séricos (figura 9A). Na análise feita nos grupos de formas clínicas DC, FHD I, II e III também não foi observada diferença estatística entre os níveis séricos de NO

(figura 9B). Levando em consideração a análise entre os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 nas formas clínicas DC e FHD foi observada uma tendência em maiores níveis de NO no sorotipo DENV-3 tanto na forma clínica DC quanto na FHD (figura 9C). Quando comparou-se os grupos em relação aos sorotipos DENV-1, DENV-2 e o sorotipo indefinido (NEG) não houve diferença estatística entre os níveis séricos (figura 9D).

Do 5º ao 7º dia de sintomatologia, a análise da quantificação de NO dos pacientes portadores de dengue não demonstrou diferenças estatisticamente significativa entre quaisquer grupos avaliados como indicado (figura 10), bem como a análise do 7º ao 28º dia de sintomatologia também não foi observado diferença entre os grupos avaliados (figura 11).

Figura 7: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre os pacientes diagnosticados com dengue primária e secundária (7A), formas clínicas Dengue Clássica (DC), Febre Hemorrágica de Dengue (FHD I, II, III) (7B), tipo de infecção primária e secundária em Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica de Dengue (FHD I, II, III) (7C), sorotipo viral (7D).

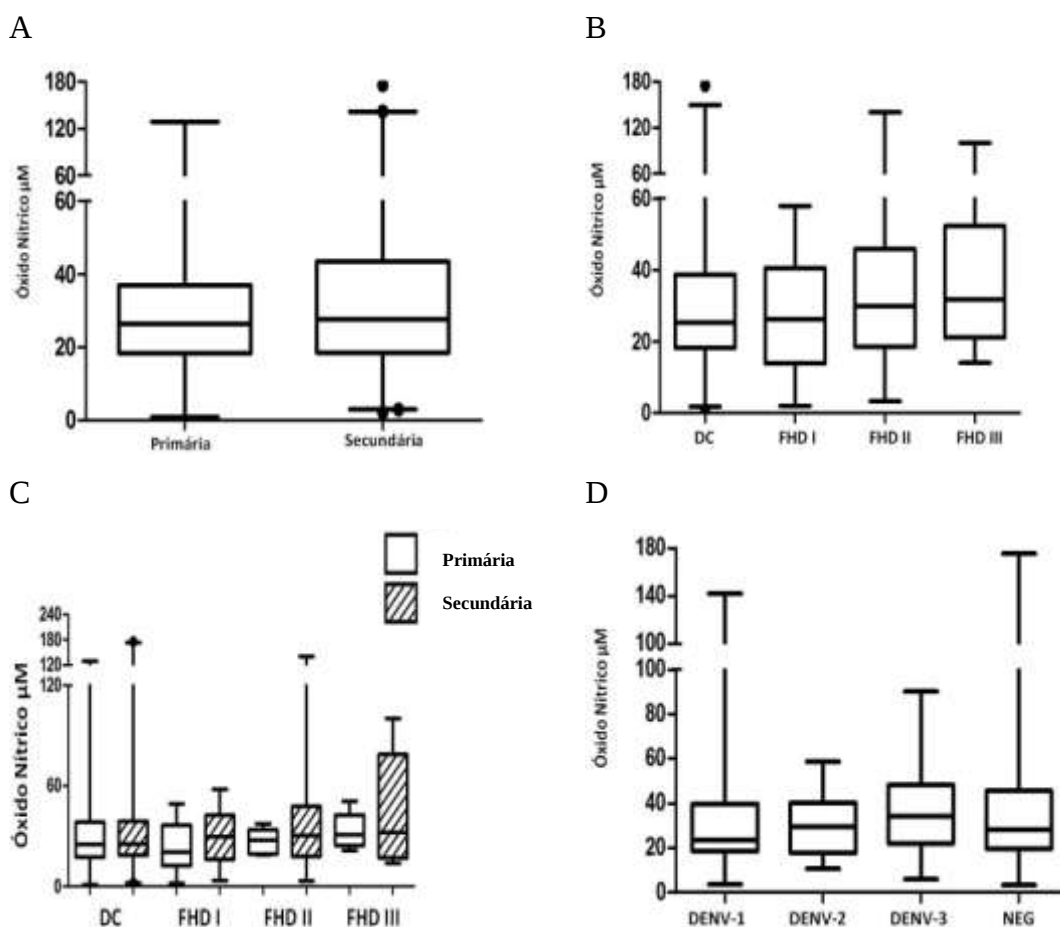


Figura 8: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre o 1º e 2º dia de sintomatologia nos pacientes diagnosticados com dengue primária e secundária (8A), Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (8B).

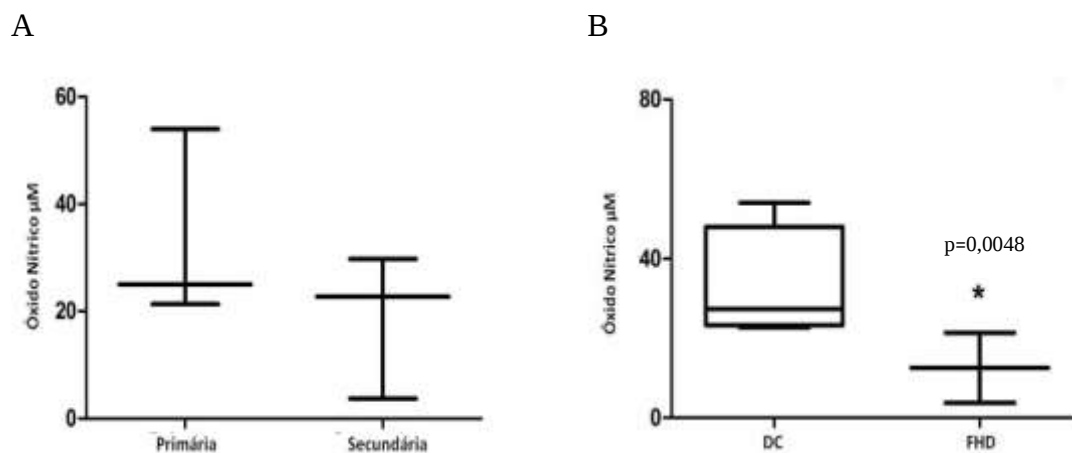
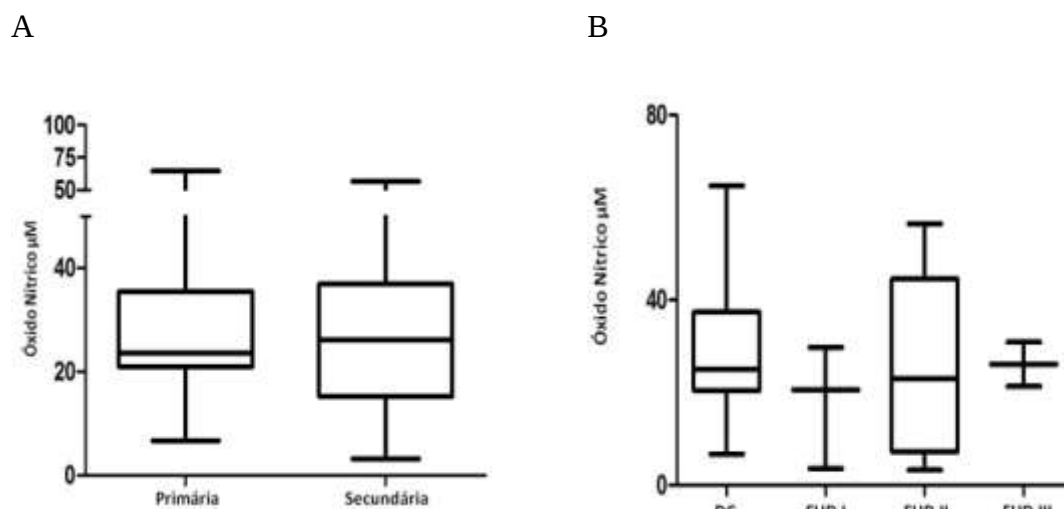
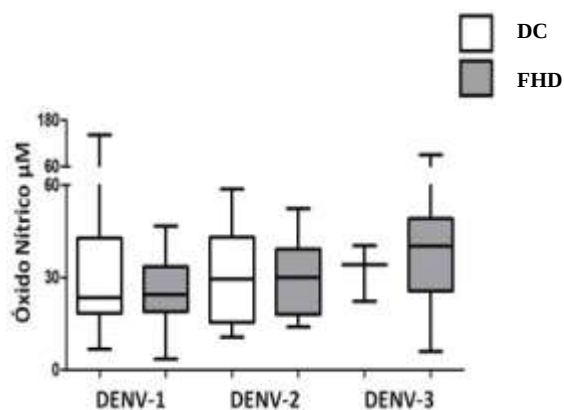


Figura 9: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre o 3º ao 5º dia de sintomatologia nos pacientes diagnosticados com dengue primária e secundária (9A), formas clínicas Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD I, II, III) (9B), sorotipo viral DENV-1, DENV-2 e DENV-3 nas formas clínicas Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (9C), sorotipo viral DENV-1, DENV-2 e indefinido (NEG) (9D).



C



D

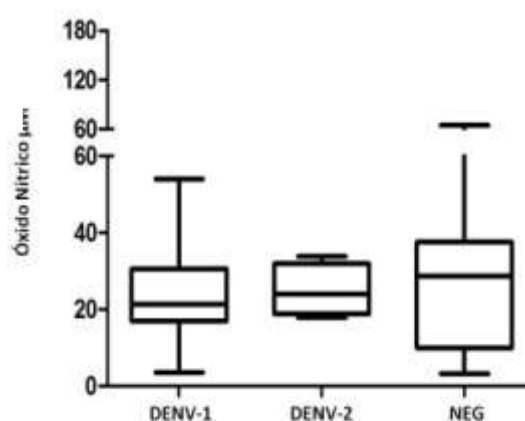
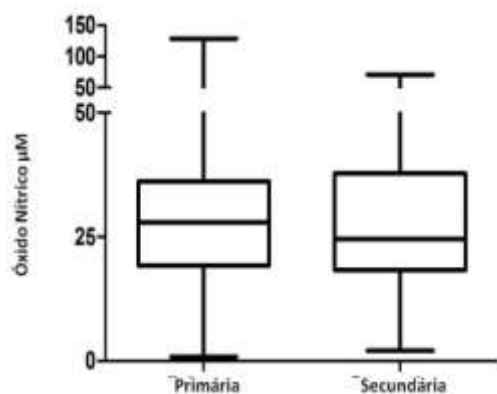
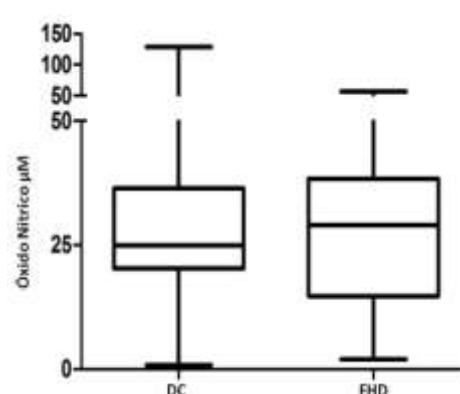


Figura 10: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre o 5º ao 7º dia de sintomatologia nos pacientes diagnosticados com dengue primária e secundária (10A), Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (10B), Dengue Clássica (DC), Febre Hemorrágica da Dengue (FHD I e II) (10C).

A



B



C

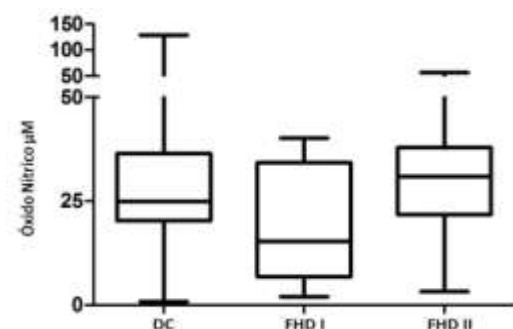
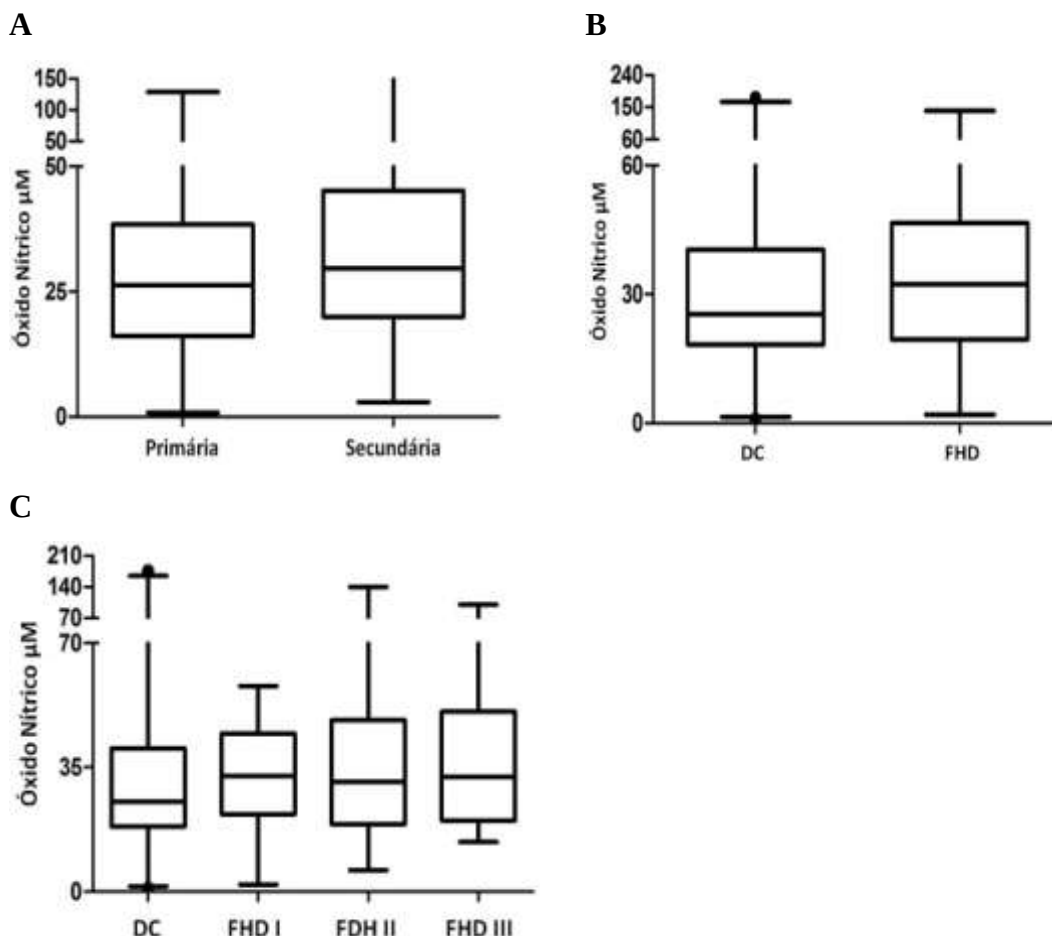


Figura 11: Análise dos níveis séricos de óxido nítrico (NO) entre o 7º ao 28º dia de sintomatologia nos pacientes diagnosticados com dengue primária e secundária

(11A), Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (11B), Dengue Clássica (DC), Febre Hemorrágica da Dengue (FHD I, II e III) (11C).



5.2 NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Na análise da quantificação de citocinas pró-inflamatórias entre o 1º e 2º dia de sintomatologia em dengue primária e secundária, foi observado um maior nível, frente às formas clínicas da dengue, de IFN- α . Observou-se diferença estatística entre os pacientes com dengue primária e secundária, com maior produção na infecção primária, verificando diferença estatística significativa com $p = 0,0409$ e curva padrão do teste ELISA apresentando coeficiente de correlação $r^2 = 0,993$. Esse dado é de grande importância clínica já que os casos de dengue secundária costumam apresentar-se com maior gravidade que os de dengue primária (figura 12A).

Não houve diferença no perfil de produção de IFN- α quando se analisou pacientes de acordo com as formas clínicas agrupadas em DC e FHD (figura 12B), DC e

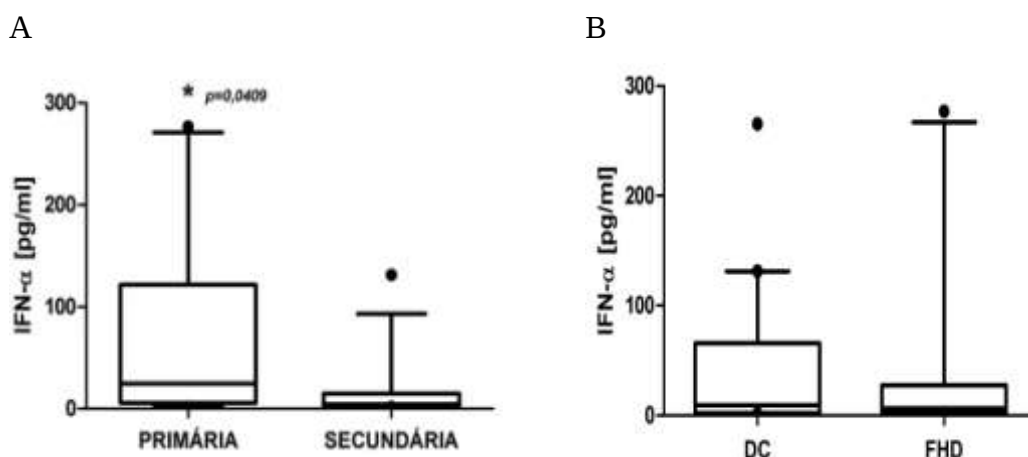
a gravidade da FHD I, II e III (figura 12C), bem como os sorotipos virais DENV-1 e DENV-2 (figura 12D).

Na análise da quantificação de citocinas pró-inflamatórias entre o 1º e 2º dia de sintomatologia, baixa concentração de TNF- α foi detectado. Entretanto não houve diferença entre os grupos estudados: dengue primária ou secundária (figura 13A), DC e FHD (figura 13B), DC e FHD I, II, III (figura 13C) e os sorotipos virais DENV-1, DENV-2, DENV-3 e NEG (figura 13D). A curva padrão do teste apresentou o coeficiente de correlação $r^2 = 0,996$.

Ao analisar a quantificação da IL-6, entre o 1º ao 2º dia de sintomatologia, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre dengue primária e secundária (figura 14A), DC e FHD (figura 14B), DC e FHD I, II e III (figura 14C). Porém, a quantificação da IL-6 no grupo de sorotipo DENV-2 mostrou-se com tendência a aumento (figura 14D).

A dosagem do IFN- β , apesar de ter sido realizada, não foram detectados níveis séricos mínimos dessa citocina.

Figura 12: Análise dos níveis séricos de IFN- α entre o 1º e 2º dia de sintomatologia em pacientes diagnosticados com dengue primária e secundária, (12A), formas clínicas Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (12B), Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD I, II e III) (12C), sorotipo viral DENV-1 e DENV-2 (12D).



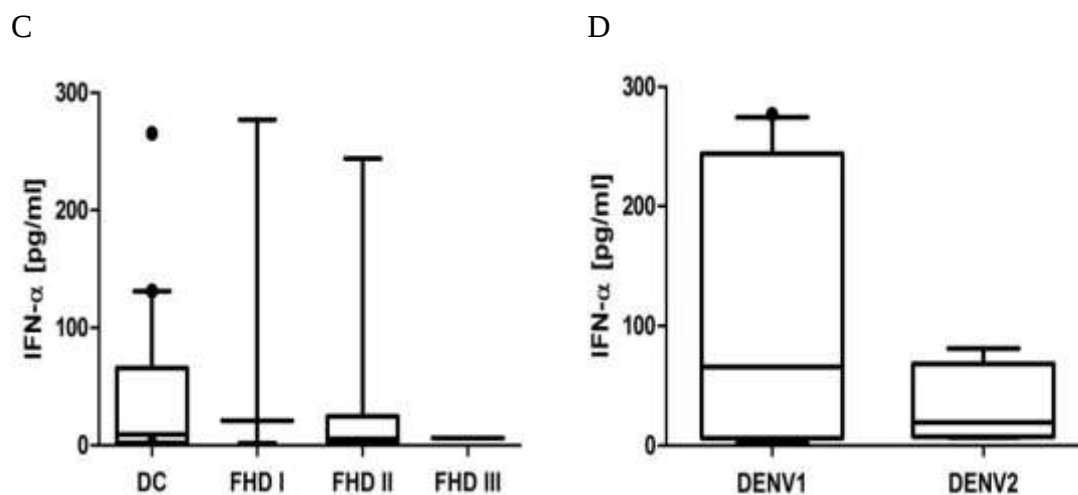


Figura 13: Análise dos níveis séricos de TNF- α entre o 1º ao 2º dia de sintomatologia em pacientes diagnosticados com dengue primária e secundária (13A), formas clínicas Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (13B), Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD I, II e III) (13C), sorotipo viral DENV-1, DENV-2, DENV-3 e sorotipo indefinido (NEG) (13D).

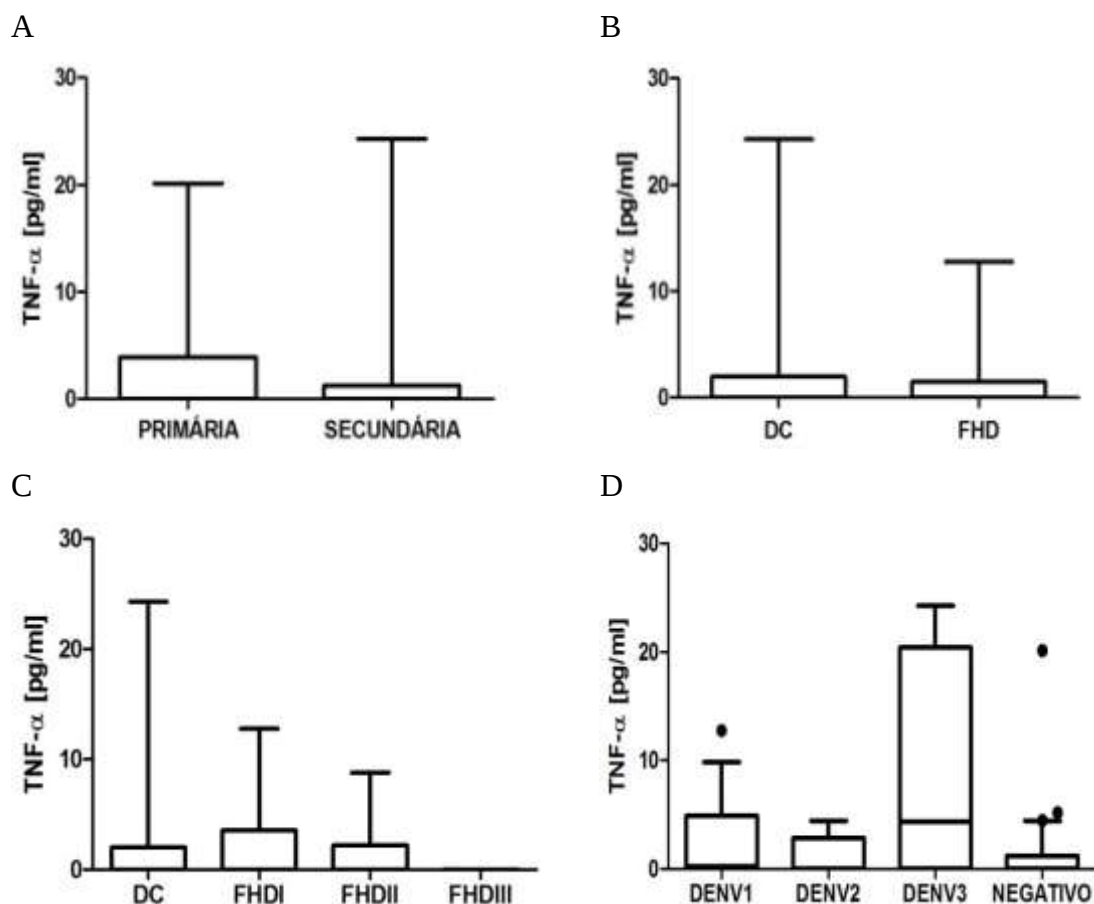
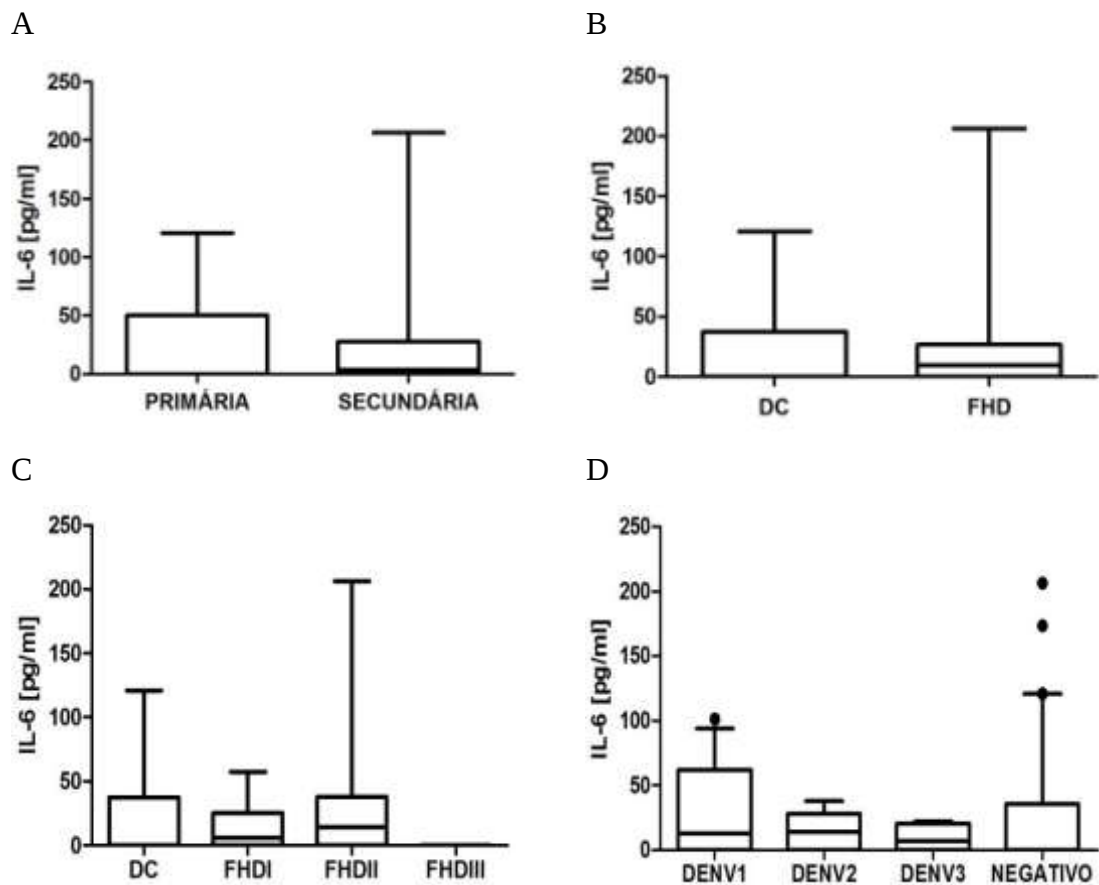


Figura 14: Análise dos níveis séricos de IL-6 entre o 1º ao 2º dia de sintomatologia em pacientes diagnosticados com dengue primária e secundária (14A), formas clínicas Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (14B), Dengue Clássica (DC) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD I, II e III) (14C), sorotipo viral DENV-1, DENV-2, DENV-3 e sorotipo indefinido (NEG) (14D).



6. DISCUSSÃO

A imunopatogênese da dengue ainda não está completamente esclarecida e a identificação de pacientes com risco de desenvolver formas graves da doença é uma constante preocupação. A indefinição acerca do papel do óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias na infecção humana pelo DENV considerando como potencial marcador biológico justifica a realização deste trabalho.

Durante o presente estudo, avaliaram-se os níveis séricos de NO e algumas citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes diagnosticados com dengue em relação às suas diferentes formas clínicas, tipo de infecção e os distintos sorotipos virais, determinando assim o perfil de cada grupo frente a esses marcadores imunológicos. Dentro desse contexto, nossos achados mostram a detecção de maiores níveis de NO em pacientes com Dengue Clássica (DC) nos dias iniciais da sintomatologia reforçando o potencial papel desta molécula no controle da infecção viral. Porém, ao não encontrarmos diferenças nos níveis de NO em tempos posteriores de sintomatologia, sugerimos que o NO sérico não possua potencial prognóstico para formas mais graves da doença (CARVALHO et al., 2014).

Na literatura observa-se que o NO, quando produzido em elevadas concentrações, afeta o tônus vascular e auxilia na amplificação das lesões do endotélio, gerando quadros de síndrome de choque (SANCHEZ et al., 2004). Contudo, esta correlação não se aplica à dengue, em que níveis mais elevados de NO foram detectados no soro de pacientes com formas mais brandas da doença (VALERO et al., 2002), como visto no presente estudo, enquanto que em outro trabalho não se detectou qualquer produção de NO nos pacientes (ESPINA et al., 2003).

No trabalho desenvolvido por Chareonsirisuthigul et al. (2007) foi investigada a associação entre os níveis séricos de NO e carga viral do DENV em infecção secundária abordando a DC primária e a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) secundária. No grupo de FHD secundária, houve detecção de NO e maior nível virêmico nos primeiros dias (febre). No período de defervescência e convalescência, o nível de NO aumentou gradualmente quando, também, o nível de RNA do DENV no plasma diminuiu significativamente. Essa correlação inversa sugere que o NO possa ser um dos fatores do hospedeiro que determina a produção de DENV a partir de células infectadas. A baixa produção de NO encontrada em pacientes com FHD secundária e não na primária, sugere que a teoria ADE possa desempenhar atividade na supressão do NO, pois sua

produção foi suprimida apenas em pacientes com FHD secundária justificando a hipótese de que a presença de anticorpos heterólogos poder interferir na produção de NO sem está relacionada com a gravidade da dengue hemorrágica. Esta produção diferencial de NO na DC e FHD pode estar relacionada com o dano endotelial observada na FHD, tornando o endotélio incapaz de produzir NO, contribuindo para a patogênese vascular da doença (LIN et al., 2002). Contudo, o efeito do NO na dengue é controverso e pode ser relacionado com um determinado período de doença.

Neves-Souza et al. (2005) demonstraram em seu estudo a capacidade apenas do sorotipo DENV-1 em infectar e ativar monócitos de sangue periférico de pacientes com dengue modulando a produção de NO, via ação da iNOS, revelando a importância desta molécula no controle da infecção viral. Em contrapartida, nosso estudo revelou que a produção de NO também é modulada pelos sorotipos DENV-2 e DENV-3, não se limitando apenas ao sorotipo DENV-1.

Mediadores inflamatórios, apesar de envolvidos na geração da doença, aumentando a permeabilidade vascular, também se apresentam como principais moléculas de resposta imunológica contra infecções virais (GUIDOTTI; CHISARI, 2001). A necessidade de realização de estudos como este é devido às controvérsias de dados do papel de NO em infecções por DENV e seus sorotipos virais, além da possibilidade da reemergência de surtos epidêmicos com novas características clínicas devido à falta de memória imunológica da população contra o sorotipo DENV-4.

No trabalho de Carvalho et al. (2014) os pacientes com FHD apresentaram níveis elevados de NS1 em relação aos pacientes com DC. Observou-se durante a fase febril da DC significativo aumento dos níveis séricos de NO e diminuição desses níveis na FHD. Durante a fase de convalescência, não foi detectada diferença nos níveis de NO entre os grupos estudados. Os resultados desse trabalho e do nosso fortalecem o fato de a intensidade de replicação do DENV nos dias iniciais da doença poder influenciar no resultado clínico. As razões para o alto nível de NO na DC e baixo na FHD ainda não são claras, mas danos nas células endoteliais durante a fase aguda (febril) da infecção pelo DENV, com uma consequente falha na enzima eNOS, poderiam estar envolvidos. Por outro lado, uma vez que o NO é uma molécula de funções contraditórias (MOCELLIN et al., 2007; CARVALHO et al., 2014), os níveis aumentados de NO na DC poderiam desempenhar um papel na diminuição da carga viral e alterar a evolução da doença para a sua forma hemorrágica.

Um estudo prévio, realizado por Levy et al. (2010), mostrou que os sorotipos virais possuem níveis similares no grupo de DC e FHD, mensurando que o NO possa estar envolvido na progressão da infecção por dengue independente do sorotipo. Em suma, esses dados presumem que o NO pode contribuir não só para a proteção, como também na patologia pelo DENV dependendo da quantidade produzida a da fase da doença. No presente estudo, mensuramos que o NO é um importante mensageiro, o qual tem sido associado, especialmente, à patogênese de DC por desempenhar atividade antiviral na primoinfecção.

É possível que durante a infecção o efeito benéfico ou deletério seja determinado pela imunidade inata e adaptativa com produção de citocinas em consequência à interação do vírus com seus alvos principais: monócitos, células dendríticas e endoteliais. Para vários vírus o passo inicial para o estabelecimento de infecção é a evasão da resposta antiviral inata fornecida pelo sistema de interferons (IFNs). A ação celular dos IFNs é considerada o início da defesa do hospedeiro durante os primeiros dias de infecção, fase durante a qual a intensidade da replicação viral determina o resultado clínico. O IFN- α e β são secretados por células infectadas que exibem múltiplas propriedades biológicas, incluindo efeitos antiproliferativos, antiviral e imunomodulador. Essas células são os linfócitos T ativados e células NK que tem atividade antiviral direta, através da indução de moléculas efetoras (por exemplo, NO), e indiretamente, através do reforço da apresentação de antígenos e indução de apoptose (DIAMOND et al., 2000). Alguns estudos sugerem que IFN- α e β modulam infecções de membros da família Flaviviridae, entretanto, o trabalho de Lin et al. (1997) identificou um mecanismo inibidor. Além disso, a ação dos IFNs frente ao dengue e aos demais mediadores imunoinflamatórios continua confuso. No trabalho desenvolvido por Kurane et al. (1993) foi encontrado elevado nível de IFN- α no plasma humano logo após o início dos sintomas na DC.

A gravidade da infecção pelo DENV parece dever-se a produção desproporcional de citocinas inflamatórias (CHATURVEDI et al., 2007; WEBSTER et al., 2009) por isso anticorpos heterólogos presentes no plasma também tem sido indicado, com base em observações, que reinfeção por um diferente sorotipo viral aumenta o risco de dengue grave (CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2007). Neste caso, a ativação rápida de reatividade cruzada ativa as células T de memória específica do DENV geradas durante a infecção primária parece provocar uma forte produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFNs, TNF- α e IL-6, que pode danificar

diretamente o endotélio vascular das células, resultando em perda de plasma (MANGADA et al., 2002; WEBSTER et al., 2009).

No nosso estudo observamos a presença de três sorotipos diferentes na mesma população de estudo, porém sem associação com níveis de citocinas circulantes. A detecção aumentada de IFN- α nos pacientes com dengue primária, deste estudo, sugere que os mecanismos de imuno-vigilância envolvidos na primo-infecção estão funcionais nestes pacientes, enquanto que a infecção secundária parece modular negativamente a produção desta citocina, servindo como via de escape para o vírus. No estudo desenvolvido por Becquart et al. (2010) foi demonstrado níveis elevados de IFN- α por toda a fase aguda da doença, em todos os pacientes DENV-2 infectados primariamente (DIAMOND et al., 2000).

O IFN- α , principalmente produzido por células dendríticas e macrófagos (SHRESTA et al., 2004), que é a primeira linha de defesa do hospedeiro, limita a replicação viral. Além de sua ação antiviral, o IFN- α induz a expressão do complexo de histocompatibilidade I, aprimorando a apresentação de antígenos e, assim, desencadear resposta imunitária. Induz também respostas específicas das células CD8⁺ e produção de quimiocinas, que conduzem a ativação de linfócitos e monócitos e o seu recrutamento para locais de inflamação (SAMUEL, 2001). Um trabalho realizado com tailandeses acometidos com DC mostrou elevados níveis de IFN- α apenas nos três primeiros dias de sintomatologia, após o aparecimento da febre (KURANE et al., 1993), dados estes que foram de encontro com os nossos achados confirmando a diferença estatística da DC primária em relação à secundária.

Um estudo em Taiwan sugeriu que pacientes com infecções secundárias pelo DENV-2 apresentaram resposta imune diferenciada com menor níveis de IFN- α , do terceiro ao sétimo dia após o início dos sintomas, associados com o início da FHD (CHEN et al., 2006). Isto mensura que a resposta pró-inflamatória inicial associada com IFN- α pode ser crítica para a patogênese de infecções secundárias pelo DENV-2. No nosso trabalho não foi observada diferença entre os sorotipos analisados. Os tecidos periféricos não linfóides abrigam um grupo de células imaturas de extrema importância como componentes do sistema imunológico, são as chamadas células dendríticas (ROVATI et al., 2008). Perante um processo infeccioso ou inflamatório, essas células reagem iniciando um processo de maturação caracterizado pela produção de citocinas e quimiocinas além da expressão de moléculas de adesão envolvidas no processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T (STEINMAN, 1991). Foi relacionado o

polimorfismo dos promotores nos receptores das células dendríticas com o nível expresso na superfície celular (WANG et al., 2011). Indivíduos com genótipo AG tiveram maior expressão do polimorfismo, maior produção de TNF- α e menor replicação viral em resposta a infecção por DENV. No entanto, o genótipo AA expressou menos receptores na superfície, sendo associado com proteção contra dengue hemorrágica (LOZACH et al., 2005). Os mecanismos exatos pelos quais o DENV escapa da resposta imune através da interação com o promotor das células dendríticas não estão completamente elucidados (VAN KOOYK; GEIJTENBEEK, 2003).

Apesar de especular-se sobre este mecanismo como sendo o responsável pela sobrevivência do vírus no hospedeiro, principalmente pela baixa produção do TNF- α , estudos sobre o papel desta citocina em dengue não são conclusivos. Resultados apontam elevados níveis de TNF- α em formas mais graves da infecção (CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006; GREEN; ROTHMAN, 2006). Porém observa-se que em algumas populações esta correlação entre TNF- α e gravidade da doença não se aplica (PURWATI et al., 2011; ARIAS et al., 2014) assim como foi verificado no presente trabalho, no qual os níveis séricos de TNF- α não se correlacionam com os grupos analisados, são dados irrelevantes. Maiores definições acerca desta associação entre produção de TNF- α e formas clínicas de dengue são necessárias em populações de pacientes constantemente sob o risco de exposição às novas infecções.

Segundo Chareonsirisuthigul et al. (2007) na FHD há níveis aumentados de IL-6, e na DC a produção é significativamente baixa durante o início da infecção. No entanto, tanto pacientes com infecção secundária e pacientes com infecção primária demonstraram alta produção de TNF- α em comparação com indivíduos saudáveis. Estes resultados sugerem que a infecção secundária facilita a síntese de citocinas anti-inflamatórias bloqueando a produção de citocinas Th1. No nosso estudo, nos deparamos com níveis baixos e sem significância estatística nos grupos de dengue primária e secundária, DC e FHD, DC e FHD I, II e III, bem como na análise dos sorotipos virais circulantes na população paraibana. Os níveis séricos de TNF- α na infecção secundária da FHD II, no trabalho de Levy et al. (2010), foram mais elevados em relação aos demais pacientes com dengue. Não houve associação com o sorotipo viral. Níveis séricos elevados de IL-6 foram observados na infecção secundária da FHD grau II, sugerindo participação na forma grave da dengue, e na infecção pelo DENV-4.

O TNF- α tem potencial função como indutor patológico de alterações na dengue. Este mediador pode induzir apoptose e mediar lesão endotelial durante a doença

(ESPINA et al., 2003). No entanto, como a indução de apoptose pode representar um efeito indireto de TNF- α para diminuir a descendência viral (KOYAMA et al., 2000), um efeito benéfico desse mediador não pode ser descartado. O TNF- α , indiretamente, também pode induzir danos através da indução da produção de IL-6 (ANDERSEN; PEDERSEN, 2008). Neste contexto, os níveis mais altos desta citocina foram observados em crianças asiáticas com Síndrome do Choque da Dengue (SCD), e uma correlação entre a gravidade da doença e os níveis séricos de IL-6 em adultos. Os dados sobre a importância da IL-6 na infecção pelo DENV também são conflitantes. No entanto, alta concentração de IL-6 pode ter implicações em várias patologias, especialmente na FHD e SCD. Esta citocina induz aumento da produção sistêmica de anti-plaqueta, auto-anticorpos e deficiência de coagulação, resultando em hemorragia e extravasamento de plasma (RACHMAN; RINALDI, 2006). No entanto, os níveis de TNF- α e IL-6, neste presente trabalho, não mostrou padrão associativo com DC ou FHD.

Tendo em vista as incertezas em torno dos fatores que determinam a evolução da DC em FHD, várias hipóteses têm sido levantadas ligadas ao vírus, aos indivíduos ou a fatores genéticos. O nível de evidências existentes ainda não permite formar um quadro completo da imunopatogênese do problema, indicando a necessidade premente de investigações nessa direção. Portanto, continuar a avaliar a capacidade das células sanguíneas de produzir NO e citocinas pró-inflamatórias como marcador biológico é de suma importância para que sejam providos os devidos cuidados clínicos e terapêuticos ao paciente.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente estudo investigou de forma descritiva e análoga os níveis séricos de NO e citocinas pró-inflamatórias frente a formas clínicas de dengue, tipo sorológico do vírus e dias de sintomatologia específica da doença, de onde foram utilizados dados secundários obtidos por meio de revisão de prontuários.

Entre os grupos analisados, foi encontrada diferença significativa de NO em pacientes com DC quando comparados aos com FHD, sendo os demais dias de sintomatologia isentos de diferença estatística.

Na quantificação de citocinas pró-inflamatórias foi encontrada diferença apenas para o IFN- α entre o primeiro e segundo dia de sintomas.

Os dados sugerem que a quantificação sérica do NO e citocinas pró-inflamatórias na população estudada não auxilia como determinação de marcador biológico de dengue para formas graves da doença.

À medida que é esclarecido sobre as características biológicas da infecção pelo DENV, um objetivo permanente é relacionar esse conhecimento com as características clínicas da doença. O desafio é desmistificar a imunopatogênese da dengue, em sua complexidade, a fim de prevenir e controlar seu agravamento para formas graves. Mais estudos devem ser realizados para melhor compreensão do equilíbrio entre estes mediadores imunológicos circulantes e os seus efeitos sobre o desenvolvimento da doença.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ALLEN, B. W. et al. Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. **Journal of Applied Physiology**, Washington, US, v. 106, n. 2, p. 662-667, 2009.

ANDERSEN, K.; PEDERSEN, B. K. The role of inflammation in vascular insulin resistance with focus on IL-6. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, DE, v. 40, n. 9, p. 635-639, 2008.

ANTUNES, A. C. et al., Evaluation of the diagnostic value of the tourniquet test in predicting severe dengue cases in a population from Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, BR, v. 46, n. 5, p. 542-546, 2013.

ARIAS, J. et al. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. **Virology**, New York, US, v. 42, n. 51, p. 42-51, 2014.

AZEREDO, E. L. et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever, **Immunology**, [S. l.], v. 130, n. 2, p.202-216, 2010.

BARACHO, R. C. M. et al. A influência climática na proliferação da dengue na cidade de Areia, Paraíba. **Gaia Scientia**, [S. l.], v. 8, n. 1. p. 65-73, 2014.

BARBOZA, M. M. O. **Caracterização genômica do sorotipo 1 de vírus dengue isolados no Ceará no ano de 2011**. 72f. Dissertação (Mestrado em Patologia)-Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2013.

BARRETO, M. L.; TEXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, São Paulo, BR, v. 22, n. 64, p. 64, 2008.

BARRETO, M. L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, London, GB, v. 28, n. 337, p. 1877-1889, 2011.

BECQUART, P. et al. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. **BioMed Central Infectious Diseases**, London, US, v. 10, n. 356, p. 2-11, 2010.

BETHELL, D. B. et al. Pathophysiologic and Prognostic Role of Cytokines in Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, JP, v. 177, n. 3, p.177:778-782, 1998.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, GB, v. 496, p.504-507, 2013.

BORDEN, E. C. et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nature Review Drug Discovery**, London, GB, v. 6, n. 12, p. 975-990, 2007.

BRAGA, E. L. et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, BR, v. 96, n. 2, p.229-232, 2001.

BRAGA, I. A.; VALLE D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, Brasília, DF, v. 16, n. 2, p.113-118, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/denguemanejo_adulto_crianca__4ed_2011.pdf. Acesso em: 23 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Governo da Paraíba, Saúde**. Disponível em: <http://www.paraiba.pb.gov.br/95987/obitos-por-dengue-tem-reducao-de-5295-na-paraiba-em-2014.html>. Acesso em: 21 jan. 2015a.

BRASIL, **Portal da Saúde**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/16192-casos-de-dengue-caem-59-e-obitos-40-em-2014>. Acesso em: 02 fev. 2015b.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annual Reviews of Biochemistry**, Paulo Alto, US, v. 63, p.175-95, 1994.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, US, v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007.

CARVALHO, D. M. et al. Elevated Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Serum Levels and Altered Toll-Like Receptor 4 Expression, Nitric Oxide, and Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Dengue Hemorrhagic Fever Patients. **Journal of Tropical Medicine**, London, GB, v. 2014, p.1-9, 2014.

CENTER OF DISEASE CONTROL (CDC). **HealthMap - DengueMap**. Disponível em: <<http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>>. Acesso em: <3 jul.2014.

CHAKRAVARTI, A.; KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factoralpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, IN, v. 123, n. 1, p.25-30, 2006.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines,

but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 88, p.365-375, 2007.

CHARNSILPA, W. et al. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. **Journal of Medical Virology**, London, GB, v. 77, n. 1, p.89-95, 2005.

CHATURVEDI, U. C. et al. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 28, n. 3, p.183-188, 2000.

CHATURVEDI, U. C. et al. Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 285-299, 2007.

CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance?. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, Amsterdam, NL, p.9-24, 2009.

CHEN, Y. C.; WANG, S. Y. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 76, n. 19, p.9877-9887, 2002.

CHEN, L. C. et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 74, n. 1, p. 142-147, 2006.

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

CHIARAVALLOTI, N. F. et al. O programa de controle do dengue em São José do Rio Preto, SP: dificuldades para a atuação dos agentes e adesão da população. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, BR, v. 23, n. 7, p.1656-64, 2007.

CHICOINE, L. G. et al. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, US, v. 287, n.1, p.60-68, 2004.

CLOSS, E. I. et al. Plasma membrane transporters for arginine. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, US, v. 134, p.2752-2759, 2004.

CLYDE, K. et al. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**, Washington, US, v. 80, n. 23, p.11418-11431, 2006.

COGGINS, M. P.; BLOCH, K. D. Nitric oxide in the pulmonary vasculature. **Journal of American Heart Association**, [S. l.], v. 26, p.1877-1885, 2007.

CYLWIK, D. et al. L-arginine and cardiovascular system. **Pharmacological Reports**, Krakow, PL, v 57, n.1, p.14-22, 2005.

DATTA, S.; WATTAL, C. Dengue NS1 antigen detection: A udeful tool in early diagnosis of dengue virus infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, IN, v. 28, n. 2, p.107-110, 2010.

DIAMOND, M. S. et al. Modulation of Dengue Virus Infection in Interferons Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 74, n. 11, p.4957-4966, 2000.

DIAS, Juarez Pereira. **Avaliação da efetividade do Programa de Erradicação do Aedes aegypti. Brasil, 1996-2002**. 2006. 80f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, BR, v. 11, n. 2, p.259-272, 2002.

DUSSE, L. M. S. A. et al. Does plasma nitric determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, NL, v. 362, n. 1, p.195-197, 2005.

ENDY, T. P. et al. Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of priarmy school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, US, v. 5, n. 3, p. 975, 2011.

ESPINA, L. M. et al. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 68, n. 1, p.48–53, 2003.

FAHEEM, M. et al. A molecular evaluation of dengue virus pathogenesis and its latest vaccine strategies. **Molecular Biology Reports**, Basel, CH, v. 38, n. 6, p.1-10, 2010.

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

FINKEL, F.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, London, GB, v. 408, n. 6809, p.239-247, 2000.

FREITAS, Rafael Maciel de. **Sobrevivência e dispersão de fêmeas de Aedes aegypti no Rio de Janeiro**. 2006. 139f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, New York, US, v. 126, n. 1, p.131-136, 1982.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, GB, v. 19, n. 5, p.429-36, 2006.

GROSS, R. et al. Mechanisms involved in the effect of nitric oxide synthase inhibition on L-arginine-induced insulin secretion. **British Journal of Pharmacology**, London, GB, v. 120, n. 3, p.495-501, 1997.

GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International, v. 11, n. 3, 1997.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, US, v. 11, n. 3, p.480-496, 1998

GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F. V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, US, v. 19, p.65-91, 2001.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, New York, US, v. 2, n. 1, p.33-42, 2002.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, London, GB, v. 8, p.7-16, 2010.

HALSTEAD, S. B. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, US, v. 42, n. 5, p.350-362, 1970.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, Tokyo, JP, v. 146, n. 1, p.201-217, 1977.

HALSTEAD, S. B. Dengue vaccine development: a 75% solution?. **Lancet**, London, GB, v. 380, n. 9853, p.1535-1536, 2012.

HOTTZ, E. et al. Platelets in Dengue Infection. **Drug Discov. Today Disease Mechanisms**, Oxford, GB, v. 8, n. 1-2, p.33-38, 2011.

JONES, M. R. et al. Roles of interleukin-6 in activation of STAT proteins and recruitment of neutrophils during Escherichia coli pneumonia. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 193, n. 3, p.360-9, 2006.

JUFFRIE, M. et al. 2001. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secret phospholipase A2. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, n. 65, n. 1, 70-75, 2001.

KELM M. Nitric oxide metabolism and breakdown. **Biochim Biochimica and Biophysica Acta (BBA)**, Amsterdam, NL, v. 1411, n. 2-3, p.1411:273-289, 1999.

KENDALL, H. K. et al. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Diseases**, Houndmills, US, v. 7, n. 1, p. 2-10, 2001.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, US, v. 88, n. 6, p.1157-1162, 2010.

KOYAMA, A. H. et al. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. **Microbes and Infection**, Paris, FR, v. 2, n. 9, p.1111–1117, 2000.

KURANE I. et al. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 48, n. 2, p. 222-229, 1993.

LEI, H. Y. et al. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 257, n. 1, p.1-9, 2008.

LEVY, A. et al. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, GB, v. 104, n. 1, p.16–23, 2010.

LIEW, F.Y; COX, F.E. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. **Immunology Today**, Cambridge, GB, v. 12, n.3, v.12, p.17-21, 1991.

LIEW, F.Y. et al. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, DE, v. 21, n. 10, p.2489-2494, 1991.

LIN, Y. et al. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 71, n. 7, p. 5227–5235, 1997.

LIN, C. F. et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. **Journal of Immunology**, Baltimore, US, v. 169, n. 2, p. 657-664, 2002.

LIU, J. W. et al. Dengue hemorrhagic fever in Taiwan. **Dengue Bulletin**, [S. l.], v. 27, p.19-24, 2003.

LOZACH, P. Y. et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, US, p. 23698-23708, 2005.

MACKENZIE, J. S. et al. Emerging flaviviruses: The spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, New York, US, v. 10, p.98-109, 2004.

MALAGRIS, L. E. N. **A via L-arginina-óxido nítrico e o controle do stress em pacientes com hipertensão arterial sistêmica**. 119f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental), Centro Biomédico da Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

MALAVIGE G. N. et al. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, Oxford, GB, v. 80, p.588-601, 2004.

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

MANGOLD, K. A.; REYNOLDS, S. L. A review of dengue fever: resurging tropical disease, **Pediatric Emergency Care**, Baltimore, US, v. 29, n. 5, p. 665-669, 2013.

MARTINA, B. E. E. et al. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, US, v. 22, n. 4, p.564, 2009

MARTÍNEZ, M. C. ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanism and potential significance in health and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 669-702, 2009.

MARTÍN, J. L. et al., The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 82, n. 2, p. 128-135, 2010.

MATSUURA, C. et al. Nitric oxide activity in platelets of dengue haemorrhagic fever patients: the apparent paradoxical role of ADMA and l-NMMA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, GB, v. 106, n. 6, p.174-179, 2012.

MCBRIDE, W. J. H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection**, Paris, FR, v. 2, n. 9, p. 1041-1050, 2000.

MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, US, v. 100, n. 12, p.6986-6991, 2003.

MOCELLIN, S. et al. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities, **Medicinal Research Reviews**, New York, US, v. 27, n. 3, p.317–352, 2007.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role on vascular biology. **British Journal pharmacology**, London, GB, v. 27, n. 3, p.213-254, 2006.

MORRIS JR, S. M. Enzymes of arginine metabolism. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, US, v. 134, n. 10, p.2743-2747, 2004.

MOSS, M. B. **Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em hipertensão e insuficiência renal crônica**. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

NAPOLI, C; IGNARRO, L. J. Nitric oxide and pathogenic mechanism involved in the development of vascular diseases. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, KR, v. 32, n. 8, p.1103-1108, 2009.

NEVES SOUZA, P. C. F. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 64, p.1-12, 2005.

NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virology Journal**, Seoul, KR, v. 6, n. 211, p.1-7, 2009.

NOBRE, P. et al. Previsibilidade climática sobre o nordeste e os recursos hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, [S.l.], 2004.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, BR, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). Alternativas para La 1a prevención y control del dengue hemorrágico en los países de centroamérica. **Revista**, [S.l.], v. 54, n. 3, 1995.

PACHER, P. et al. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, US, v. 87, n. 1, p.315-324, 2007.

PAGNI, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Evasion of the human innate immune system by dengue virus. **Immunologic Research**, Basel, CH, v. 54, n. 1-3, p. 152-159, 2012.

PAULA, S. O. FONSECA, B. A. L. Dengue: A Review of the laboratory test a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Brazilian Journal of infectious Diseases**, Salvador, BR, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, London, GB, v. 8, n. 12, p. 30-38, 2010.

PEREZ, A. B. et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, New York, US, v. 71, n. 11, p. 1135-1140, 2010.

PRIYADARSHINI, D. et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. **PLoS One**, San Francisco, US, v. 5, n. 1, p. 8709, 2010.

PURWATI et al. The relation between levels of TNF-a, IL-1b, PGE2 and PLA2 with the severity degree of dengue hemorrhagic. **Microbiology Indonesia**, [S.l.], v. 5, n. 12, p. 51-55, 2011.

QUINTANILHA, A. C. F. **Caracterização clínica e epidemiológica de casos de dengue internados em hospital público de Campo Grande – MS**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) - Faculdade de

Medicina Drº Hélio Mandetta, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2010.

RACHMAN, A.; RINALDI, I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. **Acta Medica Indonesiana**, [S.l.], v. 38, n. 2, p. 105-108, 2006.

RANJIT, S.; KISSOON, N. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. **Pediatric Critical Care Medicine**, Baltimore, US. v. 12, n. 1, p. 90-100, 2011.

REHER, V. G. S. **Análise da concentração do óxido nítrico na saliva de indivíduos portadores de doença periodontal**. 96f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)-Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Minas Gerais, 2005.

ROJAS, E. M. et al. Association between glutathione peroxidase levels and clinical manifestations of dengue. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 135, n. 6, p. 743-750, 2007.

ROSEN, L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 26, n. 3, p. 337-343, 1977.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, US, n. 113, n. 7, p. 946-951, 2004.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunity**, London, GB, v. 15, n. 11, p. 532-543, 2011.

ROVATI, B. et al. Flow cytometric detection of circulating dendritic cells in healthy subjects. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, IP, v. 52, n. 1, p. 45-52, 2008.

SAMUEL, C. E. Antiviral actions of interferons. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, US, v. 14, n. 4, p. 778-809, 2001.

SANCHEZ, A. et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 78, n. 19, p.10370-10377, 2004.

SAURA, M. et al. Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor_Β during activation of inducible nitric oxide synthase transcription. **Journal of Molecular Biology**, London, GB, v. 289, n. 3, p. 459-471, 1999.

SEET, R. C. et al. Oxidative damage in dengue fever. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, US, v. 47, n. 4, p. 375-380, 2009.

SHARMA, J. N. et al. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, Dordrecht, NL, v. 15, n. 6, p. 252-259, 2007.

SHRESTA, S. et al. Interferondependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 78, n. 6, p. 2701-2710, 2004.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, p.642-650, 2004.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **New England Journal of Medicine**. Boston, US, p. 1423-1432, 2012.

SLOAN-LANCASTER, J.; ALLEN, P. M. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, US, v. 14, p. 1-27, 1996.

SOMMER, C; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain apud BEAULIEU, P. et al. **Pharmacology of Pain, Seattle, IASP Press, [S.l.]**, p. 279-302, 2010.

SOUZA, I. C. A. et al. Modelagem da Incidência do Dengue na Paraíba por Modelos de Defasagem Distribuída. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, BR, v. 23, n. 11, p. 2623-2630, 2007.

SRIKIATKHACHORN, A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford, US, v. 102, n. 6, p.1 042-1049, 2009.

STARK, G. R. et al. How cells respond to interferons. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, US, v. 67, p. 227-264, 1998.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, US, v. 9, p. 271-96, 1991.

SUKATHIDA, U. et al. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. **Virology**, New York, US, v. 376, n. 2, p. 290-296, 2008.

SUKUPOLVI-PETTY, S. et al. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes, **Journal of Virology**, Washington, US, v. 81, n. 23, p. 12816-12826, 2007.

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Dengue: recent advances in biology and current status of translational research. **Current Molecular Medicine**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 152-173, 2009.

TAKHUMPANYA, R. et al. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 87, p. 3003-3011, 2006.

TATSCH, Etiane. **Desenvolvimento e validação de um método automatizado para a quantificação dos níveis séricos de nitrito/nitrato**. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, [S.l.], v. 25, p. 07-18, 2009.

TEMPORÃO, J. G. et al, Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, US, v. 17, n. 5, p. 938-939, 2011.

TEO, D. et al. Is dengue a threat to the blood supply?. **Transfusion Medicine**, Oxford, GB, v. 19, n. 2, p. 66-77, 2009.

TORRES, Eric Martinez. **Dengue**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. 344p.

TRICOU, V. et al. Comparison of two dengue NS1 Rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses, **BMC Infectious Diseases**, London, US, v. 10, n. 142, p. 1-8, 2010.

TRIPATHI P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 51, n. 3, p. 443-452, 2007.

UBOL, S. et al. Mechanisms of Immune Evasion Induced by a Complex of Dengue Virus and Preexisting Enhancing Antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 201, n. 6, p. 923-935, 2010.

VALERO, N. et al. Short Report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 66, n. 3, p.762-764, 2002.

VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nature Reviews Immunology**, London, GB, v. 3, n. 6, p. 697-709, 2003.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 176, n. 2, p. 322-330, 1997.

VERREY, F. et al. The SLC7 family of amino acid transporters. **Molecular aspects of medicine**, Elmsford NY, US, v. 34, n. 2-3, p. 532-42, 2004.

VOORHAM, J. M. S. Een mogelijk vijfde serotype van het denguevirus. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, Amsterdam, NL, v. 158, p. 1-4, 2014.

WATI, S. et al. Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) stimulation of cells with established dengue virus type 2 infection induces cell death that is accompanied by a reduced ability of TNF-alpha to activate nuclear factor kappaB and reduced sphingosine kinase-1 activity. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 92, p. 807-818, 2011.

WANG, L. et al. Implications of dynamic changes amongst TNF α , membrane TNF receptor and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 77, n. 2, p.297-302, 2007.

WEBSTER, D. P. et al. Progress towards a dengue vaccine. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, US, v. 9, n. 11, p.678-687, 2009.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**. Kidlington, GB, v. 29, n. 42, p.7221- 7228, 2011.

WHO, Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment and Control. **World Health Organization**, 1997.

WHO, Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. **World Health Organization**, 2009.

WHO, Dengue and severe dengue. **World Health Organization**, 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em:12 dez. 2014.

YAMAGUCHI, Y. et al. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. **Nitric Oxide**, Orlando, US, v. 15, n. 4, p. 380-386, 2006.

YAP, G. et al. Use of Saliva for Early Dengue Diagnoses. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, US, v. 5, n. 5, p.01-07, 2011.

YEN, Y. T. et al. Enhancement by Tumor Necrosis Factor Alpha of Dengue Virus-Induced Endothelial Cell Production of Reactive Nitrogen and Oxygen Species Is Key to Hemorrhage Development. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 24, p.12312-12324, 2008.

ZHANG, Cuihua. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic research in cardiology**, Darmstadt, DE, v. 103, n. 5, p. 398-406, 2008.

APÊNDICE A

SERUM LEVELS OF EVALUATION OF NITRIC OXIDE AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS DIAGNOSED WITH DENGUE IN PARAIBA

Autores: Camila Marques Queiroz^{1,3}, Ana Isabel Vieira Fernandes^{1,2}, Joelma Rodrigues de Souza^{1,4}, Fábio André Brayner dos Santos³, Marli Tenório Cordeiro³, Lúcio Roberto Cançado Castellano¹, Luiz Carlos Alves³.

¹Grupo de Estudos e Pesquisas em Imunologia Humana, Escola Técnica de Saúde da UFPB, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

²Setor de Doenças Infectocontagiosas, Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

³Departamento de Parasitologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM-FIOCRUZ – Brasil.

⁴Departamento de Fisiologia e Patologia, CCS, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

#Endereço para correspondência: Camila Marques Queiroz

Departamento de Parasitologia - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz - Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária – Recife - PE – Brasil.

CEP: 50670-901

Telefone: (81) 2126-8527. E-mail cmilacg@hotmail.com

Fábio André Brayner dos Santos

Departamento de Parasitologia - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz - Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil.

CEP: 50670-420 Caixa Postal: 7472

Telefone: (81) 2101-27823. E-mail: brayner@cpqam.ficoruz.br

ABSTRACT

The aim of the study was to compare serum levels of nitric oxide (NO), IFN- α , IFN- β , TNF- α and IL-6 in patients infected with dengue and evaluate them as potential biological marker for severe cases of dengue. The NO dosage level was evaluated by Griess method and the cytokines by ELISA, following the instructions in each kit. As findings, there was no difference in serum levels of NO in patients with Classical Dengue (DC) or Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), primary or secondary infection or even between different serotypes. Analyzing the results at specific times of the symptoms was observed that up to 02 days initial, higher levels of NO were detected in DC patients compared to patients with DHF. No difference was found in later times of symptoms. By the 5th day of symptoms, patients infected with DENV-3 serotype showed a trend in higher levels of NO than other serotypes. There was no difference TNF- α in the dosage between groups. It was observed IFN- α difference between patients with primary dengue fever in relation to the secondary dengue. The IFN- β dosage was performed, but there were no detected minimum serum levels of this cytokine. We observed the movement of three different serotypes in the same study population, but no association with levels of circulating cytokines. The data suggest that the serum quantification of NO and inflammatory cytokines in this population does not help to determine biological marker for severe forms of dengue disease.

Keyword: Dengue. Nitric oxide. Cytokines. Viral serotype.

INTRODUCTION

Dengue is the main arbovirus infection that affects humans constitutes a serious public health problem worldwide due to its rapid spread and high ability to cause morbidity and mortality. It is a reemerging disease with over 2.5 billion people living in transmission risk areas (1). The infection is caused by one of four serotypes of dengue virus (DENV-1, -2, -3, -4) (2,3), resulting in a broad clinical spectrum, depending on the host immune response, which is usually documented by asymptomatic infection or undifferentiated fever, called Classical Dengue (DC), and more rarely by severe forms well defined as Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS) (4,5). The transmission of arbovirus infection is caused by the mosquito *Aedes* genus in urban and semi-urban areas, where the environment favors the development and spread

of this vector (6). Immunopathology of Dengue and the factors that encourage progression to severe clinical disease are undefined. Almost 50% of infections are known to be clinically silent infection and about 5-30% of the cases the disease can be commonly referred to as severe DHF / DSS (7,8). Nitric oxide (NO) is an important indicator used by different cell types and produced by a variety of body cells and, even today, is considered one of the most important discoveries in medicine mainly for its endothelium-derived relaxing factor. Although the initial studies focus on the role of NO in the regulation of vascular tone, it was soon realized that this molecule had a wide importance in pathological and physiological actions in humans (9). Its production is stimulated by a variety of cells when exposed to antigenic stimulation and inflammatory, antiviral, endotoxin and cytokines such as interleukin (IL)-6, interferon (IFN) and tumor necrosis factor (TNF) (10). Due to the important biological role played by NO and proinflammatory cytokines, measurement of serum levels in order to elucidate their involvement in endothelial dysfunction in the pathogenesis of DC and DHF is relevant. The data suggest that serum quantification of NO and inflammatory cytokine it may not be considered as possible biomarker for severe forms of dengue disease.

MATERIALS AND METHODS

Study population: This study used secondary data obtained through chart review of patients diagnosed with dengue, at the Service of Infectious Diseases, University Hospital Lauro Wanderley the Federal University of Paraíba (DIC / HULW / UFPB), obtained from previously collected material, between the years 2009-2011, Dengue cases were classified as DF or DHF according to the 1997 World Health Organization (WHO) (11). DC infected patients 131 had symptoms and confirmatory laboratory tests and 176 DHF. In DC, 55 patients are primary and 76 secondary infection. In DHF, 77 patients with primary infection, 99 with secondary, 18 FHD I, II and 16 FHD III. Then were divided into groups according to the serotype, 90 DENV-1, DENV-2 101, 66 DENV-3 e 50 indefinite rating (NEG) when not detected serotype.

Blood Samples Collection and Processing: Blood samples were obtained by spontaneous demand at the time of medical consultation and patients signed an Informed Consent and Informed (IC). Five milliliters were collected from peripheral

blood in tube without anticoagulant and gel separator coagulation activator, the first sample being collected in the medical care of the day and the other during the hospital stay the same. After the collection was serum separation by centrifugation 720 x g for 30 minutes and stored at -80 until further use.

Characterization of serotype: Detection of viral RNA was determined by polymerase amplification reaction, preceded by RT-PCR followed by a semi-nested PCR using primers (primers) universal dengue virus based on the 5' non-coding the discriminant four serotypes. The RT-PCR products (RNA) were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel with ethidium bromide.

Serum Nitric Oxide Measurement: The concentration of NO in serum samples was indirectly measured by determining both nitrate and nitrite levels. Total serum NO was measured by utilizing a nitric oxide ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) assay kit Griess reaction (12). Were separated 50µL and incubated with 50µL of reducing nitrate solution (5 mg / mL NADPH, 0.5 M KH_2PO_4 , 1 U / 100mL nitrate reductase) (Sigma) for 18 hours at 4 °C. After incubation, 100µl of Griess reagent solution (Griess Reagent System kit, Promega) was added to the samples in reduction of nitrate solution and nitrite concentration was obtained by comparing the detected levels of the filter microplate reader at 540 nm (GloMaxi Multi Reader, Promega) with the standard curve obtained from known concentrations of sodium nitrate (NaNO_3) provided in the kit.

Serum pro-inflammatory cytokines measurement: was used for the ELISA technique kits, Human interferon α (αIFN) ELISA kit (BioSource), VeriKine HSTM Human IFN- β Serum ELISA kit (PBL Interferon Source) Set, BD Pharmingen TM Human IL-6 and BD OptEIATM Set Human TNF the instructions of each manufacturer. The absorbance values of the samples were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 software. The samples serum were obtained from peripheral blood even used for examinations.

Statistical analyses: All data were scanned into Excel spreadsheets software - 2007. These were moved to the statistical program Graph Pad Prism, version 5.0. The information obtained from the quantification of immune mediators, the medians were demonstrated between the groups and measured their significance for each analysis. The Mann-Whitney tests were used (02 groups) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn

(03 groups or more) for nonparametric data. The p-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

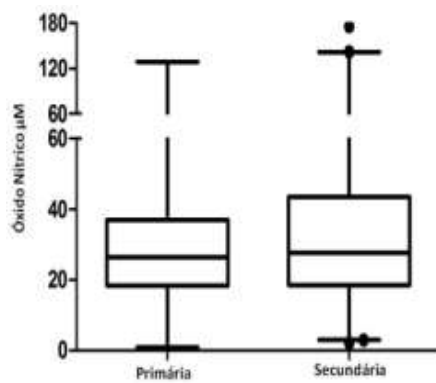
A total of 307 individuals diagnosed with dengue was selected for the study. The sera were divided into groups according to clinical findings. Of these samples, 131 had symptoms and confirmatory laboratory tests for Classical Dengue (DC) and 176 Dengue Hemorrhagic Fever (DHF). In DC, 55 patients are primary and 76 secondary infection. In DHF, 77 patients with primary infection, 99 with secondary, 18 FHD I, II and 16 FHD III. Then were divided into groups according to the serotype, 90 DENV-1, DENV-2 101, 66 DENV-3; 50 indefinite rating (NEG) when not detected serotype.

Nitric oxide (NO): the general analysis when comparing patients diagnosed with dengue, taking into account the type of infection in primary and secondary, there was no statistical difference between the serum levels of NO (Figure 1A). For the analysis performed with groups of DC clinical forms, FHD I, II and III there was no statistical difference between the serum levels of NO (Figure 1B). We compare groups of different clinical forms taking into consideration the type of primary and secondary infection, there were no statistical difference between the serum levels of NO (Figure 1C). When we compared the groups for DENV-1 serotypes, DENV-2, DENV-3 and undefined serotype (NEG), no significant difference between serum levels of NO (Figure 1D). In the analysis of quantification of NO between the 1st and 2nd day of symptoms in primary and secondary dengue was observed higher levels of NO in patients with primary infection (Figure 2A) and, especially, when the analysis was performed comparing the DC groups with DHF was statistically significant difference, $p = 0.0048$ (Figure 2B). From the 3rd to 5th day of symptoms the analysis of quantification of NO in primary and secondary infection such groups, no significant difference in serum levels (Figure 3A). In the analysis in groups of clinical forms DC, FHD I, II and III also found no statistically significant difference between the serum levels of NO (Figure 3B). Considering the analysis of the DENV-1 serotypes, DENV-2 and DENV-3 in the clinical forms DC and FHD a trend was observed in higher levels of NO in DENV-3 serotype both in DC and in clinical form FHD (Figure 3C). When comparing the groups

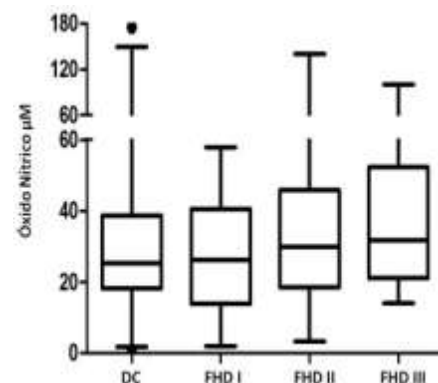
for DENV-1 serotypes, DENV-2 and undefined serotype (NEG) there was no statistical difference between the serum levels (Figure 3D). The 5th to 7th day of symptoms, analysis of the quantification of NO of dengue patients showed no statistically significant differences between any groups evaluated as indicated (Figure 4), as well as analysis from the 7th to 28th day of symptoms was not observed difference between these two groups (Figure 5).

Pro-inflammatory cytokines: between 1 and 2 days of symptoms in primary and secondary dengue, a higher level was observed, compared to the clinical presentations of IFN- α . There was statistical difference between patients with primary and secondary dengue, with higher production in the primary infection, verifying statistically significant difference with $p = 0.0409$ and standard ELISA curve with correlation coefficient $r^2 = 0.993$. This finding is of great clinical importance since the cases of secondary dengue usually present with more severe than those of primary dengue (Figure 6A). No difference in IFN- α production profile when analyzed according to the patients clinical forms grouped into DC and DHF (Figure 6B), and AD severity of DHF I, II and III (Figure 6C), and DENV-1 and DENV-2 serotypes (Figure 6D). In the analysis of quantification pro-inflammatory cytokines between the 1st and 2nd day of symptoms, low concentrations of TNF- α was detected. However there was no difference between groups: primary or secondary dengue (Figure 7A), DC and DHF (Figure 7B), DC and FHD I, II, III (Figure 7C) and viral serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3 and NEG (Figure 7D). These results about the TNF- α levels between groups does not make clear the role of this cytokine in dengue infection. The pattern of the curve showed the correlation coefficient $r^2 = 0.996$. By analyzing the quantification of IL-6, between the 1st to the 2nd day of symptoms, there was no statistically significant difference between primary and secondary dengue (Figure 8A), DC and FHD (Figure 8B), DC and FHD I, II and III (Figure 8C). However, the quantification of IL-6 in the DENV-2 serotype group showed a tendency to be increased. The dosage of IFN- β although it was performed was not detected minimum serum levels of this cytokine.

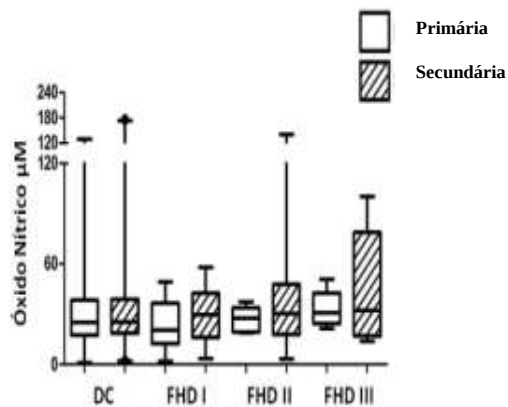
A



B



C



D

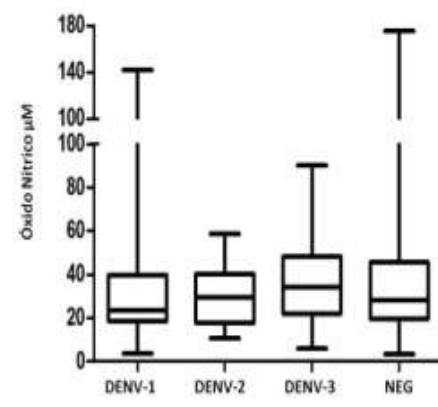
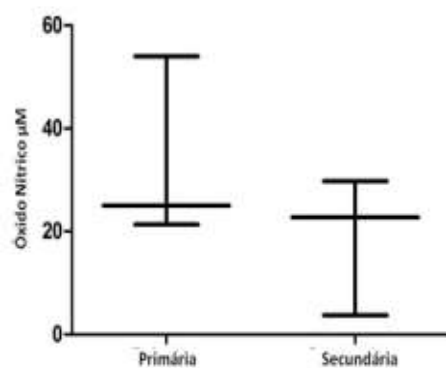


Figure 1: Analysis of serum levels of nitric oxide (NO) in patients diagnosed with primary and secondary dengue (1A) clinical forms Classical Dengue (DC), Dengue Hemorrhagic Fever (DHF I, II, III) (1B) type of primary and secondary infection in Classical Dengue (DC) and Hemorrhagic Fever Dengue (DHF I, II, III) (1C), serotype (1D).

A



B

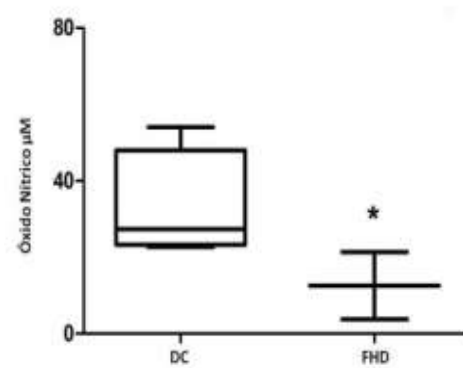


Figure 2: Analysis of serum levels of nitric oxide (NO) between the first and second day of symptoms in patients diagnosed with primary and secondary dengue (2A), Classical Dengue (CD) and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) (2B).

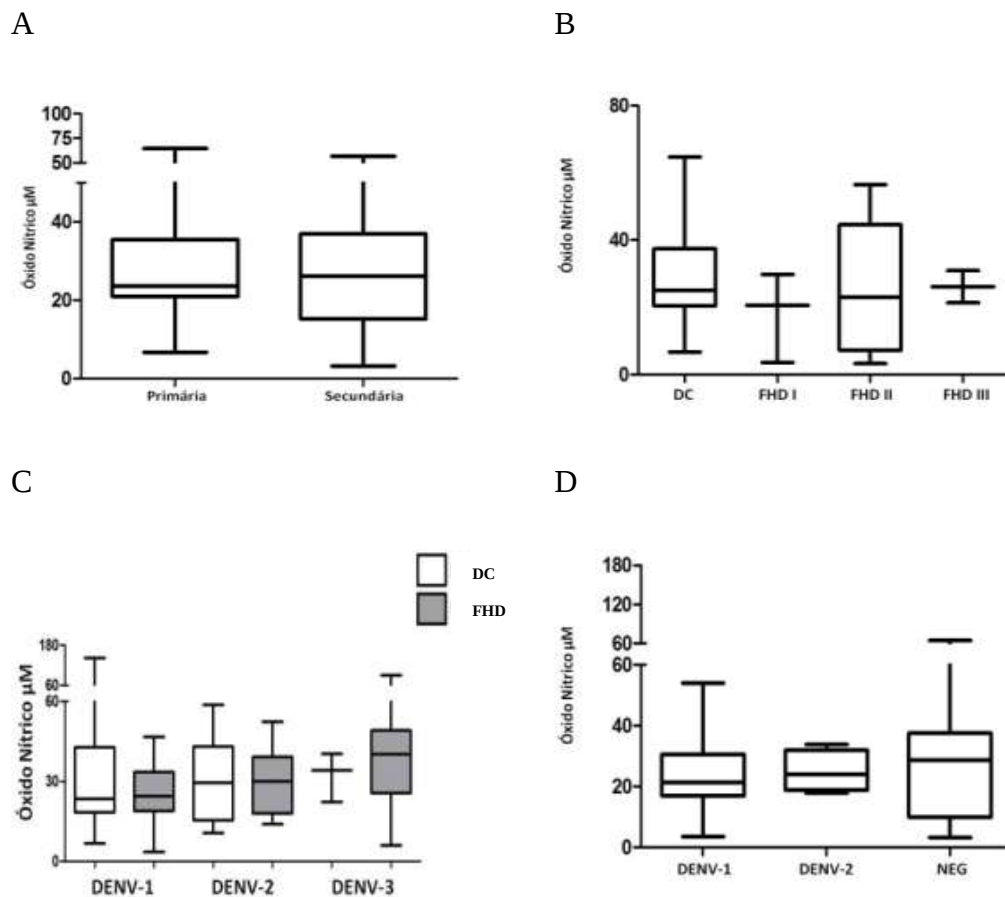
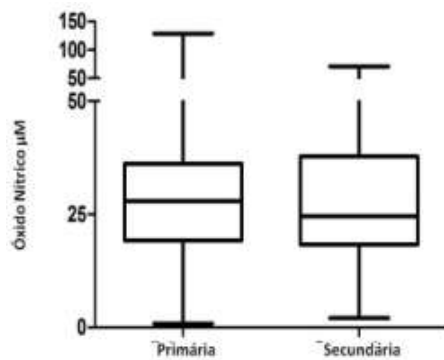
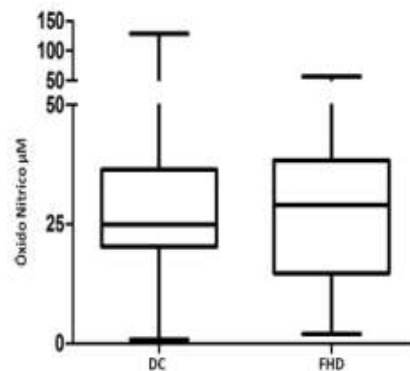


Figure 3: Analysis of serum levels of nitric oxide (NO) between the 3rd to 5th day symptomatology in patients diagnosed with primary and secondary dengue (3A), clinical forms Classical Dengue (CD) and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF I, II and II) (3B), serotype DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in clinical forms Classical Dengue (CD) and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) (3C), serotype DENV-1, DENV-2 and undefined (NEG) (3D).

A



B



C

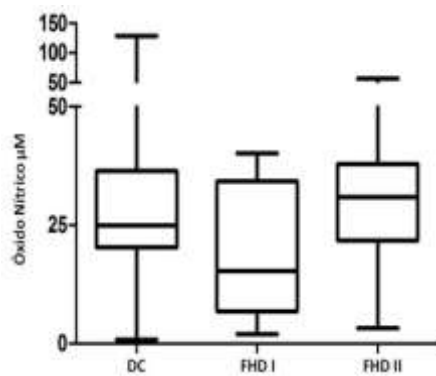
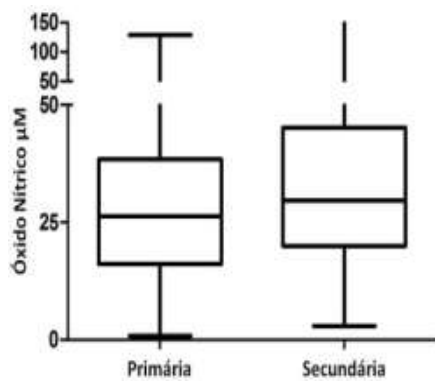
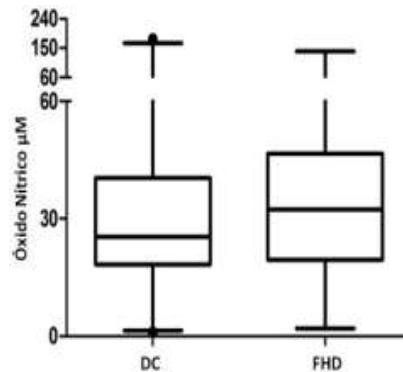


Figure 4: Analysis of serum nitric oxide (NO) from the 5th to the 7th day of symptoms in patients diagnosed with primary and secondary dengue (4A), Classical Dengue (DC) and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) (4B) Classical dengue (DC), dengue Hemorrhagic Fever (DHF I and II) (4C).

A



B



C

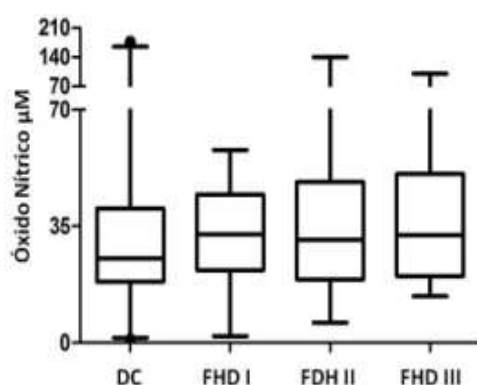
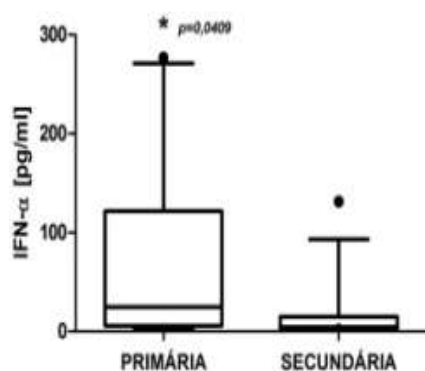
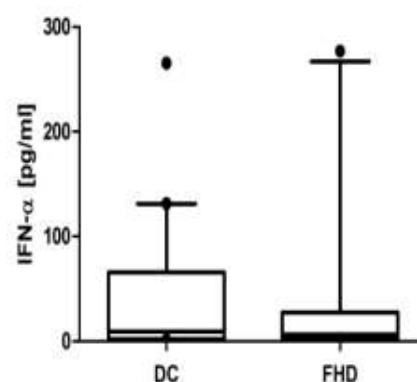


Figure 5: Analysis of serum nitric oxide (NO) from the 7th to the 28th day of symptoms in patients diagnosed with primary and secondary dengue (5A), Classical Dengue (DC) and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) (5B) Classical dengue (DC), dengue Hemorrhagic Fever (DHF I, II and III) (5C).

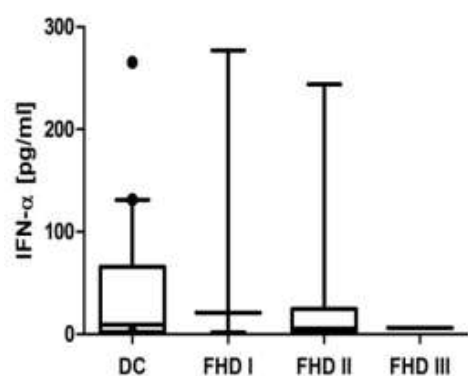
A



B



C



D

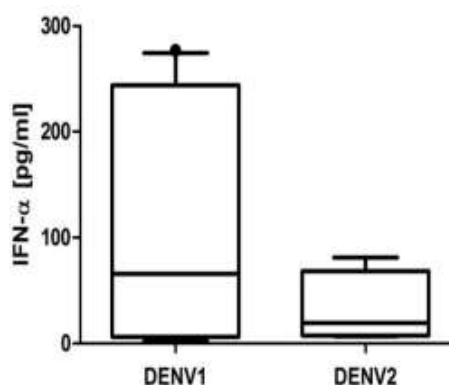


Figure 6: Analysis of serum levels of IFN-α in patients diagnosed with primary and secondary dengue, (6A), clinical forms Classical Dengue (DC) and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) (6B), Classical Dengue (DC) and Fever hemorrhagic Dengue fever (DHF I, II and III) (6c), serotype DENV-1 and DENV-2 (6D).

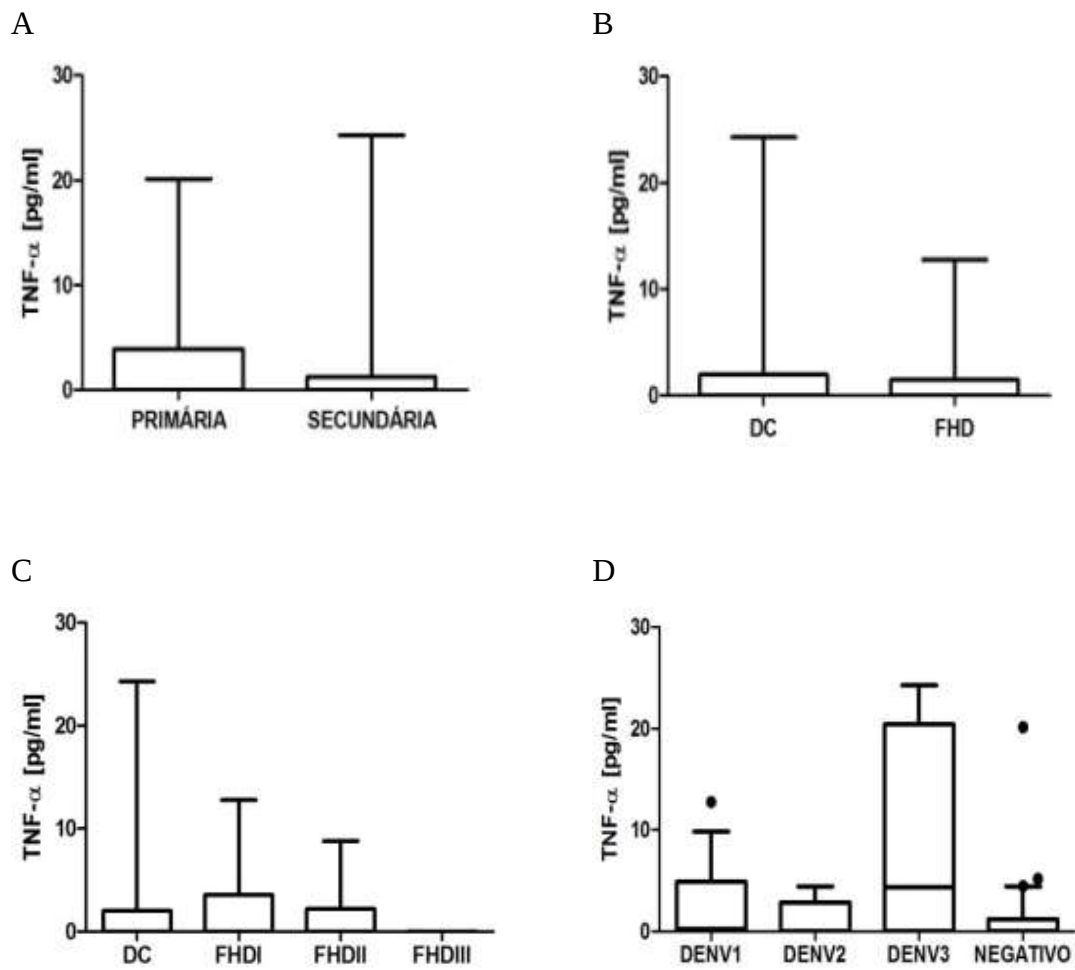
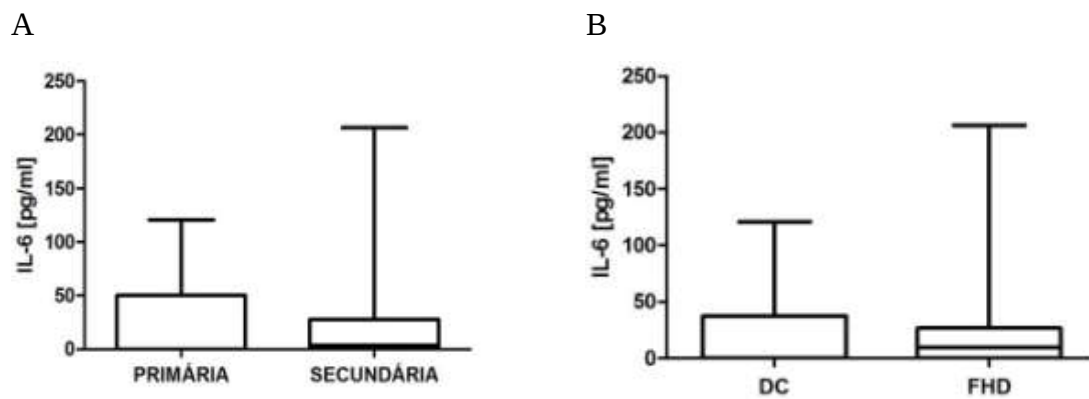


Figure 7: Analysis of TNF- α serum levels between 1 to 2 days of symptoms in patients diagnosed with primary and secondary dengue (7A), clinical forms Classical Dengue (DC) and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) (7B) Classical dengue (CD) and dengue Hemorrhagic Fever (DHF I, II and III) (7C), serotype DENV-1, DENV-2, DENV-3 and undefined serotype (NEG) (7D).



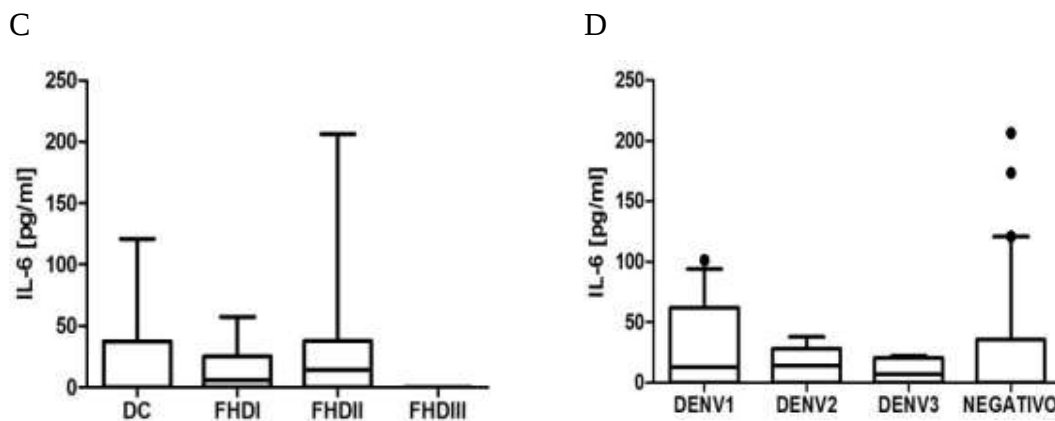


Figure 8: Analysis of serum levels of IL-6 from the 1st to the 2nd day of symptoms in patients diagnosed with primary and secondary dengue (8A), clinical forms Classical Dengue (DC) and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) (8B), Classical dengue (CD) and dengue Hemorrhagic Fever (DHF I, II and III) (8C), serotype DENV-1, DENV-2, DENV-3 and undefined serotype (NEG) (8D).

DISCUSSION

The immunopathogenesis of dengue is not yet fully understood and the identification of patients at risk of developing severe disease is a constant concern. The uncertainty about the role of nitric oxide (NO) in human infection with DENV and the variation of Immunoinflammatory mediators justifies this work. In the present study, we evaluated the serum levels of NO and other pro-inflammatory cytokines in the serum of patients diagnosed with dengue in relation to its various clinical forms, type of infection and the different serotypes, thereby determining the profile of each group cover these immunological markers. In this context, our findings show the detection of higher levels of NO in patients with Classical Dengue (DC) in the early days of symptoms reinforcing the potential role of this molecule in the control of viral infection. However, when we do not find differences in the levels of NO in later times of symptoms, we suggest that NO serum has no biological marker of potential for more severe forms of the disease.

In the literature it was observed that the NO when produced in high concentrations affects vascular tone and aids in the amplification of endothelial lesions, generating shock syndrome frame (15). However, this correlation does not apply to dengue, wherein higher levels of NO were detected in the serum of patients with milder forms of the disease (16), while in another study did not find any production of NO in

the patients (17). In the work of Chareonsirisuthigul et al. (18) investigated the association between serum levels of NO and viral load of DENV in secondary infection addressing the primary DC and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) secondary. In the group of secondary DHF was no detection of NO and increased levels in the first viremic days (fever). In defervescence and convalescence period, the level of NO steadily increased when also the level of DENV RNA in plasma decreased significantly. This inverse correlation suggests that NO may be one of the factors that determines the host DENV production from infected cells. The low NO production found in patients with secondary DHF and not in the primary suggests that the theory may play EDA activity in suppression of NO production was abolished since only in patients with DHF secondary justifying the hypothesis that the presence of heterologous antibodies could interfere with the NO production is not related to the severity of dengue hemorrhagic fever. This production of NO in the differential DC and DHF may be related to endothelial damage observed in DHF, making it unable to produce in the endothelium, thus contributing to the pathogenesis of vascular disease (19). However, the effect of NO on Dengue is controversial and may be associated with a period of disease. Neves-Souza et al. (20) demonstrated in their study only the ability of DENV-1 serotype in infect and activate peripheral blood monocytes of patients with dengue modulating the production of NO via iNOS, revealing the importance of this molecule in the control of viral infection. In contrast, our study has revealed that NO production is also modulated by DENV serotypes DENV-2 and-3, not limited only to the DENV-1 serotype.

The controversies of NO role of data in DENV infections and their serotypes, and the possibility of re-emergence of epidemic outbreaks with new clinical characteristics due to lack of immunological memory of the population against DENV-4 serotype, imply the need to perform studies like this. In the work of Carvalho et al. (1) patients with DHF had high levels of NS1 in relation to patients with CD. It was observed during the febrile phase DC significant increase in serum levels of NO and decrease in these levels DHF. During the phase of convalescence, no difference was detected in the levels of NO between the groups. The results of this work and our strengthened the fact that the intensity of DENV replication in the early days of the disease can influence the clinical outcome. The reasons for the high level of NO in DC and low in DHF are not yet clear, but damage to endothelial cells during the acute phase (febrile) of DENV infection, with a consequent failure eNOS enzyme, is involved

could. Moreover, since NO is a molecule of conflicting functions (1,22) increased levels of NO in DC could play a role in reducing viral load and modify disease progression for hemorrhagic fever.

A previous study by Levy et al. (23) showed that viral serotypes have similar levels of the FHD and DC group measurand that NO may be involved in the progression of infection by dengue serotype independent. In sum, these data can presume that NO not only contribute to the protection as well as in the pathology DENV depending on the amount of generated phase of the disease. In this study, we measured that NO is an important messenger, which has been associated, especially the pathogenesis of CD to play antiviral activity in primary infection. It is possible that during infection beneficial or deleterious effect is determined by the innate and adaptive immunity with cytokine production due to the interaction of viruses with their main targets: monocytes, dendritic and endothelial cells. For several viruses the first step towards the establishment of infection is the evasion of innate antiviral response provided by interferons system (IFNs). The cellular action of IFNs is considered the early host defense during the early days of infection phase during which the intensity of viral replication determines clinical outcome. The α and IFN- β are secreted by infected cells exhibit multiple biological properties, including antiproliferative, antiviral and immunomodulatory (24). Some studies suggest that IFN- α and β infections modulate members of the Flaviviridae family, however, work (27) has identified a mechanism inhibitor. In addition, the action of IFNs against dengue and other mediators Immunoinflammatory continues confused. In the work of Kurane et al. (26) found a high level of IFN- α in human plasma after the onset of symptoms in CD.

The severity of DENV infection appears to be due to the disproportionate production of inflammatory cytokines (27,28) so heterologous antibodies in plasma has also been suggested based on the observations that reinfection by a different serotype of dengue increases the risk severe (18). In this case, the rapid activation of the active cross-reactive memory T cells specific DENV generated during the primary infection appears to provoke a strong production of pro-inflammatory cytokines, including IFNs, TNF- α and IL-6, which can directly damage cells of the vascular endothelium, resulting in plasma leakage (28,29).

In our study, we observed the presence of three different serotypes in the same study population, but no association with levels of circulating cytokines. The increased detection of IFN- α in patients with primary dengue this study suggest that immune

surveillance mechanisms involved in primary infection are functional in these patients, while secondary infection seems to negatively modulate the production of cytokines, serving as means to escape viruses. In their study, Becquart et al. (2) demonstrated high levels of IFN- α throughout the acute phase of the disease in all DENV-2 infected patients primarily (24) IFN- α mainly produced by macrophages and dendritic cells (30), which is the first line of host defense limiting viral replication. A study carried out with DC affected Thai showed high IFN- α levels in the first three days of symptoms after the onset of fever (26), these data that were against our findings confirming the statistical difference in the primary DC relation to the secondary. A study in Taiwan suggested that patients with secondary infections with DENV-2 were differentiated immune response with lower levels of IFN- α , the third to seventh day after the onset of symptoms associated with the onset of DHF (32). This measures the initial pro-inflammatory response associated with IFN- α may be critical to the pathogenesis of secondary infections by DENV-2. In our study there was no difference between serotypes. The non-lymphoid peripheral tissues harboring a group of immature cells of extreme importance as a component of the immune system, are called dendritic cells (35). Given an infectious or inflammatory process, these cells respond by starting a maturation process characterized by the production of cytokines and chemokines in addition to the expression of adhesion molecules involved in antigen processing and presentation to T lymphocytes (36). Polymorphism in the promoter of the receptor of dendritic cells with the level expressed on the cell surface has been linked. The exact mechanisms by which DENV escapes the immune response by interacting with the promoter of dendritic cells are not fully elucidated (39).

Studies on the role of TNF- α in dengue are not conclusive. Results indicate high levels in more severe forms of infection (34,40) But it is observed that in some populations this correlation between TNF- α and severity of the disease does not apply (42,43) as was observed in the present work, which TNF- α serum levels do not correlate with the analyzed groups are irrelevant data. Further definitions about an association between TNF- α production and clinical forms of dengue are needed in patient populations constantly at risk of exposure to new infections.

According Chareonsirisuthigul et al. (18) in DHF there are increased levels of IL-6, and the DC output is significantly low during early infection. However, both patients with secondary infection, and patients with primary infection demonstrated a high production of TNF- α as compared to healthy individuals. These results suggest that

secondary infection facilitates the synthesis of anti-inflammatory cytokines by blocking the production of Th1 cytokines. In our study, we are faced with low and without statistical significance in the primary and secondary dengue groups, DC and DHF, DC and FHD I, II and III, and in the analysis of circulating serotypes in Paraíba population. The TNF- α serum levels in secondary infection of DHF II, the findings of Levy et al. (23), were higher than the other patients with dengue. There was associação with the viral serotype. Elevated serum levels of IL-6 were observed in secondary infection of DHF grade II, suggesting participation in severe form of dengue, and infection DENV-4.

The TNF- α has the potential function as pathological inducing changes in dengue. This mediator can induce apoptosis and mediate endothelial injury during illness (17). However, as the induction of apoptosis may represent an indirect effect of TNF- α to decrease the viral progeny (44), a beneficial effect of this mediator can't be ruled out. TNF- α indirectly may also induce damage by IL-6 production induced (45). In this context, the highest levels of this cytokine were observed in Asian children with dengue shock syndrome (DSS), and a correlation between the severity of the disease and serum IL-6 levels in adults. Data on the importance of IL-6 in DENV infection are also conflicting. However, high concentrations of IL-6 may have implications in several pathologies, especially in DHF and DSS. This cytokine induces increased systemic production of anti-platelet autoantibodies and coagulation deficiency, resulting in bleeding and plasma extravasation (46). However, TNF- α levels and IL-6 in this present study showed no associations with standard DC or DHF.

In view of the uncertainties surrounding the factors that determine the evolution of DC in DHF, several hypotheses have been raised related to the virus, individuals or genetic factors. The level of existing evidence does not yet allow form a complete picture of the immunopathogenesis of the problem, indicating the urgent need for research in this direction. Therefore continue to evaluate the ability of blood cells to produce NO and proinflammatory cytokine is of paramount importance for the necessary clinical and therapeutic care to the patient are provided.

CONCLUSION:

This study investigated and descriptive manner analogous to serum levels of NO and inflammatory cytokines against clinical forms of dengue virus type serological and

days of specific symptoms of the disease from which data were used side by side by reviewing records. Among the groups was significant difference of NO in CD patients compared to those with DHF, with the remaining days of symptoms exempt from statistical difference. In the measurement of proinflammatory cytokines difference was found only for IFN- α between the first and second day of symptoms. The data suggest that the serum quantification of NO and inflammatory cytokines in this population does not help to determine biological marker for severe forms of dengue disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Dr^a. Ana Isabel Fernandes Vieira of Universidade Federal da Paraíba (UFPB) for authorizing the use of sera from patients infected with dengue, and Dr^a. Marli Tenorio (LAVITE/PE) for the characterization of viral serotype.

REFERÊNCIAS

1. **Carvalho DM, Garcia FG, Terra APS, Tosta ACL, Silva LA, Castellano LR, Teixeira DNS.** 2014. Elevated Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Serum Levels and Altered Toll-Like Receptor 4 Expression, Nitric Oxide, and Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Dengue Hemorrhagic Fever Patients. *J Trop Med*, p.1-9.
2. **Becquart P, Wauquier N, Nkoghe D, Ndjoyi-Mbiguino A, Padilla C, Souris M, Leroy EM.** 2010. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BioMed Infect Dis*, p.2-11.
3. **Teoh BT, Sam SS, Tan KK, Danlami MB, Shu MH, Johari J, Hooi PS, Brooks D, Piepenburg O, Nentwich O, Wilder-Smith A, Franco L, Tenorio A, AbuBakar S.** 2015. Early detection of the dengue virus using reverse transcription-recombinase 2 polymerase amplification. *J Clin Micro*, p.1-29.
4. **Halstead SB.** Dengue vaccine development: a 75% solution? 2012. *Lancet*, p.1535-1536.
5. **Mangold KA, Reynolds SL.** A review of dengue fever: resurging tropical disease. 2013. *Pediat Emerg Care*, p. 665-669, 2013.
6. **WHO,** Dengue and severe dengue. World Health Organization, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: 12 dez. 2014.
7. **Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, Guzmán MG.** 2010. The epidemiology of dengue in the

- Americas over the last three decades: a worrisome reality, *Am J Trop Med Hyg*, p. 128-135.
8. **Hottz E, Tolley ND, Zimmerman, Weyrich AS.** 2011. Platelets in Dengue Infection. *Drug Discov. Today Disease Mechanisms*, p.33-38.
 9. **Malagris LEN.** **A via L-arginina-óxido nítrico e o controle do stress em pacientes com hipertensão arterial sistêmica.** 119f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental), Centro Biomédico da Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
 10. **Sommer C, White F.** Cytokines, Chemokines, and Pain apud Beaulieu P, Lussier D, Porreca F. 2010. *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, Seattle, IASP Press, p.279-302.
 11. **WHO,** Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment and Control. World Health Organization, 1997
 12. **Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Analyt Bioch*, p.131-136.
 13. **Bryan NS, Grisham MB.** 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Rad Biol Med*, p. 645-657.
 14. **Dusse LMSA, Silva RM, Vieira LM, das Graças Carvalho M.** 2005. Does plasma nitric determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? *Clin Chim Acta*, p.195-197.
 15. **Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, Mahanty S, Sanchez AJ, Wagoner KD, Rollin PE.** 2004. 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*, p.10370-10377.
 16. **Valero N, Espina LM, Añez G, Torres E, Mosquera JA.** 2002. Short Report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, p.762-764.
 17. **Espina LM, Valero NJ, Hernández JM, Mosquera JA.** 2003. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*, p.48-53.
 18. **Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S.** 2007. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol*, p.365-375.
 19. **Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Chiu SC, Lin YS.** Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol*, p.657-664, 2002.
 20. **Neves Souza PCF, Azeredo EL, Zagne SMO, Valls-de-Souza R, Reis SRNI, Cerqueira DIS, Nogueira RMR, Kubelka CF.** 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection. *BMC Infec Disea*, p.1-12.

21. **Guidotti LG, Chisari FV.** 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Ann Rev Immunol*, p.65-91.
22. **Mocellin S, Bronte V, Nitti D.** 2007. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities, *Medicinal Research Reviews*, p.317–352.
23. **Levy, A, Valero N, Espina LM, Añez G, Arias J, Mosquera J.** 2010. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue, *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, p.16–23.
24. **Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, LU B, Ernest J. Harris E.** 2000. Modulation of Dengue Virus Infection in Interferons Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma. *J Virol*, p.4957-4966.
25. **Lin Y, Huang YL, Ma SH, Yeh CT, Chiou SY, Chen LK, Liao CL.** 1997. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitricoxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J Virol*, p.5227–5235.
26. **Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA.** 1993. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med and Hyg*, p. 222-229.
27. **Chaturvedi UC, Shrivastava R, Tripathi RK, Nagar R.** 2007. Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. *FEMS Immunol Med Microbiol*, p. 285-299.
28. **Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S.** 2009. Progress towards a dengue vaccine. *Lancet Infect Dis*, p.678-687.
29. **Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, Green S, Ennis FA, Rothman AL.** 2002. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis*, p.1697-1703.
30. **Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E.** 2004. Interferondependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol*, p.2701-2710.
31. **Samuel CE.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, p.778-809.
32. **Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM.** 2006. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*, p. 142-147.
33. **Braga IA, Valle D.** 2007. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, p.113-118.
34. **Chakravarti A, Kumaria R.** 2006. Circulating levels of tumour necrosis factoralpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res*, p.25-30.
35. **Rovati B, Mariucci S, Manzoni M, Bencardino K, Danova M.** 2008. Flow cytometric detection of circulating dendritic cells in healthy subjects. *Eur J Histochem*, p.45-52.

36. **Steinman RM.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol*, p.271-96, 1991.
37. **Wati, S, Rawlinson SM, Ivanov RA, Dorstyn L, Beard MR, Jans DA, Pitson SM, Burrell CJ, Li P, Carr JM.** 2011. Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) stimulation of cells with established dengue virus type 2 infection induces cell death that is accompanied by a reduced ability of TNF-alpha to activate nuclear factor kappaB and reduced sphingosine kinase-1 activity. *J Gen Virol*, p.807-818.
38. **Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A.** 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*, p. 23698-23708.
39. **Van Kooyk Y, Geijtenbeek, TB.** 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*, p.697-709.
40. **Green, S.; Rothman, A.** 2006. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Cur Opin Infect Dis*, p.429-36.
41. **Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, Sanchez L, Valdes L, Volk HD, Guzman MG.** 2010. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol*, p.1135-1140.
42. **Purwati, Nasronudin, Kusumowidagdo ER, Rantam FA.** 2011. The relation between levels of TNF-a, IL-1b, PGE2 and PLA2 with the severity degree of dengue hemorrhagic. *Microbiol Indon*, p. 51-55.
43. **Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E, Larreal Y, Alvarez-Mon M.** 2014. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virol*, p.42-51.
44. **Koyama AH, Fukumori T, Fujita M, Irie H, Adachi A.** 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect*, p.1111–1117.
45. **Andersen K, Pedersen BK.** 2008. The role of inflammation in vascular insulin resistance with focus on IL-6. *Horm Metabol Res*, p.635-639.
46. **Rachman A, Rinaldi I.** 2006. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. *Acta Med Indon*, p.105-108.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética HULW/UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - UFPB
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY - HULW
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

I - Identificação

Título do projeto: Avaliação dos critérios para definição de caso de dengue hemorrágica/síndrome do choque de dengue utilizados na vigilância epidemiológica

Protocolo no CEP Nº 032/09

CAAE:0031.0.126.000-09

Classificação no fluxograma: Grupo III – FR: 243511

Área de conhecimento: Ciências da Saúde- Medicina - Diagnóstico

Finalidade: Tese de Doutorado em Medicina Tropical - UFPE

Pesquisadora responsável: Ana Isabel Vieira Fernandes

Orientadores: Heloisa Ramos Lacerda de Melo e Carlos Alexandre Antunes de Brito

Local de realização: Hospital Universitário Lauro Wanderley – Clínica de Doenças Infecto-Contagiosas (João Pessoa-PB); Hospital da Unimed (João Pessoa-PB), Hospital Infantil Arlinda Marques (João Pessoa-PB) e Complexo Hospitalar de Mangabeira Governador Tarcisio Burity (João Pessoa-PB).

Data de recebimento no CEP-HULW: 22/04/2009

Data da apreciação: 28/04/2009

Apoio: CNPQ

II - Sumário do projeto

O objeto de estudo envolve a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) cujos critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) compreendem: febre ou história recente de febre, presença de manifestações hemorrágicas espontâneas ou induzidas, baixa contagem de plaquetas ($<100.000/\text{mm}^3$), evidências de extravasamento capilar. Considerando a dificuldade em aplicar o esquema de classificação na prática cotidiana, faz-se necessário novos estudos para rediscutir os critérios utilizados pela OMS de casos de FHD, redefinindo os coortes utilizados, validando-os com outros métodos de diagnóstico e buscando marcadores mais precoces.

III - Objetivos principais:

a) avaliar a acurácia dos critérios estabelecidos pela OMS na definição de casos de FHD; b) identificar os fatores associados à FHD; c) propor um critério de pontos na definição de formas graves de doença (FHD).

III – Metodologia

Pesquisa clínica a ser realizada com 418 pacientes internados com suspeita de dengue, de qualquer idade, no período de junho de 2009 a junho de 2010. Para a coleta dos dados será utilizado como instrumento um questionário com perguntas relacionadas aos aspectos sócio-demográficos dos pacientes, os sinais e sintomas além da realização de coleta de sangue para avaliação laboratorial e de ultrassonografia no quinto e sétimo dias do início da febre. Etapas a serem realizadas:

- 1 Validação dos critérios da OMS na definição de FHD em uma coorte de pacientes internados com diagnóstico de dengue nos Hospitais: HULW, UNIMED e Arlinda Marques
- 2 Estudo dos fatores clínicos e laboratoriais associados à FHD – a análise será feita como um caso controle, considerando como casos aqueles que preencherem os critérios da OMS para FHD e controles os pacientes com DC.
- 3 Elaboração de uma proposta de um sistema de pontos para identificação precoce dos casos de FHD.

IV – Aspectos éticos

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
1. Título	Adequado
2. Objetivos	Adequados
3. Método	
• Tipo de projeto	Pesquisa em seres humanos
• Delineamento	Adequado
• Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
• Participantes pertencentes a grupos especiais	Sim
• Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
• Relação risco-benefício	Adequada
• Uso de placebo	Não
• Período de suspensão de uso de drogas(wash out)	Não se aplica
• Monitoramento da segurança e dados	Adequado
• Armazenamento de material biológico	Adequado
• Instrumento de coleta de dados	Adequado
• Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
• Privacidade e confidencialidade	Adequada
• TCLE	Adequado às normas e diretrizes Resolução 196/CNS
4. Cronograma	Adequado
5. Orçamento	
• Solicita recursos à instituição	Não
• Fonte de financiamento	CNPQ
6. Referências bibliográficas	Adequada - Vancouver
7. Currículo lattes	Entregue

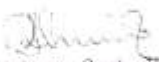
Considerando que os procedimentos adotados por esta pesquisa não causarão riscos previsíveis para os indivíduos pesquisados, que a participação das pessoas selecionadas na amostra é inteiramente voluntária, que todos os indivíduos poderão a qualquer momento desistir da pesquisa sem sofrer nenhum dano ou prejuízo, que por ocasião da publicação dos resultados da pesquisa será assegurado o anonimato dos participantes, e ainda, que o projeto se encontra metodologicamente estruturado e de acordo com os aspectos éticos para a realização de pesquisas envolvendo seres humanos, recomendados pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, somos do parecer favorável à aprovação.

PARECER DO CEP/HULW: APROVADO

Diante do exposto, o CEP/HULW solicita:

1. Comunicar qualquer alteração no projeto de pesquisa e no TCLE
2. Enviar um resumo sucinto dos resultados no final da pesquisa.

João Pessoa, 04 de Maio de 2009


Japionira Cortez Costa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/HULW

Japionira Cortez Costa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-HULW

Anexo B – Termo de Consentimento Livre I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Pesquisa em Dengue

Eu, venho, através deste documento, dar meu consentimento para participar como voluntário na pesquisa sobre dengue, realizada no Hospital Universitário Lauro Wanderley no município de João Pessoa – PB, que está sendo desenvolvida pela prof. Ana Isabel Vieira Fernandes sob a orientação dos professores: Marli Tenório Cordeiro e Carlos Alexandre Antunes de Brito.

Atesto que fui devidamente informado que a finalidade deste trabalho é contribuir para a identificação dos fatores de risco para o desenvolvimento da forma mais grave da dengue, possibilitando o seu rápido reconhecimento, evitando, assim, as mortes por dengue.

A minha participação consistirá em responder a perguntas sobre os sintomas da doença, coleta de sangue para a avaliação laboratorial das alterações provocadas pela dengue, bem como confirmação pela sorologia e identificação do sorotipo. Fui informado que a coleta de sangue será feita através da punção venosa que é um método rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e realizado por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis. Também fui informado que a minha pressão será medida em duas posições, deitado e em pé, e que será realizada a prova do laço, que pode causar algum desconforto, pois o tensiômetro pode apertar o braço durante 5 minutos e que este exame deveria ser realizado independentemente da pesquisa, na suspeita de dengue.

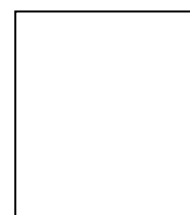
Autorizo a apresentação dos resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicações em revistas científicas.

Reconheço que a minha participação no estudo é voluntária, não serei obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo pesquisador (a). Caso decida não participar do estudo, ou em qualquer momento desistir, não

sofrerei nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que venho recebendo nesta instituição, que será rigorosamente seguida pela orientação do manual de Manejo Clínico dos Pacientes com Dengue do Ministério da Saúde.

Estou ciente que poderei procurar os pesquisadores para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa ou obter informações no Comitê de Pesquisa de Seres Humanos no Hospital Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, que funciona em sala própria no 2º andar do prédio deste hospital (telefone 83-3216-7203). Estou ciente que receberei uma cópia deste documento.

Assinatura do participante da pesquisa



Espaço para impressão
dactiloscópica

João Pessoa – PB, _____ de _____ de 20____.

Assinatura da Testemunha

Contato com o pesquisador (a) responsável

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora Ana Isabel Vieira Fernandes.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley – (83) 3216-7302

Telefones: 3216-7058/3216-7048

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante

Anexo C – Termo de Consentimento Livre I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Pesquisa em Dengue

Eu, venho, através deste documento, dar meu consentimento para _____ participar como voluntário na pesquisa sobre dengue, realizada no Hospital Universitário Lauro Wanderley no município de João Pessoa – PB, que está sendo desenvolvida pela prof. Ana Isabel Vieira Fernandes sob a orientação dos professores: Marli Tenório Cordeiro e Carlos Alexandre Antunes de Brito.

Atesto que fui devidamente informado que a finalidade deste trabalho é contribuir para a identificação dos fatores de risco para o desenvolvimento da forma mais grave da dengue, possibilitando o seu rápido reconhecimento, evitando, assim, as mortes por dengue.

A participação do meu filho(a) consistirá em responder a perguntas sobre os sintomas da doença, coleta de sangue para a avaliação laboratorial das alterações provocadas pela dengue, bem como confirmação pela sorologia e identificação do sorotipo. Fui informado que a coleta de sangue será feita através da punção venosa que é um método rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e realizado por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis.

Também fui informado que a minha pressão será medida em duas posições, deitado e em pé, e que será realizada a prova do laço, que pode causar algum desconforto, pois o tensiômetro pode apertar o braço durante 5 minutos e que este exame deveria ser realizado independentemente da pesquisa, na suspeita de dengue.

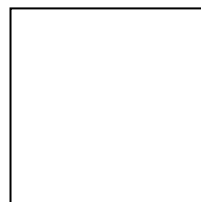
Autorizo a apresentação dos resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicações em revistas científicas.

Reconheço que a minha participação no estudo é voluntária, não serei obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo pesquisador

(a). Caso decida não participar do estudo, ou em qualquer momento desistir, não sofrerei nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que venho recebendo nesta instituição, que será rigorosamente seguida pela orientação do manual de Manejo Clínico dos Pacientes com Dengue do Ministério da Saúde.

Estou ciente que poderei procurar os pesquisadores para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa ou obter informações no Comitê de Pesquisa de Seres Humanos no Hospital Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, que funciona em sala própria no 2º andar do prédio deste hospital (telefone 83-3216-7203). Estou ciente que receberei uma cópia deste documento.

Assinatura do participante da pesquisa



Espaço para impressão
dactiloscópica

João Pessoa – PB, _____ de _____ de 20____.

Assinatura da Testemunha

Contato com o pesquisador (a) responsável

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora Ana Isabel Vieira Fernandes.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley – (83) 3216-7302

Telefones: 3216-7058/3216-7048

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante